

В.И. ФАЙТ¹, И.А. БАЛАШОВА², Ю.М. СИВОЛАП²

¹Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины, Одесса
E-mail: faygen@ukr.net

²Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН Украины, Одесса
E-mail: genom2005@ukr.net

МАРКИРОВАНИЕ QTL ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТИ ПЕРИОДА ДО КОЛОШЕНИЯ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ



Исследована продолжительность периода до колошения 107 сортов озимой пшеницы различного происхождения. С целью выявления ДНК-маркеров к QTL темпов колошения методом SSR-ПЦР проанализированы наиболее контрастные по изучаемому признаку сорта и индивидуальные растения популяции F₂ Омская озимая/ Nubbi Kotigi. Выявлены два локуса, Xgwm512 и Xgwm429, которые объясняют 19,3 % (доля вклада первого составила 8,9 %, второго – 10,4 %) различий по продолжительности периода до колошения индивидуальных растений F₂ указанной популяции в полевых условиях.

© В.И. ФАЙТ, И.А. БАЛАШОВА, Ю.М. СИВОЛАП, 2011

Введение. Разнообразие озимой мягкой пшеницы по темпам колошения контролируется, как минимум, несколькими системами генов: тип развития (*Vrn*), продолжительность яровизационной потребности (*Vrd*), чувствительности к фотопериоду (*Ppd*) и скороспелости *per se* – генами *Eps* [1]. Знание генетических различий по упомянутым системам генов дает возможность манипулировать ими с целью создания адаптированных сортов к конкретным условиям выращивания. В то же время темпы колошения являются классическим количественным признаком, различия которого контролируются полигенными системами, большинство эффектов их отдельных локусов минорные и не идентифицируются качественно. Вследствие этого для общего генетического анализа темпов колошения в природных условиях целесообразно применять методы количественной генетики – диаллельный анализ [2] и идентификацию QTL [3]. Маркирование QTL наиболее вероятно, когда генетический контроль сложного количественного признака обусловлен лишь ограниченным количеством главных генов с выявляемыми эффектами. В иных случаях эффективность маркирования количественных признаков находится в обратной зависимости от степени их обусловленности факторами внешней среды и сложности организации признака [4]. Shindo et al. [5] выявили 38 маркеров QTL, ассоциированных с различиями по дате колошения. На хромосоме 5A пшеницы, помимо гена *Vrn-A1*, также идентифицирован локус темпов колошения [6], который физически картирован между точками разрыва 0,56 и 0,64 длинного плеча указанной хромосомы [7]. Этот QTL не оказывает существенного влияния на урожай и его компоненты, но существенно сокращает продолжительность периода до колошения [8], что может быть использовано при селекции скороспелых высокопродуктивных сортов. Еще один QTL, контролирующий 7–15 % различий по продолжительности периода до колошения, идентифицирован по сцеплению с локусами *Xfbb324-7B* и *Xfbb53-7B* на хромосоме 7BS [9]. QTL, ассоциированные с темпами колошения, были также идентифицированы на хромосомах 1A, 2A, 2B, 6D, 7A [10].

Цель настоящей работы – выявление QTL темпов колошения озимой пшеницы в природных условиях.

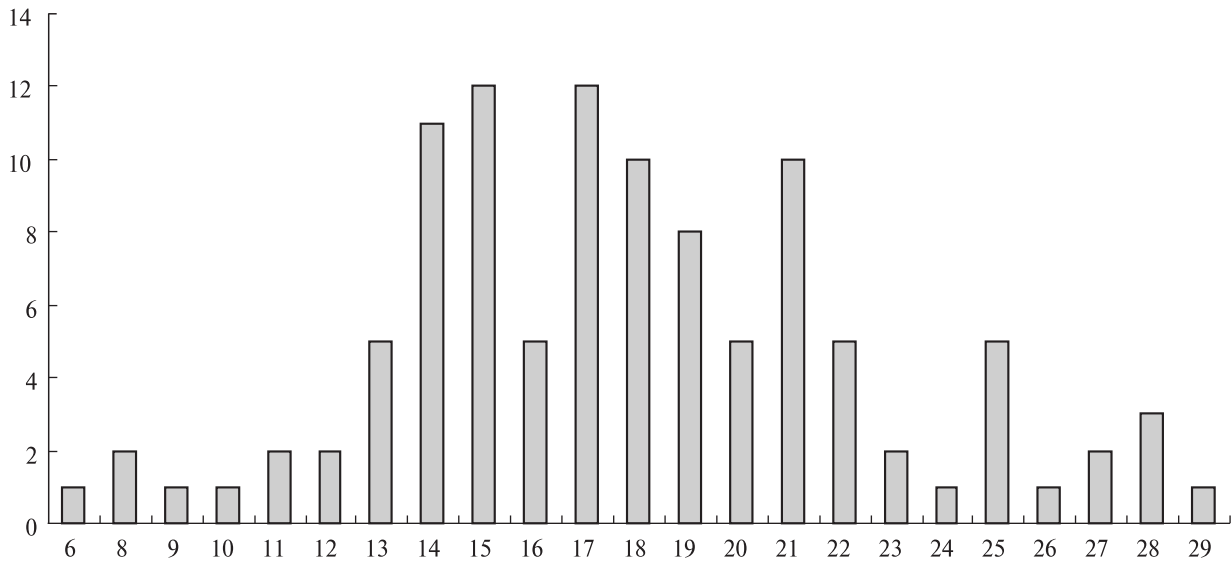


Рис. 1. Распределение сортов озимой пшеницы по продолжительности периода до колошения (отчет от 1 мая) (по горизонтали, сут), Одесса, 2001/2002 гг.; по вертикали – количество сортов, шт.

Материалы и методы. Исследовали набор сортов озимой мягкой пшеницы различного географического происхождения и индивидуальные растения F_2 популяции от скрещивания контрастных по продолжительности периода до колошения сортов Numbu Komugi/Омская озимая. Были изучены 70 сортов Селекционно-генетического института разных лет создания, 6 сортов из других селекционных учреждений Украины, 23 сорта из различных регионов России (Поволжье – 6, Северный Кавказ – 9, Сибирь – 8), а также 8 сортов зарубежной селекции (Западная Европа, Австралия, Япония).

Семена изучаемых сортов высевали осенью 2000, 2001, 2004 гг. (9, 3 и 16 октября соответственно) на делянках 3 м^2 по 500 всхожих зерен на 1 м^2 (опытный участок отдела генетики СГИ). Повторность опыта трехкратная. Семена индивидуальных растений F_2 популяции и родительских форм высевали осенью 2005 г. (5 октября) ручной сажалкой на однорядковых делянках длиной 1,25 м по 25 зерен на рядок с площадью питания $30 \times 5 \text{ см}^2$. Весной после зимовки отмечали дату колошения. У сортов даты устанавливали при выколашивании 75 % растений на делянке, а у гибридов F_2 и родительских форм дату колошения определяли для каждого индивидуального растения путем навешивания пергаментных этикеток на сте-

бель главного побега при появлении колоса над лигулой флагового листа. Статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам [11].

Высокомолекулярную ДНК выделяли из пятидневных этиолированных проростков и листьев растений по методике, разработанной Сиволапом с соавт. [12]. Реакцию амплификации проводили методом SSR-ПЦР на приборе «Термоциклер СМ2» при следующих режимах: денатурация ДНК при $93 \text{ }^\circ\text{C}$ – 1 мин, элонгация при $72 \text{ }^\circ\text{C}$ – 40 с (конечная элонгация в течение 3 мин), температура отжига $55 \text{ }^\circ\text{C}$. Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала буфер, в состав которого входили 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl pH 8,4, 2 мМ MgCl, 0,01 % твин 20, 0,2 мкМ каждого dNTP («Ферментас», Литва), 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК, 1 ед. Taq-полимеразы. Продукты реакции амплификации фракционировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле и 10%-ном ПААГ. Электрофорез в ПААГ проводили при напряжении 500 В. Гели окрашивали серебром согласно Silver sequence TMDNA Sequencing System Technical Manual («Promega», США). Электрофорез в агарозном геле осуществляли при напряжении 120 В, визуализацию продуктов ДНК в ультрафиолете – с помощью окрашивания гелей бромистым этидием (10 мкг/мл).

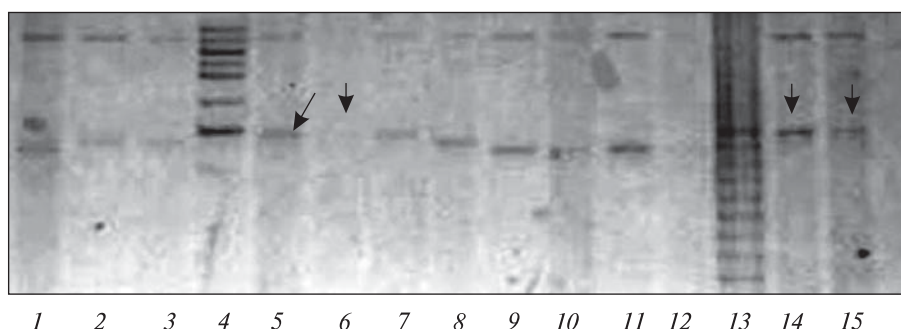


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов амплификации SSR-ПЦП с праймерами к локусу *Xgwm429-2B* ДНК сортов озимой пшеницы: 1 – Прогресс; 2 – Червона; 3 – Порада; 4 – маркер D19S253; 5 – Numbu Komugi; 6 – Norin 1; 7 – Triple Dirk; 8 – Омская озимая; 9 – Ольвия; 10 – Обрий; 11 – Спартанка; 12 – Федоровка; 13 – маркер CSF1PO; 14 – Triple Dirk; 15 – Мироновская 808/*Ppd-B1a* (стрелкой отмечены фрагменты 212 п.н.)

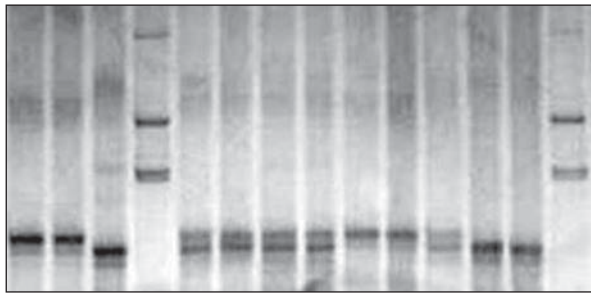
Окрашенные гели фотографировали цифровой видеокамерой с последующим перенесением изображения на компьютер. Для документации результатов использовали систему Image Master VDS («Amersham Pharmacia Biotech», Австрия). Величины амплифицированных фрагментов определяли с помощью программы Image Master 1D Elite v 3.1. Калибровку молекулярной массы проводили при использовании стандартов pGEM и pUC19/MspI.

Результаты исследований и их обсуждение. Колошение сортов независимо от года изучения отмечали в среднем по опыту в одни и те же сроки – 17–18 мая (табл. 1). Отмечена тенденция к более раннему колошению в 2001 г. и к более позднему в 2005 г. Большое разнообразие по изучаемому признаку выявлено в 2001 г. (рис. 1), меньшее – в 2005 г., что нашло отражение и в размахе варьирования признака (23 и 13 сут соответственно). Взаимосвязь продолжительности периода до колошения в разные годы составляла от $r = +0,83$ до $r = +0,97$. Более широкое разнообразие по исследуемому признаку выявлено в наборе сортов СГИ, что обусловлено, вероятно, большим количеством представленных сортов разных периодов селекции (1912–2002 гг.). Более раннее колошение отмечали у сортов Знахидка одесская (11 мая), Никония и Червона (оба 13 мая), а более позднее – у сортов Одесская 26 (21 мая), Буревестник одесский (22 мая), Одесская 16 (23 мая). Основная масса сортов СГИ (52 образца из 70 изученных) выколашивались 15–19 мая. Колошение сортов других регионов Украины (Мироновка, Харьков, До-

нецк) и южных регионов России (Зерноград, Краснодар) отмечали в сроки, характерные для сортов СГИ (11–21 мая). Колошение сортов Поволжья и Сибири, за редким исключением (Омская 2, Сибирская нива), наблюдали 19 (Омская 4) – 25 мая (Альбидум 12, Омская озимая). Имеющиеся в наличии сорта Западной Европы колосились 18–25 мая. В то же время японский сорт Numbu Komugi и австралийская линия Triple Dirk С колосились довольно рано (9 и 13 мая соответственно). В среднем за три года более раннее колошение отмечали у сортов Numbu Komugi, Знахидка одесская (10 мая), Донская полуинтенсивная и Скороспелка 3б (оба 11 мая). Более поздно колосились Альбидум 12, Гостианум 237, Омская озимая, Herzog, Vakka (все 25 мая) и Л-326 (26 мая). Наличие существенных различий ($НСР_{0,05} = 1$ сут) по продолжительности периода до колошения предоставляет возможность использования указанных контрастных по

Таблица 1
Основные статистики продолжительности периода до колошения (отсчет от 1 мая) набора сортов озимой пшеницы в разные годы

Статистика	2001 г.	2002 г.	2005 г.	Среднее
\bar{x}	17,8	18,0	18,3	18,0
S_x	0,44	0,33	0,24	0,33
max	29	25	25	26
min	6	9	12	9
σ	4,6	3,4	2,5	3,4
CV, %	25,8	18,9	13,7	18,9



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов амплификации SSR-ПЦР ДНК индивидуальных растений F₂ популяции Омская озимая/Numbu Komugi по локусу *Xgwm429-2B*: 1, 2 – гомозиготы по аллелю 212 п.н. от Numbu Komugi; 3, 12, 13 – гомозиготы по аллелю 208 п.н. от Омская озимая; 5–11 – гетерозиготы по аллелям 208/212 (Омская озимая/Numbu Komugi); 4, 14 – маркер Puc/Msp1

продолжительности периода до колошения сортов для поиска QTL по этому признаку. Указанные 10 сортов, а также ряд других были отобраны для проведения анализа молекулярно-генетического полиморфизма ДНК методом ПЦР-анализа, который проводили по 25 микросателлитным локусам, преимущественно локализованным в хромосомах I, II и V гомеологичных групп. По ряду локусов детектирован полиморфизм у контрастных по срокам колошения генотипов (рис. 2), которые в дальнейшем рассматривались как потенциальные маркеры к QTL темпов колошения.

Для определения сцепления выявленных полиморфных локусов с различиями по продолжительности периода до колошения использовали индивидуальные растения F₂ популяции от скрещивания скороспелого сорта японского

происхождения Numbu Komugi и позднеспелого сорта селекции СИБНИИСХа (РФ) Омская озимая. Выбор указанной комбинации скрещивания основывался на том, что родительские сорта наиболее полно изучены по генетическим системам типа и темпов развития. Семена F₂ и родительских форм были высеяны осенью 2005 г. для изучения в 2006 г продолжительности периода до колошения индивидуальных растений и его сопоставления с полиморфизмом ДНК родительских форм. Колошение сортов Numbu Komugi и Омская озимая в условиях 2006 г. наблюдали через 22 ± 0,7 и 39 ± 0,6 сут соответственно (отсчет от 1 мая). Колошение индивидуальных растений F₂ популяции отмечали в указанных границах, трансгрессий не выявлено. Следовательно сорт Numbu Komugi в такой комбинации скрещивания является до-

Таблица 2
Соотношение расщепления по аллелям микросателлитных локусов *Xgwm429-2B*, *Xgwm512-2AS* и *Xbarc17-1A* индивидуальных растений F₂ популяции Омская озимая/Numbu Komugi

Генотипы	Теоретически ожидаемое	Фактически получено		
		<i>Xgwm429-2B</i>	<i>Xgwm512-2AS</i>	<i>Xbarc17-1A</i>
Доминантные гомозиготы (Numbu Komugi)	34,5	33	39	31
Гетерозиготы (Numbu Komugi/Омская озимая)	69	70	63	42
Рецессивные гомозиготы (Омская озимая)	34,5	32	34	64
$\chi^2_{1:2:1}$		0,26	1,12	36,4

Таблица 3
Продолжительность периода до колошения альтернативных по аллелям локусов *Xgwm429*, *Xgwm512* и *Xbarc17-1A* классов растений F₂ популяции Омская озимая/Numbu Komugi (Одесса, 2005/2006 гг.)

Микросателлитный локус	Присутствие аллеля от родительской формы		$D \pm S_d$	Проц. от общего
	Numbu Komugi	Омская озимая		
<i>Xgwm 429-2B</i>	<i>Xgwm 429-2B</i>	<i>Xgwm 429-2B</i>	<i>Xgwm 429-2B</i>	<i>Xgwm 429-2B</i>
<i>Xgwm512-2AS</i>	<i>Xgwm512-2AS</i>	<i>Xgwm512-2AS</i>	<i>Xgwm512-2AS</i>	<i>Xgwm512-2AS</i>
<i>Xbarc17-1A</i>	<i>Xbarc17-1A</i>	<i>Xbarc17-1A</i>	<i>Xbarc17-1A</i>	<i>Xbarc17-1A</i>

* Достоверно при P = 0,05.

нором аллелей генов, сокращающих продолжительность периода до колошения, а сорт Омская озимая выступает в качестве донора аллелей, увеличивающих ее. Размах варьирования по продолжительности периода до колошения индивидуальных растений сорта Numbu Komugi составлял 10 сут ($\sigma^2 = 7,46$) и 8 сут сорта Омская озимая ($\sigma^2 = 6,1$). Размах варьирования индивидуальных растений F_2 популяции был существенно большим ($\sigma^2 = 27,8$) и превышал аналогичный показатель родительских форм в 3,7–4,6 раза, достигая 26 сут, что позволяет утверждать о перспективности использования указанной F_2 популяции для поиска QTL темпов колошения.

У родительских сортов Numbu Komugi и Омская озимая детектируются различия по аллельному состоянию микросателлитных локусов, в частности, *Xgwm429-2B*, *Xgwm512-2AS* и *Xbarc17-1A*. Полиморфизм по локусу *Xgwm429-2B* заключался в наличии на электрофореграмме сорта Numbu Komugi фрагмента ДНК длиной 212 п.н., а у сорта Омская озимая – 208 п.н., по локусу *Xgwm512-2AS* – 223 и 219 п.н. у Numbu Komugi и Омская озимой соответственно. По локусу *Xbarc17-1A* у растений сорта Numbu Komugi выявлен аллель длиной 155 п.н., а у сорта Омская озимая – 141 п.н. Индивидуальные растения F_2 популяции (138 шт.), полученной от скрещивания указанных двух сортов, по наличию или отсутствию того или иного фрагмента ДНК при использовании праймеров к локусам *Xgwm429-2B*, *Xgwm512-2AS* и *Xbarc17-1A* в силу кодоминантного характера наследования продуктов SSR-ПЦР могут быть разделены на три класса (рис. 3). Первый класс – растения, у которых присутствует аллель соответствующего локуса от Numbu Komugi (условно доминантный). Ко второму классу могут быть отнесены растения, имеющие аллель соответствующего локуса Омской озимой (условно рецессивный). Третий класс – растения, у которых присутствовали аллели соответствующего локуса обоих родителей (гетерозигота). Теоретически при наличии двух аллелей одного локуса и отсутствии селективного предпочтения в F_2 должно наблюдаться расщепление в отношении 1 растение с аллелем Numbu Komugi, 2 растения – с аллелями обоих родителей и 1 растение – с аллелем Омской озимой. Фактически полученное рас-

щепление по локусам *Xgwm429-2B* и *Xgwm512* соответствует теоретически ожидаемому отношению. Критерий χ^2 равен 0,26 и 1,12 соответственно по локусу *Xgwm429-2B* и *Xgwm512-2AS* при $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$ (табл. 2). Расщепление же по локусу *Xbarc17-1A* не соответствовало теоретически ожидаемому. Критерий $\chi^2 = 36,4$, что значительно выше $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$. Такое отклонение может быть обусловлено как случайными причинами, так и возможным расположением локуса на конце группы сцепления [13].

Аллельные различия по локусам *Xgwm429-2B* и *Xgwm512-2AS* связаны с различиями соответствующих классов растений по продолжительности периода до колошения (табл. 3). По каждому из локусов класс растений с присутствием аллеля Numbu Komugi характеризовался достоверно меньшей продолжительностью периода до колошения по сравнению с соответствующим классом растений с аллелем Омской озимой.

Различия по продолжительности периода до колошения между классами растений с аллелем от Numbu Komugi, с одной стороны, и аллелем от Омской озимой, с другой, составляли по локусу *Xgwm429-2B* 2,3 сут, что при 26 сут различий F_2 популяции составляет 8,9 % общего разнообразия по изученному признаку. Различия по локусу *Xgwm512-2AS* составляли 2,7 сут и объясняли 10,4 % разнообразия по продолжительности периода до колошения в приведенной комбинации скрещивания. Различия по продолжительности периода до колошения альтернативных по аллелям локуса *Xbarc17-1A* групп растений были недостоверными.

Выводы. SSR-анализ ДНК индивидуальных растений F_2 популяции Омская озимая/ Numbu Komugi и родительских сортов, различающихся по продолжительности периода до колошения, выявил на хромосомах 2A и 2B два QTL (*Xgwm512* и *Xgwm429* соответственно), ответственных за различия по продолжительности периода до колошения. Указанные два QTL объясняют 19,3 % различий по продолжительности периода до колошения. Доля вклада каждого в общий показатель составляет от 8,9 до 10,4 %. Локусы *Xgwm512* и *Xgwm429* можно рекомендовать в качестве маркеров для отбора

более рано колосящихся генотипов на первых этапах селекции.

V.I. Fayt, I.A. Balashova, Yu.M. Sivolap

QTL MARKING OF DURATION OF THE PERIOD UP TO WINTER WHEAT HEADING

Duration of the period up to heading of 107 winter wheat cultivars of different origin has been studied. The most contrast for analyzed character cultivars, as well as F₂ Omskaya ozimaya / Numbu Komugi individual plants were investigated with SSR-PCR methods to reveal DNA-markers for QTL of heading temps. Two loci *Xgwm512* and *Xgwm429* have been revealed to explain 19,3 % (part of influence of the first locus – 8,9 %, of the second – 10,4 %) differences in duration of the period up to heading of the F₂ individuals in field conditions.

В.И. Файт, И.А. Балашова, Ю.М. Сиволап

МАРКУВАННЯ QTL ТРИВАЛОСТІ ПЕРІОДУ ДО КОЛОСІННЯ ОЗИМОЇ ПШЕНИЦІ

Досліджено тривалість періоду до колосіння 107 сортів озимої пшениці різного походження. З метою виявлення ДНК-маркерів до QTL темпів колосіння методом SSR-ПЦР проаналізовано контрастні за цією ознакою сорти та індивідуальні рослини популяції F₂ Омська озима/Numbu Komugi. Виявлено два локуси *Xgwm512* та *Xgwm429*, що пояснюють 19,3 % (частка першого 8,9 %, другого – 10,4 %) різноманітності за тривалістю періоду до колосіння індивідуальних рослин F₂ вказаної популяції в природних умовах.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Стельмах А.Ф., Файт В.И., Мартынюк В.Р. Генетические системы типа и скорости развития мягкой пшеницы // Цитология и генетика. – 2000. – 34, № 2. – С. 39–45.
2. Герасименко В.Ф. Генетический анализ количественных признаков в связи со взаимодействием генотип – среда у озимых тритикале и пшеницы: Дис. ... д-ра биол. наук. – Одесса, 2006. – 317 с.
3. Hanocq E., Niarquin M., Heumez E. et al. Detection and mapping of QTL for earliness components in a bread wheat recombinant inbred lines population //

Theor. Appl. Genet. – 2004. – 110, № 1. – P. 106–115.

4. Созинов А.А., Глазко В.И. Современные технологии в решении традиционных вопросов генетики и селекции // Цитология и генетика. – 1999. – 33, № 6. – С. 53–75.
5. Shindo C., Tsujimoto H., Sasakuma T. Segregation analysis of heading traits in hexaploid wheat utilizing recombinant inbred lines // Heredity. – 2003. – 90, № 1. – P. 56–63.
6. Kato K., Miura H., Sawada S. Detection of an earliness *per se* quantitative trait locus in the proximal region of wheat chromosome 5AL // Plant Breed. – 1999. – 118, № 5. – P. 391–394.
7. Sarma R.N., Gill B.S., Sasaki T. et al. Comparative mapping of the wheat chromosome 5A *Vrn-1* region with rice and its relationship to QTL for flowering time // Theor. Appl. Genet. – 1998. – 97, № 1/2. – P. 103–109.
8. Kato K., Miura H., Sawada S. Characterization of *QEet.ocs-5A.1*, a quantitative trait locus for ear emergence time on wheat chromosome 5AL // Plant Breed. – 2002. – 121, № 5. – P. 389–393.
9. Sourdille P., Snape J.W., Cadalen T. et al. Detection of QTLs for heading time and photoperiod response in wheat using a doubled-haploid population // Genome. – 2000. – 43. – P. 487–494.
10. Kuchel H., Hollamby G., Langridge P. et al. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat // Theor. Appl. Genet. – 2006. – 111, № 6. – P. 1103–1112.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
12. Сиволап Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика. – 1994. – 28, № 6. – С. 54–61.
13. Kamholz S.J., Campbell A.W., Sutherland M.W. et al. Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations // Aust. J. Agric. Res. – 2001. – 52. – P. 1079–1088.

Поступила 28.10.10