

---

---

## **ГЕНЕТИКА, СЕЛЕКЦІЯ І БІОТЕХНОЛОГІЯ**

---

---

УДК 577.2:58.036.5:633.11

### **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОФОНДУ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ ЗА АЛЕЛЯМИ АСОЦІЙОВАНОГО З МОРОЗОСТІЙКІСТЮ МІКРОСАТЕЛІТНОГО ЛОКУСУ *Xcfd7-5B***

© 2013 р. **М. В. Галаєва, В. І. Файт, Ю. М. Сиволап**

*Селекційно-генетичний інститут –  
Національний центр насіннізнавства та сортовивчення  
Національної академії аграрних наук України  
(Одеса, Україна)*

Ідентифіковано за алелями локусу *Xcfd7-5B* генотипи 163 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження. Виявлено два алельних варіанти локусу: алель розміром 194 п.н. та null-алель (відсутність продукту ампліфікації). У загальному наборі та в наборах сортів окремих регіонів частота null-алелю істотно перевищувала частоту алелю 194 п.н. Перевага null-алелю серед сортів всіх регіонів свідчить про його селекційну та адаптивну цінність.

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

За роки селекції пшениці м'якої озимої (*Triticum aestivum L.*) в Україні значно збільшено генетичний потенціал врожайності та підвищено хлібопекарські якості сортів (Литвиненко, 2012; Лифенко та ін., 2012). Проте за показником високої морозо-, зимостійкості досі неперевершеним як у вітчизняній, так і в закордонній селекції залишається сорт Одеська 16, що був створений у 1946 році (Литвиненко, 2012). Проблема створення сортів з високим рівнем морозостійкості залишається актуальною для всіх регіонів України (Литвиненко, 2010; Кочмарський, 2011; Шевченко, 2012). В умовах глобальних змін клімату можливе посилення контрастності за кліматичними умовами між окремими зонами, роками та періодами року. Наприклад, роки з теплими зимами можуть змінюватися роками з екстремально низькими температурами, а несприятливі умови зимівлі можуть поєднуватись з весняно-літньою посухою (Комобакін, 2008). Тому завдання ство-

рення морозо-зимостійких генотипів залишаються першочерговими (Литвиненко, 2010).

Залучення молекулярно-генетичних методів допомагає ефективно ідентифікувати та добирати в процесі селекції генотипи з необхідними генами. З використанням зазначених методів можна виявити специфічні фрагменти ДНК, що тісно зчеплені з певними генами морозостійкості. За допомогою молекулярних маркерів (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів або полімеразна ланцюгова реакція – ПАР) на довгих плечах хромосом п'ятої гомеологічної групи локалізовано головні гени морозостійкості, зокрема, гени *Fr-A1* та *Fr-A2* на хромосомі 5A, *Fr-B1* – на 5B та *Fr-D1* – на 5D (Galiba et al., 1995; Snape et al., 1997; Toth et al., 2003; Vaguifalvi et al., 2003). В наших попередніх дослідженнях був виявлений істотний зв'язок алельних відмінностей за локусом *Xcfd7-5B*, що локалізований на довгому плечі хромосоми 5B, з морозостійкістю рекомбінантно-інбредних ліній озимої м'якої пшениці Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса (Галаєва та ін, 2013).

---

*Адреса для кореспонденції:* Галаєва Марія Вячеславівна, Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннізнавства та сортовивчення, Овідіопольська дорога, 3, Одеса, 65036, Україна;  
e-mail: mariagal1@rambler.ru

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОФОНДУ ПШЕНИЦІ

Мета даної роботи – ідентифікація генотипів сортів пшениці м'якої озимої різних регіонів за локусом *Xcfd7-5B*, що пов'язаний з морозостійкістю.

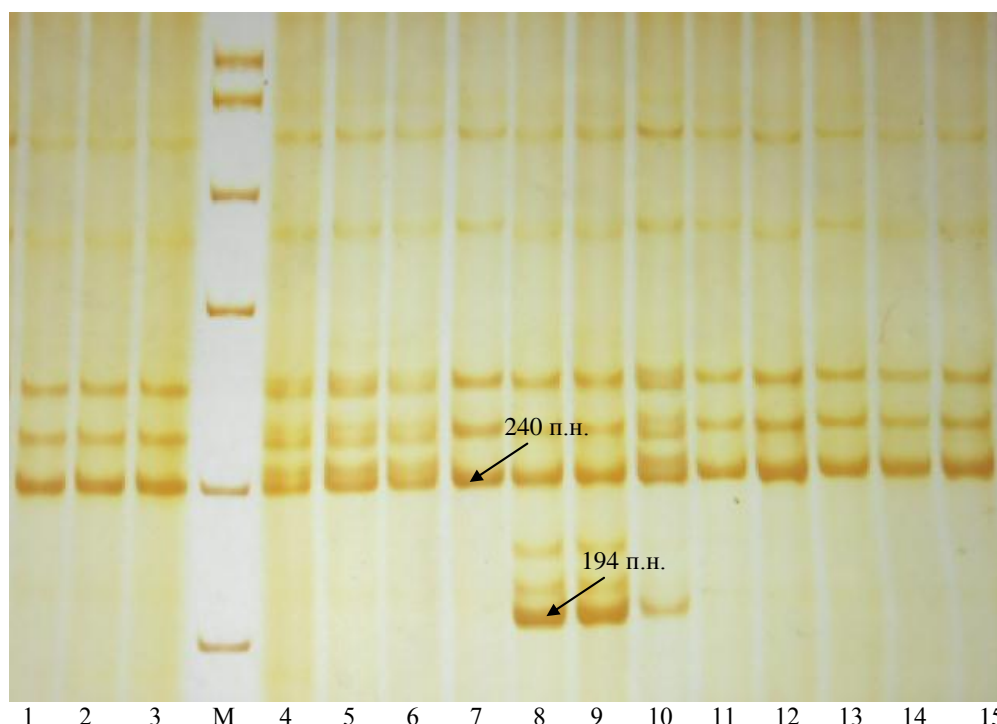
### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень слугували 163 сорти пшениці м'якої озимої, що були створені в різних регіонах України та Росії, з робочих колекцій відділів генетики і геноміки та біотехнології Селекційно-генетичного інституту – НЦНС. Серед досліджених генотипів 135 сортів різних селекційних центрів України та 28 сортів російської селекції.

ДНК виділяли із зелених листків та 3-5-денних проростків за допомогою СТАВ-буфера (Использование, 1998). 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 мМ трис-НСІ рН 8,8; 16,6 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01 % Tween-20); 0,2 мМ кожного dNTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 од.

Тaq-полімерази. На поверхню реакційного розчину нашаровували по 30 мкл мінеральної олії. Умови реакції: денатурація при 94°C протягом 30 с (початкова – 2 хв), відпалювання при 60°C – 30 с, елонгація при 72°C – 1 хв (заклучна елонгація – 4 хв).

Продукти ампліфікації (10 мкл аліквоту ПЛР-суміші) фракціонували у 2 % агарозному гелі та 12 % поліакриламідному гелі у 1xTBE. Електрофорез в поліакриламідному гелі проводили за постійної напруги 500 V в апараті для вертикального гель-електрофорезу «Hoefer Scientific Instruments» (США). Візуалізацію продуктів електрофоретичного розподілу проводили імпрегнуванням гелів нітратом 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 фрагментів отримували за допомогою відео системи «Image Master VDS» ("Amersham Pharmacia Biotech", США) згідно з інструкцією користувача устаткування. Калібрування молекулярної маси отриманих ампліконів здійснювали з використанням стан-



**Рис. 1.** Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК сортів пшениці озимої з парою праймерів *Cfd7*.

М – маркер молекулярної маси pUC19/MspI; 1 – Антонівка, 2 – Служниця одеська, 3 – Косовиця, 4 – Турунчук, 5 – Альбатрос одеський, 6 – Казанська 237, 7 – Одеська червоноколоса, 8 - Лузанівка одеська, 9 – Литанівка, 10 – Миронівська 264, 11 – Миронівська 808, 12 – Селянка, 13 – Сирена одеська, 14 – Омська 2, Омська 3.

дарту pUC 19/MspI та 100 bp DNA Ladder.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методиками (Рокицкий, 1973).

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Пара праймерів Cfd7 детектує два MC-локуси *Xcfd7-5B* та *Xcfd7-5D*, що розташовані у довгих плечах хромосом 5B та 5D відповідно. Генотипи досліджених 163 сортів за локусом *Xcfd7-5D* були ідентичними. В усіх зразків виявлено фрагмент розміром 240 п.н. цього локусу. За локусом *Xcfd7-5B* у сортів вивченого на-

бору виявлено два алельні варіанти (рисунок): алель розміром 194 п.н. та так званий null-алель (відсутність продукту ампліфікації). Більша частина сортів (85,9%) були лінійними. 63,2 % сортів мали генотип з null-алелем локусу *Xcfd7-5B*, а 22,7% – генотип з алелем 194 п.н. (табл. 1). Разом з тим 14,1% сортів були неоднорідні і склалися з двох генотипів за алелями дослідженого мікросателітного локусу з різним співвідношенням часток генотипів. Таким чином, всі досліджені сорти можна розподілити на три групи, дві групи характеризуються наявністю одного з двох варіантів алеля локусу *Xcfd7-5B*, а одна група складається з неоднорідних сортів

Таблиця 1. Генотипи сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження за алелями локусу *Xcfd7-5B*

Група	Алель	n	p±s <sub>p</sub> , %	Сорт
1	194 п.н.	37	22,7±3,3	Альбідум 114, Безоста 1, Білоцерківська 198, Богдана, Бриз, Буревісник одеський, Вимпел одеський, Гостіанум 237, Диканька, Донецька 48, Елегія, Еритроспермум 127, Еритроспермум 15, Застава одеська, Зірка, Золотава, Іванівська остиста, Кооператорка, Литанівка, Лузанівка одеська, Миронівська 264, Одеська 16, Одеська 162, Одеська 117, Одеська 120, Одеська 26, Одеська 66, Одом, Омська 4, Повага, Прогрес, Спартанка, Українка, Фаворитка, Федорівка, Хуртовина, Червона
2	null	103	63,2±3,8	Аврора, Альбатрос одеський, Антонівка, Апогей Луганський, Банатка, Білоцерківська напівкарликова, Білосніжка, Білява, Бригантіна, Бунчук, Ватажок, Вдала, Веснянка, Вихованка одеська, Вікторія одеська, Володарка, Дарунок, Донецька напівкарликова, Донсимб, Донський сюрприз, Експромт, Епоха одеська, Ера, Жайвір, Заможність, Землячка одеська, Злагода, Знахідка одеська, Золотоголоса, Іллічівка, Кавказ, Казанська 237, Казанська 285, Київська 8, Косовиця, Краснодарська 99, Красуня одеська, Куяльник, Лада одеська, Лан, Лановий, Леля, Либідь, Ліона, Лісостепка 75, Любава одеська, Лютесценс 17, Миронівська 65, Миронівська остиста, Миронівська ювілейна, Миронівська 27, Миронівська 808, Мирхард, Нагорода одеська, Наснага, Небокрай, Ніконія, Обрій, Одеська 265, Одеська 266, Одеська 267, Одеська червоноколоса, Одеська напівкарликова, Оксана, Ольвія, Омська 2, Омська 3, Омська 5, Отаман, Панна, Победа 50, Подяка, Польовик, Порада, Пошана, Прима одеська, Прометей, Селянка, Північна зоря, Сибірська нива, Символ одеський, Сирена одеська, Скіф'янка, Скороспілка 36, Служниця одеська, Смуглянка, Станична, Струмок, Супутниця, Тіра, Турунчук, Ульянівка, Фантазія одеська, Фрегат одеський, Харківська 105, Харківська 96, Хвиля, Чайка, Шестопалівка, Юна, Юннат одеський, Якір одеський, Ятрань 60
3	194 п.н.+ null*	23	14,1±2,7	Альбідум 12 (0,6:0,4)**, Багратионівська (0,5:0,5), Батько (0,2:0,8), Благодарка одеська (0,2:0,8), Віген (0,5:0,5), Дюк (0,5:0,5), Земка (0,5:0,5), Киянка (0,5:0,5), Кірія (0,5:0,5), Кримка місцева (0,2:0,8), Міріч (0,7:0,3), Місія одеська (0,7:0,3), Одеська 130 (0,5:0,5), Одеська 51 (0,5:0,5), Омська озима (0,5:0,5), Пересвіт (0,5:0,5), Писанка (0,5:0,5), Південна зоря (0,5:0,5), Подолянка (0,5:0,5), Прибій (0,2:0,8), Прокоф'євка (0,5:0,5), Степова (0,5:0,5), Ювілейна 75 (0,5:0,5)
		163	100,0	

Примітки: \* – в сорті наявні два генотипи з різним співвідношенням часток генотипів (неоднорідні сорти); \*\* – співвідношення часток генотипів у конкретного сорту; 0,6 – частка генотипу 194 п.н., 0,4 – частка генотипу з null-алелем.

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОФОНДУ ПШЕНИЦІ

**Таблиця 2. Частоти алелів локусу *Xcfd7-5B* у загальному наборі сортів і наборах сортів різних регіонів України та Росії**

Алель, п.н.	Загальний набір		Південь України		Північ України		Західний Сибір, Поволжя		Північний Кавказ	
	n	p±S <sub>p</sub> , %	n	p±S <sub>p</sub> , %	n	p±S <sub>p</sub> , %	n	p±S <sub>p</sub> , %	n	p±S <sub>p</sub> , %
194	47,8	29,3±3,6	28,3	28,6±4,5	8,7	32,2±9,0	4,6	32,9±12,6	2,2	16,9±10,4
null	115,2	70,7±3,6	70,7	71,4±4,5	18,3	67,8±9,0	9,4	67,1±12,6	10,8	83,1±10,4
Всього	163,0	100,0	99,0	100,0	27,0	100,0	14,0	100,0	13,0	100,0

**Таблиця 3. Частоти алелів локусу *Xcfd7-5B* в наборі сортів Півдня України, районуваних або занесених до Реєстру до (перша група) та після (друга група) 1996 року**

Алель	Перша група		Друга група	
	n	p±S <sub>p</sub> , %	n	p±S <sub>p</sub> , %
194 п.н.	21,4	49,8±7,6	6,7	12,0±4,3
null	21,6	50,2±7,6	49,3	88,0±4,3
Всього	43,0	100,0	56,0	100,0

з різним співвідношенням обох алелів вищезазначеного локусу.

В попередніх дослідженнях (Галаєва та ін., 2013) показано наявність зв'язку рівня морозостійкості рекомбінантно-інбредних ліній Лузанівка одеська/Одеська червоноколоса від присутності або відсутності в їх генотипі певного алелю локусу *Xcfd7-5B*. Вищим рівнем морозостійкості проростків характеризувались лінії з присутністю в генотипі алелю 194 п.н. від сорту Лузанівка одеська порівняно з такими, що мали null-алель від сорту Одеська червоноколоса. В той же час при проморожуванні рослин у фазі кушіння спостерігали протилежну закономірність, морозостійкість ліній з присутністю в генотипі null-алелю локусу *Xcfd7-5B* була вище такої ліній-носіїв алелю 194 п.н. Тобто була виявлена зміна рангів генотипів-носіїв альтернативних алелів локусу *Xcfd7-5B* при проморожуванні різновікових рослин (паростки, фаза кушіння).

Для високоморозостійких сортів різних регіонів притаманні генотипи як з присутністю null-алелю локусу *Xcfd7-5B* (Миронівська 808, Ульяновка), так і алелю 194 п.н. (Одеська 16, Альбідум 114), а деякі з подібних сортів (Багратионівська) склалися з обох цих генотипів, тобто були неоднорідними. Доцільним було дослідити, як змінювались частоти алелів локусу *Xcfd7-5B* залежно від регіону створення сортів.

Частота алелю локусу *Xcfd7-5B* розміром 194 п.н. в загальному наборі сортів складала 29,3%, що майже в 2,5 рази менше такої null-алелю (табл. 2). Остання дорівнювала 70,7%. Аналогічне співвідношення частот двох вказаних алелів зберігалося і в наборах сортів різних

регіонів України та Росії. Частота null-алелю істотно перевищувала (при  $p = 0,01$ ) частоту алелю 194 п.н. Разом з тим, відносні відмінності частот в різних регіонах дещо змінювались від 35,6±12,73% в наборі сортів Півночі України до 66,2±14,71 у сортів Північного Кавказу. Переважне розповсюдження null-алелю локусу *Xcfd7-5B* серед сортів озимої пшениці України та Росії може свідчити про його селекційну та/або адаптивну цінність для умов зазначених регіонів.

Частота алелю 194 п.н. була майже однаковою в наборі сортів Півдня (28,6 %) та Півночі України (32,2 %) і Західного Сибіру та Поволжя (32,9 %) і дещо перевищувала таку в наборі сортів Північного Кавказу (16,9 %). Проте відмінності частот алелю 194 п.н. між наборами сортів всіх чотирьох регіонів виявилися не істотними. Відповідно, не виявлено істотних відмінностей й при порівнянні частот null-алелю в наборах сортів з різних регіонів України та Росії.

У загальному наборі досліджених сортів значну частку складають сорти Півдня України (99 зразків), переважно це сорти Селекційно-генетичного інституту – Національного центру насіннезнавства та сортовивчення (м. Одеса), які представлені від перших сортів-популяцій, що вирощувались на території України на початку ХХ сторіччя, і до сучасних сортів. Такий набір сортів є цікавим модельним об'єктом для дослідження змін частот алелів локусу *Xcfd7-5B* в процесі селекції залежно від років районування або внесення в Реєстр сортів рослин придатних для поширення в Україні (табл. 3). У наборі сортів, що районувани або занесені до Реєстру до 1996 року, відмінності між частота-

ми алелів локусу *Xcfd7-5B* виявилися неістотними. Частота алелю 194 п.н. складала  $49,8 \pm 7,6\%$ , а null-алелю -  $50,2 \pm 7,6\%$ . В той же час в наборі сортів, що були занесені до Реєстру після 1996 й до 2012 року, частота null-алелю локусу *Xcfd7-5B* збільшилась на 37,8% порівняно з такою в наборі сортів, що районовані або занесені до Реєстру до 1996 року, та, відповідно, зменшилась частота алелю 194 п.н. Частота останнього складає лише 12%, що на 76% менше частоти null-алелю (відмінності достовірні,  $p < 0,01$ ). Таким чином, селекційний процес на Півдні України останнім часом йшов у напрямі добору генотипів з null-алелем локусу *Xcfd7-5B*, що також може свідчити про адаптивну цінність зазначеного алелю при зміні клімату в умовах глобального потепління.

Таким чином, ідентифіковано генотипи за алелями локусу *Xcfd7-5B* 163 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження. Виявлено два алельних варіанти локусу: алель розміром 194 п.н. та так званий null-алель (відсутність продукту ампліфікації). В загальному наборі та в наборах сортів окремих регіонів (Південь України, Північ України, Західний Сибір і Поволжя та Північний Кавказ) частота null-алелю істотно перевищувала частоту алелю 194 п.н. за відсутності відмінностей між регіонами по частотам кожного з алелів. На Півдні України в процесі селекції встановлено суттєве зростання частоти null-алелю до 88% в наборі сортів, що занесені до Реєстру після 1996 року, при відсутності істотних відмінностей між алелями в наборі сортів, створених з 1912 до 1996 роки. Перевага null-алелю серед сортів всіх регіонів свідчить про його селекційну та адаптивну цінність до умов вирощування.

## ЛІТЕРАТУРА

- Галаєва М.В., Файт В.І., Чеботар С.В., Галаєв О.В., Сиволап Ю.М. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці // Цитология и генетика. – 2013 (у друці).
- Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство. – Киев: Аграрна наука, 1998. – 156 с.
- Комобакін В. Кліматичні зміни та їх наслідки // Farmer. – Київ, 2008. – №2 (11). – С. 11-12.
- Кочмарський В.С. Нові генотипи пшениці озимої м'якої з підвищеним потенціалом адаптивності, продуктивності та якості зерна // Вісник аграрної науки. – 2011. – №12 (704). – С. 40-43.
- Литвиненко М.А. Удосконалення програми селекції сортів озимої м'якої пшениці універсального типу для умов Півдня України // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту. – НЦНС. – 2010. – Вип. 16 (56). – С. 9-22.
- Литвиненко М.А. Відділ селекції та насінництва пшениці в 100-річній історії інституту // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту. – НЦНС. – 2012. – Вип. 20 (60). – С. 11-27.
- Лифенко С.П., Єриняк М.І., Нарган Т.П., Наконечний М.Ю., Подуст Ю.І. З історії селекції сортів пшениці озимої м'якої інтенсивного типу // Збірник наукових праць Селекційно-генетичного інституту. – НЦНС. – 2012. – Вип. 20 (60). – С. 28-43.
- Рокицький П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
- Шевченко А.М. Високоадаптивні сорти озимої пшениці Луганщини та ефективна технологія їх насінництва // Посібник українського хлібороба. – 2012. – С. 193-195.
- Galiba G., Quarrie S.A., Sutka J., Morgounov A., Snape J.W. RFLP mapping of the vernalisation *Vrn 1* and frost resistance *Fr 1* genes on chromosome 5A of wheat // Theor. Appl. Genet. – 1995. – V. 90. – P. 1174-1179.
- Snape J.W., Semikhodskii A., Fish L., Sharma L.N., Quarrie S.A., Galiba G., Sutka J. Mapping frost tolerance loci in wheat and comparative mapping with other cereals // Acta Agron. Hung. – 1997. – V. 45. – P. 265-270.
- Toth B., Galiba G., Feher E., Sutka J., Snape J.W. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat // Theor. Appl. Genet. – 2003. – V. 107. – P. 509-514.
- Vagujfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubkovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // Mol. Genet. Genomics. – 2003. – V. 269. – P. 60-67.

Надійшла до редакції  
17.01.2013 р.

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОФОНДУ ПШЕНИЦІ**

### **IDENTIFICATION OF THE GENE POOL OF BREAD WINTER WHEAT BY ALLELES OF MICROSATELLITE LOCUS *Xcfd7-5B* ASSOCIATED WITH FROST RESISTANCE**

M. V. Galaeva, V. I. Fayt, Yu. M. Sivolap

*Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations  
National Academy of Agrarian Sciences  
(Odessa, Ukraine)*

163 bread winter 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 evidence of its selection and adaptive value.

**Key words:** *Triticum aestivum L.*, frost resistance, microsatellite loci

## **ІДЕНТИФІКАЦІЯ ГЕНОФОНДА ПШЕНИЦІ М'ЯГКОЇ ОЗИМОЇ ПО АЛЛЕЛЯМ АССОЦІЙОВАНОГО С МОРОЗОСТОЙКОСТЮ МІКРОСАТЕЛІТНОГО ЛОКУСА *Xcfd7-5B***

М. В. Галаєва, В. І. Файт, Ю. М. Сиволап

*Селекційно-генетический інститут – Національний центр семеноводства і сортоизучения  
Національної академії аграрних наук України  
(Одесса, Україна)*

Ідентифіковані по аллелям локуса *Xcfd7-5B* 163 сорти пшениці м'якої озимої різного географічного походження. Виявлено два алельних варіанта локуса: алель 194 п.н. і null-алель (відсутність продукту ампліфікації). В загальному наборі і в наборах сортів окремих регіонів частота null-алеля суттєво перевищала частоту алеля 194 п.н. Перевага null-алеля серед сортів всіх регіонів свідчить про його селекційну і адаптивну цінність.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum L.*, морозостойкость, микросателлитные локусы