

УДК 577.2:58.036.5:633.11

М.В. ГАЛАЄВА, В.І. ФАЙТ, С.В. ЧЕБОТАР, О.В. ГАЛАЄВ, Ю.М. СИВОЛАП

Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннєзнавства та сортовивчення, Одеса

E-mail: mariagal1@rambler.ru

ЗВ'ЯЗОК АЛЕЛІВ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ П'ЯТОЇ ГРУПИ ХРОМОСОМ 3 МОРОЗОСТІЙКІСТЮ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Визначено морозостійкість і проаналізовано за мікросателітними локусами п'ятої групи хромосом батьківські форми та рекомбінантно-інбредні лінії F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Встановлено зв'язок алельних відмінностей мікросателітних локусів Xcfd7-5B, Xwtc415-5B та Xgwm182-5D з рівнем морозостійкості ліній.

Ключові слова: озима пшениця, морозостійкість, мікросателітні локуси.

Вступ. Низька негативна температура – один з абіотичних стресових чинників, що обмежує поширення та виробництво озимих культур. Для умов півдня України притаманна відсутність постійного снігового покриву, тривалі та часті відлиги у грудні – лютому, що перемежуються з періодами негативних температур, тому створення сортів м'якої озимої пшениці з підвищеним генетично обумовленим рівнем морозостійкості є одним з актуальних завдань селекції [1, 2].

Адаптація рослин до дії низьких температур тісно пов'язана зі змінами в експресії певних генів [3–6]. Навіть декілька годин низькотемпературної експозиції рослин призводять до різкого зростання рівнів транскриптів генів, які регулюються дією холоду. Високий рівень синтезу транскриптів підтримується протягом всього терміну низькотемпературної експозиції і зменшується до початкового значення тільки через кілька годин після повернення адапто-

ваних до холоду рослин в оптимальні температурні умови [4, 6].

Останнім часом у пшениці, ячменю та жита ідентифіковано і охарактеризовано низку генів, що активуються під час холодової акліматизації. Більшість цих генів належать до родини *Cor/Lea* та зазвичай кодують досить гідрофільні білки [7]. Гени *Cor/Lea* швидко реагують на низьку температуру, їхній транскрипційний рівень досягає максимуму протягом 3–5 днів [8–11]. Вказані гени локалізовані на різних групах хромосом м'якої пшениці [12], разом з тим більшість із них однаково проявляє експресію до низької температури [13]. Це свідчить, що пшеничні гени *Cor/Lea* знаходяться під контролем спільних регуляторних генів.

За допомогою молекулярних маркерів (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів або полімеразна ланцюгова реакція) на довгих плечах хромосом п'ятої гомеологічної групи локалізовано головні гени морозостійкості [14], зокрема, гени *Fr-A1* та *Fr-A2* на хромосомі 5A, *Fr-B1* – на хромосомі 5B та *Fr-D1* – на хромосомі 5D [15, 16]. Вважається, що першими до каскадного механізму холодової акліматизації залучаються саме гени *Fr* [17] (продукт генів *Fr* або механізм їхньої дії з'ясований недостатньо), що в свою чергу сприяє експресії *Cbf*-генів. Гени *Cbf*, які розташовані на хромосомах 5HL ячменю [18, 19] та 5AL *Triticum monococcum* [20] близько до генів *Fr-H2* і *Fr-A^m2*, кодують протеїни, що є транскрипційними факторами

генів *Cor/Lea*. Білки *Cbf* впізнають специфічні регуляторні елементи (CRT/DRE) в промоторній зоні генів *Cor/Lea* та індують їхню експресію. На гомеологічних хромосомах п'ятої групи у озимих злаків розташовано декілька регуляторних генів. Можливо, саме зміни в структурі та функціях генів п'ятої групи хромосом призводять до різного ступеня морозостійкості сортів озимої пшениці. Виявлення нових ПЛР-локусів, зчеплених зі стресовими генами, дозволить більш ефективно добирати морозостійкі генотипи на ранніх етапах селекції.

Мета даної роботи – аналіз рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса за аелями міросателітних (МС) локусів п'ятої групи хромосом та оцінка зв'язку аельних відмінностей МС-локусів або генів, тісно зчеплених з ними, із морозостійкістю рослин озимої пшениці.

Матеріали і методи. Матеріалом для досліджень слугували батьківські форми і 101 рекомбінантно-інбредна лінія (РІЛ) F_7 комбінації схрещування Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Лузанівка одеська належить до групи сортів з рівнем морозостійкості «вище середнього», а Одеська червоноколоса має відносно «низький» рівень морозостійкості [21].

Оцінку морозостійкості РІЛ проводили при штучному проморожуванні паростків і рослин у фазі кушіння згідно з методикою [22]. Проморожування паростків здійснювали тричі впродовж 2008 р. при $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ (перше проморожування – 18–22 листопада 2008 р., друге – 24–28 листопада 2008 р., третє – 2–6 грудня 2008 р.). В кожному досліді добирали по 75 зерен кожної лінії (по 25 зерен на кожну з трьох повторностей). На змочену у воді смужку фільтрувального паперу розкладали 25 зерен, смужку згортали у рулон та розміщували рулони в спеціальних металевих ящиках з водою. Після появи сходів паростки вирощували протягом 5 діб при кімнатній температурі. П'ятидобові паростки розміщували в низькотемпературній камері для проходження першої та другої фаз загартування. Проморожували рослини 24 год при $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Після проморожування паростки обрізали на рівні 5–6 см від верхнього краю рулону й відрощували протягом 15 діб при кімнатній температурі з подальшим підрахунком живих та загиблих рослин.

Для визначення морозостійкості у фазі кушіння рослин насіння РІЛ висівали 12 жовтня 2010 р. на трирядкових ділянках довжиною 1 м по 50 зерен на рядок з площею живлення окремої рослини $30 \times 2\text{ см}^2$. В І декаді лютого та І декаді березня з поля добирали по 25–85 рослин кожної лінії та проморожували при температурі $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ДНК виділяли із зеленого листя та 3–5-денних паростків за допомогою СТАВ-буфера [23]. ПЛР зі спрямованими праймерами проводили на термоциклері «Терцик» («ДНК-технологія», РФ). Реакційна суміш об'ємом 25 мкл містила буфер (67 мМ трис-НСІ 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 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 од. Таq-полімерази. Зверху реакційного розчину нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Умови реакції: денатурація при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ впродовж 30 с (початкова – 2 хв), відпалювання при 55, 58, 60, $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ (в залежності від праймерів) – 30 с, елонгація при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 1 хв (заклучна елонгація – 4 хв). МС-аналіз ДНК батьківських сортів Лузанівка одеська, Одеська червоноколоса і РІЛ F_7 проводили з використанням 31 міросателітного маркера, що локалізовані на хромосомах п'ятої групи: *Xbarc165-5A*, *Xbarc186-5A*, *Xwmc96-5A*, *Xwmc110-5A*, *Xbarc1-5A*, *Xbarc40-5A*, *Xbarc155-5A*, *Xcfa2163-5A*, *Xwmc415-5A*, *Xbarc319-5A*, *Xgwm156-5A*, *Xbarc330-5A*, *Xbarc74-5B*, *Xcfa2070-5B*, *Xbarc88-5B*, *Xbarc4-5B*, *Xbarc89-5B*, *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B*, *Xcfd7-5D*, *Xcfd12-5D*, *Xcfd52-5D*, *Xgwm654-5D*, *Xbarc286-5D*, *Xgwm190-5D*, *Xbarc320-5D*, *Xgwm583-5D*, *Xgwm212-5D*, *Xbarc93-5D*, *Xgwm182-5D*, *Xcfd8-5D*.

Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 2%-ному агарозному гелі та 12%-ному поліакриламідному гелі у $1\times\text{TBE}$. Електрофорез в поліакриламідному гелі проводили при постійній напрузі 500 В в апараті для вертикального гель-електрофорезу «Hoefler Scientific Instruments» (США). Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу здійснювали імпрегнуванням гелів нитратом срібла. Електрофорез в агарозному гелі виконували при напрузі 120 В, візуалізацію продуктів ДНК в ультрафіолеті – забарвленням гелів бромистим етидієм (10 мкг/мл). Відеозображення і розміри ампліфікованих фрагмен-

тів отримували за допомогою відеосистеми «ImageMaster VDS» («Amersham Pharmacia Biotech», США) згідно з інструкцією користувача устаткування. Для калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів використовували стандарти pUC 19/MspI та 100 bp DNA Ladder.

Статистичну обробку отриманих результатів здійснювали за загальноприйнятими методиками [24].

Результати досліджень та їх обговорення. Аналіз РІЛ на морозостійкість. Рівень морозостійкості популяції РІЛ F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса був досить високим (66–86 %) і при проморожуванні паростків дещо більшим, ніж при проморожуванні рослин у фазі кушіння (табл. 1). Разом з тим, незважаючи на однакові умови загартування та проморожування паростків (–12 °С), середній рівень морозостійкості популяції у фазі паростків був дещо різним і дорівнював 73, 81, 86 % живих рослин відповідно при першому, другому та третьому проморожуваннях. При цьому не виявлено достовірних відмінностей за морозостійкістю популяції РІЛ при другому і третьому проморожуваннях, t-критерій дорівнював 1,60 при t_{0,05} = 1,96. В той же час встановлено достовірну відмінність морозостійкості популяції при першому і другому та першому і третьому проморожуваннях (t = 2,45 та t = 4,38 відповідно), що може бути пов'язано з різницею кімнатних температур під час прощування насіння в рулонах впродовж перших 5 діб до розміщення їх у камері штучного клімату.

Морозостійкість популяції у фазі кушіння не залежала від часу добору рослин в полі (F = 1,08 при F_{0,05} = 1,39) та дорівнювала 69 % живих рослин у I декаді лютого та 66 % у I декаді березня. В зв'язку зі зменшенням морозостійкості рослин по закінченні зими розмах варіювання окремих ліній у другому випадку становив 100 %, а у першому – всього 87 %.

Мікросателітний аналіз РІЛ. Аналіз за 31 МС-локусом сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса дозволив виявити поліморфізм за десятьма з них. Зокрема, з 12 проаналізованих МС-локусів хромосоми 5А поліморфізм між сортами виявлено за трьома локусами – *Xbarc319-5A*, *Xgwm156-5A*, *Xbarc330-5A*. Хромосому 5В проаналізовано за сімома МС-локусами, поліморфними з яких були п'ять локусів (*Xbarc88-5B*, *Xbarc4-5B*, *Xbarc89-5B*, *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B*), а з 12 МС-локусів хромосоми 5D поліморфними виявилися два локуси (*Xgwm182-5D* та *Xcfd8-5D*). Поліморфізм характеризувався різними алелями (відмінності за довжиною ампліфікованих фрагментів ДНК) наведених МС-локусів (табл. 2), які присутні в генотипах сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса. Більшість використаних праймерів є строго специфічними до відповідних МС-локусів. В той же час пара праймерів *Cfd7* детектує два МС-локуси (*Xcfd7-5B* та *Xcfd7-5D*), що розташовані у довгих плечах хромосом 5В та 5D відповідно. Продуктами ампліфікації ДНК сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса були фрагменти: перший, що мав

Таблиця 1. Основні статистичні показники морозостійкості (%) популяції РІЛ F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса на стадії паростків і рослин у фазі кушіння в лютому та березні

Дослід	$\bar{x} \pm \overline{Sx}$	N	min	max	σ	CV
Паростки (–12 °С)						
1	73 ± 2,2	100	3	99	21,9	30
2	81 ± 2,4	100	2	100	24,2	30
3	86 ± 2,0	100	9	100	19,8	23
Рослини (–16 °С)						
Лютий	69 ± 2,7	75	11	98	23,0	33
Березень	66 ± 2,9	67	0	100	23,9	36

Примітка. $\bar{x} \pm \overline{Sx}$ – середнє значення показника ± стандартна похибка; N – кількість ліній; min, max – мінімальне та максимальне значення показника; σ – стандартне відхилення; CV – коефіцієнт варіації.

розмір 240 п.н. та був присутній в обох сортів, і другий розміром 194 п.н., характерний для сорту Лузанівка одеська. У батьківської форми Одеська червоноколоса зазначений фрагмент ампліфікації не виявлявся (нуль-алель). Аналіз ко-сегрегації фрагмента 194 п.н. з продуктами ампліфікації за локусами *Xbarc88-5B*, *Xbarc4-5B*, *Xbarc89-5B* виявив зчеплення між ними та локусом *Xcfd7-5B*. За нашими даними локус *Xcfd7-5B* знаходиться на відстані 29,5 сМ від локусу *Xbarc89-5B*. Отримані результати дозволяють стверджувати, що фрагмент 194 п.н. є алелем локусу *Xcfd7-5B*. Амплікон розміром 240 п.н., що був присутній в обох батьківських форм та у всіх РІЛ, ми враховуємо як алель локусу *Xcfd7-5D*.

Інша пара праймерів *Wmc415* детектує два МС-локуси – *Xwmc415-5A* та *Xwmc415-5B*, що розташовані у довгих плечах хромосом 5A та 5B відповідно. Продуктами ПЛР-реакції ДНК сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса були три фрагменти – 140, 172 та 174 п.н. Фрагмент 140 п.н. присутній в обох сортів та у всіх РІЛ. Сорту Лузанівка одеська притаманний фрагмент ампліфікації розміром 174 п.н., а сорту Одеська червоноколоса фраг-

мент розміром 172 п.н. Аналіз ко-сегрегації даних фрагментів ампліфікації з продуктами ампліфікації за локусами *Xbarc88-5B*, *Xbarc4-5B*, *Xbarc89-5B*, *Xcfd7-5B* виявив зчеплення між ними та локусом *Xwmc415-5B*, за яким детектовано фрагменти 174 та 172 п.н. МС-локус *Xwmc415-5B* розташований на хромосомі 5B між локусами *Xbarc89-5B* (14,1 сМ) та *Xcfd7-5B* (14,3 сМ). Отримані результати дозволяють стверджувати, що саме алелі 174 та 172 п.н. відносяться до локусу *Xwmc415-5B*, а алель розміром 140 п.н. належить до локусу *Xwmc415-5A*, що відповідає даним [25], отриманим на нулітетрасомних лініях, за якими фрагмент 142 п.н. локалізований на хромосомі 5A, а 168 п.н. – на хромосомі 5B.

За зазначеними поліморфними МС-локусами проведено аналіз ДНК 101 РІЛ F₇, одержаних від схрещування різних за морозостійкістю сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса. При відмінностях за двома алелями одного локусу при відсутності селективної переваги в F₇ даної комбінації схрещування повинно спостерігатися розщеплення ліній у співвідношенні 49,7 рослин з алелем одного батька, 1,6 рослин, що мають алелі обох бать-

Таблиця 2. Генотипи сортів Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса за алелями (п.н.) поліморфних мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом

Алелі сорту	<i>Xbarc 319-5A</i>	<i>Xbarc 330-5A</i>	<i>Xgwm 156-5A</i>	<i>Xwmc 415-5B</i>	<i>Xbarc 4-5B</i>	<i>Xbarc 88-5B</i>	<i>Xbarc 89-5B</i>	<i>Xcfd 7-5B</i>	<i>Xgwm 182-5D</i>	<i>Xcfd 8-5D</i>
Лузанівка одеська	218	104	311	174	180	84	130	194	165	160
Одеська червоноколоса	206	106	290	172	158	80	124	null*	162	162

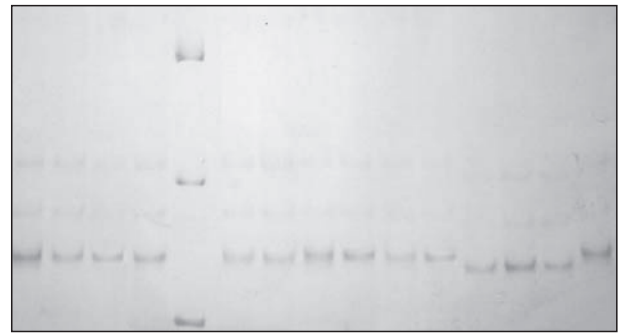
* Відсутність фрагменту ампліфікації (нуль-алель).

Таблиця 3. Співвідношення розщеплення за алелями поліморфних мікросателітних локусів популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса

Алелі сорту	Теоретично очікуване	Фактично одержано									
		<i>Xbarc 319-5A</i>	<i>Xbarc 330-5A</i>	<i>Xgwm 156-5A</i>	<i>Xwmc 415-5B</i>	<i>Xbarc 4-5B</i>	<i>Xbarc 88-5B</i>	<i>Xbarc 89-5B</i>	<i>Xcfd 7-5B</i>	<i>Xgwm 182-5D</i>	<i>Xcfd 8-5D</i>
Лузанівка одеська	49,7	53	55	49	49	56	57	56	54	52	44
Обох батьків	1,6	4	1	2	0	2	2	0	2	4	4
Одеська червоноколоса	49,7	44	45	50	52	43	42	45	45	45	53
χ^2		4,60	1,23	0,13	1,69	1,91	2,37	2,82	0,93	4,28	4,60

ків, та 49,7 рослин з алелем другого батька. В цілому, у популяції виявлено за різними локусами від 44 до 57 рослин з відповідним алелем сорту Лузанівка одеська (табл. 3), від 42 до 53 рослин з відповідним алелем сорту Одеська червоноколоса, та від 0 до 4 рослин – носіїв алелів обох батьків, тобто гетерозигот (рисунок). Співвідношення розщеплення за алелями кожного локусу достовірно відповідає теоретично очікуваному. Критерій відповідності χ^2 дорівнював від 0,13 (локус *Xgwm156-5A*) до 4,60 (локуси *Xbarc319-5A* та *Xcfd8-5D*), що достовірно менше $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$. Повна відповідність розщеплення за вказаними маркерними локусами теоретично очікуваному може свідчити, що в процесі створення РІЛ достатньо повно збережено генетичне різноманіття. Крім цього, можливе подальше використання такого набору ліній для вивчення генетики кількісних ознак, виявлення окремих QTL, побудови генетичних карт тощо.

Порівняння двох груп ліній – носіїв альтернативних алелів по кожному з десяти поліморфних локусів дозволило виявити наявність достовірних відмінностей лише локусів *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B*, *Xgwm182-5D* або локусів, тісно зчеплених з ними, за морозостійкістю паростків та двох з них – за морозостійкістю рослин у фазі кушіння. Лінії, що є носіями



1 2 3 4 М 5 6 7 8 9 Л О 10 11 12

Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК за локусом *Xgwm182-5D*: М – маркер молекулярної маси рUC19/MspI; Л – Лузанівка одеська; О – Одеська червоноколоса; 1–12 – рекомбінантно-інбредні лінії F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса

алелів від сорту Лузанівка одеська за кожним з цих трьох МС-локусів, характеризувалися більшою морозостійкістю паростків на відміну від ліній, що є носіями алелів від сорту Одеська червоноколоса (табл. 4). Так, морозостійкість паростків ліній з алелем 194 п.н. локусу *Xcfd7-5B*, властивим більш морозостійкому сорту Лузанівка одеська, була достовірно вища, ніж морозостійкість ліній з нуль-алелем, характерним для сорту Одеська червоноколоса. При першому проморожуванні паростків алельні від-

Таблиця 4. Морозостійкість паростків та рослин у фазі кушіння груп рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса, що розрізняються за алелями мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом, % живих рослин

Локус	Алеель	Паростки (–12 °C)			Кушіння (–16 °C)	
		1	2	3	Лютий	Березень
<i>Xcfd7-5B</i>	194 п.н. *	78	86	90	66	60
	204 п.н. **	67	74	81	73	73
НІР _{0,05}		9	9	8	–	11
<i>Xwmc415-5B</i>	174 п.н. *	77	87	88	63	63
	172 п.н. **	70	76	84	75	69
НІР _{0,05}		–	9	–	10	–
<i>Xgwm182-5D</i>	164 п.н. *	79	86	92	69	69
	162 п.н. **	68	76	82	68	62
НІР _{0,05}		9	9	7	–	–

* F₇ Лузанівка одеська. ** Одеська червоноколоса.

мінності становили 11 %, при другому – 12 %, при третьому – знову 11 %. Разом з тим відмінності між лініями в популяції за вказаною ознакою при проморожуванні паростків склали 96, 98, 91 % відповідно. Отже, 11,5 % фенотипового різноманіття за морозостійкістю паростків популяції рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса у першому проморожуванні пов'язані з аельними відмінностями за локусом *Xcfd7-5B*, у другому і третьому проморожуваннях – 12,2 і 12,1 % відповідно.

В той же час при проморожуванні рослин у фазі кушіння при –16 °С в березні спостерігали протилежну закономірність. Морозостійкість ліній з нуль-алелем від сорту Одеська червоноколоса за локусом *Xcfd7-5B* була вище на 13 % такого ж показника ліній – носіїв алеля 194 п.н. від сорту Лузанівка одеська. Аналогічну тенденцію виявили і в лютому 2011 р., але відмінності за морозостійкістю між групами ліній з альтернативними алелями локусу *Xcfd7-5B* не були істотними, що мабуть обумовлено недостатнім навантаженням стресового фактора. Зміна рангів генотипів – носіїв альтернативних алелів одного локусу при проморожуванні різновікових рослин (паростки, фаза кушіння) вже була зазначена раніше [26, 27] та пов'язана з умовами загартування рослин.

Аельні відмінності локусу *Xwmc415-5B*, що розташований на відстані 14,3 сМ прокси-

мальніше локусу *Xcfd7-5B*, виявлені тільки при другому проморожуванні паростків та рослин у фазі кушіння в лютому. При цьому морозостійкість паростків ліній з алелем 174 п.н. локусу *Xwmc415-5B*, що властивий морозостійкому сорту Лузанівка одеська, була вища на 11 %, ніж морозостійкість ліній з алелем 172 п.н. від сорту Одеська червоноколоса. При двох інших проморожуваннях паростків вказане рангування ліній – носіїв альтернативних алелів локусу *Xwmc415-5B* зберігалось, але відмінності між ними виявилися неістотними. Під час проморожування рослин у фазі кушіння в лютому, як і за локусом *Xcfd7-5B*, вищим рівнем морозостійкості характеризувались вже лінії з алелем 172 п.н. сорту Одеська червоноколоса. Разом з тим ефект алеля 172 п.н. становив у лютому 12 %, а в березні вже тільки 6 %, та і то не істотно. З урахуванням розмаху варіювання ознаки в популяції можна зробити висновок, що аельні відмінності локусу *Xwmc415-5B* можуть визначати до 11,2 % розбіжностей за морозостійкістю паростків та до 13,8 % – рослин у фазі кушіння, що дібрані з поля в лютому.

Аельні відмінності рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса за локусом *Xgwm182-5D*, що розташований на хромосомі 5D м'якої пшениці, обумовлювали 10–11 % розбіжностей двох груп ліній – носіїв альтернативних алелів цього локусу. Морозостійкість паростків ліній з але-

Таблиця 5. Морозостійкість груп рекомбінантно-інбредних ліній F₇ Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса з різним поєднанням альтернативних алелів локусів *Xcfd7-5B* та *Xgwm182-5D*, % живих рослин

Дослід	Генотип ліній				НІР _{0,05}
	L ₁ + L ₂	L ₂ + O ₁	L ₁ + O ₂	O ₁ + O ₂	
Паростки (–12 °С)					
1	80	79	77	56	11
2	86	87	86	62	13
3	91	92	88	72	10
Кушіння (–16 °С)					
Лютий	63	80	71	65	–
Березень	61	79	58	66	–

Примітка. L₁ – лінії з присутністю алеля 194 п.н. локусу *Xcfd7-5B* від сорту Лузанівка одеська, L₂ – алеля 164 п.н. локусу *Xgwm182-5D* від сорту Лузанівка одеська, O₁ – нуль-алеля локусу *Xcfd7-5B* від сорту Одеська червоноколоса, O₂ – алеля 162 п.н. локусу *Xgwm182-5D* від сорту Одеська червоноколоса.

лем батьківської форми Лузанівка одеська (165 п.н.) була істотно вища, ніж морозостійкість ліній з алелем від неморозостійкого сорту Одеська червоноколоса (162 п.н.). На відміну від двох локусів хромосоми 5В (*Xwmc415-5B*, *Xcfd7-5B*), що розглянуті вище, у цього локусу і при проморожуванні рослин у фазі кушіння більша морозостійкість притаманна лініям – носіям алеля від сорту Лузанівка одеська. Відмінності виявилися не істотними як в лютому, так і в березні.

Наявність локусів *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B* та *Xgwm182-5D*, алельні відмінності за кожним з яких істотно пов'язані з рівнем морозостійкості досліджених ліній, дозволяє оцінити взаємодії умовно «домінантних» і «рецесивних» алелів вказаних локусів або генів, тісно зчеплених з ними, за даною ознакою. Локуси *Xcfd7-5B* і *Xwmc415-5B* розташовані на одній хромосомі на відстані всього 14,2 сМ. Зв'язок алельних відмінностей останнього локусу з морозостійкістю рослин доведено тільки у двох варіантах дослідів, а першого – в чотирьох. Отже доцільним є оцінка взаємодії тільки двох локусів – *Xcfd7-5B* та *Xgwm182-5D*.

Зіставлення рівня морозостійкості чотирьох генотипів з різним поєднанням алелів локусів *Xcfd7-5B* і *Xgwm182-5D* дозволяє констатувати факт їх відмінностей за цією ознакою (табл. 5). Як і очікувалось, менша морозостійкість паростків у всіх трьох дослідів притаманна генотипу $O_1 + O_2$, що поєднує нуль-алель локусу *Xcfd7-5B* та алель 162 п.н. локусу *Xgwm182-5D*, кожний з яких окремо сприяє зменшенню морозостійкості. Обидва походять від сорту Одеська червоноколоса. Заміна в генотипі ліній нуль-алеля локусу *Xcfd7-5B* на альтернативний алель довжиною 194 п.н. ($L_1 + O_2$) від Лузанівки одеської призводила до зростання морозостійкості паростків на 16–24 %, а алеля 162 п.н. локусу *Xgwm182-5D* на алель 165 п.н. ($L_2 + O_1$) – вже на 20–25 %. Обидва генотипи ($L_1 + O_2$ та $L_2 + O_1$) не розрізнялися між собою за морозостійкістю паростків. Поєднання двох алелів, що походило від Лузанівки одеської (194 п.н. локусу *Xcfd7-5B* та 165 п.н. локусу *Xgwm182-5D*), не сприяло зростанню морозостійкості. У рослин генотипів $L_1 + L_2$, $L_1 + O_2$ та $O_1 + L_2$ морозостійкість практично була однаковою. Така взає-

модія алелів двох генів (локусів) ймовірна у випадку повного епістазу одного з них над іншим. Отже, для істотного збільшення морозостійкості ліній при проморожуванні паростків достатньо присутності алеля сорту Лузанівка одеська по одному з локусів – або *Xcfd7-5B*, або *Xgwm182-5D*.

При проморожуванні рослин у фазі кушіння ($-16\text{ }^\circ\text{C}$) відмінності за морозостійкістю чотирьох груп ліній з поєднанням різних алелів локусів *Xcfd7-5B* та *Xgwm182-5D* виявились не суттєвими. Разом з тим зазначили тенденцію до зростання морозостійкості ліній генотипу $L_2 + O_1$ з поєднанням алеля 165 п.н. локусу *Xgwm182-5D* та нуль-алеля локусу *Xcfd7-5B* порівняно з лініями трьох інших груп рослин як у лютому, так і у березні.

Таким чином, лінії генотипу $L_2 + O_1$ характеризувались високою морозостійкістю як при проморожуванні паростків, так і при проморожуванні рослин у фазі кушіння. Сполучення алелів сорту Лузанівка одеська за локусом *Xgwm182-5D* (164 п.н.) та Одеської червоноколоса за локусом *Xcfd7-5B* (нуль-алель) або генів, тісно зчеплених з ними, обумовлює найбільший ефект з морозостійкості ліній в різних дослідів.

Висновки. Сорти Лузанівка одеська та Одеська червоноколоса, що відрізняються за рівнем морозостійкості, досліджували за алелями 31 МС-локусу п'ятої групи хромосом. За десятьма локусами, що виявили поліморфізм між батьківськими формами, проаналізовано 101 рекомбінантно-інбредну лінію F_7 Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса. Співвідношення розщеплення ліній F_7 за алелями кожного локусу відповідало теоретично очікуваному. Виявлено локуси *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B* (хромосома 5В) та *Xgwm182-5D* (хромосома 5D), алельні відмінності кожного з яких визначають 10–12 % фенотипового різноманіття популяції рекомбінантно-інбредних ліній за морозостійкістю паростків. Істотне збільшення рівня морозостійкості ліній пов'язано з алелями, що походило від морозостійкої батьківської форми Лузанівка одеська. Подібну тенденцію спостерігали при проморожуванні рослин, що розрізнялися за алелями локусу *Xgwm182-5D*, у фазі кушіння. Для локусів *Xcfd7-5B* та *Xwmc415-5B* виявили про-

тилежну закономірність. Більшим рівнем морозостійкості на 13 % характеризувались лінії з присутністю алелів від сорту Одеська червоноколоса за зазначеними локусами хромосоми 5В.

Зіставлення рівня морозостійкості чотирьох генотипів з різним поєднанням алелів локусів *Xcfd7-5B* і *Xgwm182-5D* дозволяє констатувати факт відмінності їх за морозостійкістю. Менша морозостійкість паростків детектована у генотипу, що поєднує нуль-алель локусу *Xcfd7-5B* та алель 162 п.н. локусу *Xgwm182-5D*, кожний з яких окремо сприяє зменшенню морозостійкості та обидва походять від сорту Одеська червоноколоса. Достатньо присутності алеля сорту Лузанівка одеська по одному з локусів – або *Xcfd7-5B*, або *Xgwm182-5D* – для істотного збільшення морозостійкості ліній на 16–25 %.

М.В. Галаєва, В.І. Файт,
С.В. Чеботар, А.В. Галаєв, Ю.М. Сиволан

Plant Breeding and Genetics Institute –
National Center of Seed and Cultivar Investigations,
Odessa
E-mail: mariagall1@rambler.ru

ASSOCIATION OF MICROSATELLITE LOCI ALLELES OF THE GROUP-5 CHROMOSOMES WITH FROST RESISTANCE OF WINTER WHEAT

Analysis of frost resistance and microsatellite analysis of the group-5 chromosomes were performed on parental varieties and recombinant-inbred lines F₇ Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya. Allelic differences for *Xcfd7-5B* *Xwmc415-5B* and *Xgwm182-5D* microsatellite loci were associated with the level of frost resistance of the lines.

М.В. Галаєва, В.І. Файт,
С.В. Чеботар, А.В. Галаєв, Ю.М. Сиволан

СВЯЗЬ АЛЛЕЛЕЙ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ПЯТОЙ ГРУППЫ ХРОМОСОМ С МОРОЗОСТОЙКОСТЬЮ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Определена морозостойкость и проанализированы по микросателлитным локусам хромосом пятой группы родительские формы и рекомбинантно-инбредные линии F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая. Выявлена связь аллельных различий микросателлитных локусів *Xcfd7-5B*, *Xwmc415-5B* и *Xgwm182-5D* с уровнем морозостойкости линий.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Лыфенко С.Ф.* О некоторых закономерностях наследования морозостойкости у гибридов озимой мягкой пшеницы // Пути создания исходного материала для селекции зерновых культур. – Одесса : 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. – Київ, 2001. – 46 с.
3. *Guy C.L., Niemi K.J., Brambl R.* Altered gene expression during cold acclimation of spinach // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1985. – **82**. – P. 3673–3677.
4. *Guy C.L.* Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1990. – **41**. – P. 915–922.
5. *Thomashow M.F.* Molecular genetics of cold acclimation in higher plants // Adv. Genet. – 1990. – **28**. – P. 99–131.
6. *Thomashow M.F.* Genes induced during cold acclimation in higher plants // Advances in low-temperature biology / Ed. P.L. Steponcus. – London : JAI Press Ltd., 1993. – **2**. – P. 183–210.
7. *Thomashow M.F.* Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – **50**. – P. 571–599.
8. *Ohno R., Takumi S., Nakamura C.* Expression of a cold-responsive *Lt-Cor* gene and development of freezing tolerance during cold acclimation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Exp. Bot. – 2001. – **52**. – P. 2367–2374.
9. *Takumi S., Koike A., Nakata M. et al.* Cold-specific and light stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) *Cor* gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein // J. Exp. Bot. – 2003. – **54**. – P. 2265–2274.
10. *Ohno R., Takumi S., Nakamura C.* Kinetics of transcript and protein accumulation of a low-molecular-weight wheat LEA D-11 dehydrin in response to low temperature // J. Plant Physiol. – 2003. – **160**. – P. 193–200.
11. *Kobayashi F., Takumi S., Nakata M. et al.* Comparative study of the expression profiles of the *Cor/Lea* gene family in two wheat cultivars with contrasting levels of freezing tolerance // Physiol. Plant. – 2004. – **120**. – P. 585–594.
12. *Kobayashi F., Takumi S., Nakamura C.* Regulation of cold-responsive *Cor/Lea* genes and their transcription factors by the major freezing tolerance locus *Fr-1* in wheat // Rec. Res. Devel. Plant. Sci. – 2004. – **2**. – P. 249–266.

13. *Quellet F., Vazquez-Tello A., Sarhan F.* The wheat *wcs120* promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species // *FEBS Let.* – 1998. – **423**. – P. 324–328.
14. *Sutka J., Galiba G., Veisz O. et al.* Genetic analysis of frost resistance and its contribution to development of frost resistant cereal varieties: a review // *Plant Breed. and Seed Sci.* – 1997. – **41**, № 2. – P. 39–50.
15. *Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J. et al.* RFLP mapping of the vernalisation *Vrn 1* and frost resistance *Fr 1* genes on chromosome 5A of wheat // *Theor. and Appl. Genet.* – 1995. – **90**, № 7/8. – P. 1174–1179.
16. *Vagujfalri A., Galiba G., Cattivelli L. et al.* The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // *Mol. Genet. Genom.* – 2003. – **269**. – P. 60–67.
17. *Takumi S., Nakamura C.* Abiotic stress signal pathways associated with development of freezing tolerance after cold acclimation in common wheat // *Front. Wheat Biosci., Wheat Inf. Serv.* – 2005. – № 100. – P. 89–107.
18. *Galiba G., Vagujfalvi A., Li C. et al.* Regulatory genes involved in the determination of frost tolerance in temperate cereals // *Plant Sci.* – 2009. – **176**. – P. 12–19.
19. *Kobayashi F., Takumi S., Kume S. et al.* Regulation by *Vrn-1*/*Fr-1* chromosomal intervals of CBF-mediated *Cor*/*Lea* gene expression and freezing tolerance in common wheat // *J. Exp. Bot.* – 2005. – **56**. – P. 887–895.
20. *Knox A., Li C., Vagujfalri A. et al.* Identification of candidate of *CBF* genes for the frost tolerance locus *Fr-A^m2* in *Triticum monococcum* // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – **67**. – P. 257–270.
21. *Файт В.І.* Морозостійкість і урожайність окремих сортів озимої м'якої пшениці // *Вісн. аграр. науки.* – 2005. – **41**, № 5. – С. 18–26.
22. *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.: Вид. центр НАУ, 2006. – 36 с.
23. *Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях :* Науч.-метод. руководство / Под ред. Ю.М. Сиволапа. – К.: Аграр. наука, 1998. – 156 с.
24. *Рокицкий П.Ф.* Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
25. <http://www.wheat.pw.usda.gov>
26. *Fayt V.I., Fedorova V.R.* Influence of differences in *Ppd* genes on agronomic indicators of soft winter wheat // *Cytology and Genetics.* – 2007. – **41**, № 6. – P. 350–356.
27. *Mokanu N.V., Fayt V.I.* Differences in the effects of alleles of the genes *Vrd1* and *Ppd-D1* with respect to winter hardiness, frost tolerance and yield in winter wheat // *Cytology and Genetics.* – 2008. – **42**, № 6. – P. 384–390.

Надійшла 14.05.12