

variety was shown. The method of type identification of hop varieties by molecular markers was developed. The elaborated method is statistically reliable and does not need much time or expensive reagents.
Key words: *Humulus lupulus*, gene polymorphism, molecular markers, aroma and bitter varieties.

УДК 577.2:58.036.5:633.11

ГАЛАЕВА М.В., ФАЙТ В.И., ГАЛАЕВ А.В., ФЕДОРОВА В.Р., СИВОЛАП Ю.М.

Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноведения и сортоизучения, Украина, 65036, м. Одесса, Овидиопольская дорога, 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

МОРОЗОСТОЙКОСТЬ РЕКОМБИНАНТНО-ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ И ЕЕ СВЯЗЬ С АЛЛЕЛЯМИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

Пшеница мягкая озимая – одна из наиболее распространенных злаковых культур в мире. Достаточный уровень зимо- и морозостойкости определяет стабильность урожая озимых культур и ареал распространения конкретного сорта. В суровые зимы на территории Украины наблюдается значительная гибель посевов пшеницы озимой, а на уцелевших площадях отмечены различные не летальные повреждения растений, которые приводят к резкому снижению урожая. Поэтому создание сортов озимой мягкой пшеницы с высоким генетически обусловленным уровнем морозостойкости – одна из важных задач селекции в Украине [1, 2].

Привлечение молекулярно-генетических методов помогает идентифицировать и отбирать в процессе селекции генотипы с необходимыми генами. Использование указанных методов позволяет выявить специфические фрагменты ДНК, тесно сцепленные с определенными генами морозостойкости. С помощью молекулярных маркеров на длинных плечах хромосом пятой гомеологической группы локализованы главные гены морозостойкости, а именно, гены *Fr-A1* и *Fr-A2* на хромосоме 5A, *Fr-B1* – на 5B и *Fr-D1* – на 5D [3, 4]. Большая часть маркеров к указанным генам были получены с помощью достаточно трудоемкого ПДРФ-анализа, а ПЦР-маркеры не были эффективными для сортов украинской селекции. Возникла необходимость в поиске новых ПЦР маркеров к генам морозостойкости у украинских сортов пшеницы.

В наших предыдущих исследованиях был проведен анализ морозостойкости и микросателлитный анализ популяций пшеницы мягкой озимой и установлена связь аллельных различий ряда локусов с уровнем морозостойкости пшеницы [5, 6]. Настоящее исследование является продолжением

указанных работ. Его цель – анализ рекомбинантно-инбредных линий F₇ пшеницы мягкой озимой Лузановка одесская/Одесская красноколосая по аллелям микросателлитных (МС) локусов хромосом пятой гомеологической группы и оценка связи аллельных различий МС-локусов с морозостойкостью пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследований служили родительские формы и 101 рекомбинантно-инбредная линия (РИЛ) F₇ комбинации скрещивания Лузановка одесская/Одесская красноколосая. Лузановка одесская относится к группе сортов с уровнем морозостойкости «выше среднего», а Одесская красноколосая имеет относительно «низкий» уровень морозостойкости.

Оценку морозостойкости РИЛ проводили с помощью искусственного промораживания проростков и растений в фазе кушения согласно методике [7]. Промораживание проростков осуществляли трижды в течение 2008 года при –12 °С.

Для определения морозостойкости растений в фазе кушения семена РИЛ высевали в октябре 2010 и 2011 на трехрядных участках длиной 1 м по 50 зерен на рядок с площадью питания отдельного растения 30x2 см². В I декаде февраля и I декаде марта 2011 года и I декаде января 2012 года с поля отбирали по 25–85 растений каждой линии и промораживали при температуре –16 °С.

ПЦР с направленными праймерами проводили на термоциклере «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Реакционная смесь содержала буфер (67 мМ трис-НСl pH 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 1,5 мМ MgCl₂; 0,01% Tween-20); 0,2 мМ каждого dNTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 1 ед. Taq-полимеразы. Условия реакции – 35 циклов: денатурация при 94 °С – 30 с (начальная – 2 мин), отжиг при 55 °С, 58 °С,

60 °С, 62 °С (в зависимости от праймеров) – 30 с, элонгация при 72 °С – 1 мин, заключительная элонгация – 4 мин. Анализ ДНК сортов и РИЛ F₇ проводили с помощью праймеров к микросателлитным локусам, локализованным на хромосомах пятой группы: *Xbarc117-5A*, *Xwmc75-5B*, *Xwmc289-5B*, *Xgprw3191-5B*, *Xwmc289-5D*, *Xcfd57-5D*, *Xgprw303-5D*. Продукты амплификации фракционировали в 2% агарозном геле и 12% полиакриламидном геле в 1хТВЕ.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методикам [8].

Результаты и обсуждение

Уровень морозостойкости популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая был достаточно высоким (66–86 %) и при промораживании проростков несколько большим, чем при промораживании растений в фазе кущения (табл. 1). Морозостойкость популяции в фазе кущения в 2011 году не зависела от времени отбора растений в поле ($t = 0,76$, при $t_{0,05} = 1,96$) и равнялась 69 % живых растений в I декаде февраля и 66 % – в I декаде марта. Размах варьирования отдельных линий в феврале составлял 87%, а в марте, в силу уменьшения общего уровня морозостойкости растений в конце зимы, возрастал до 100 %.

Морозостойкость популяции РИЛ Лузановка одесская/Одесская красноколосая в январе 2012 составила 78 % , что на 9–12 % выше морозостойкости популяции в феврале и марте 2011 года ($t = 2,87$ и $t = 3,63$, соответственно). Указанные существенные различия по морозостойкости могут быть обусловлены разными условиями выращивания и закалывания растений в поле в 2011 и 2012 годах.

При использовании праймеров к 7 МС-локусам хромосом пятой гомеологической группы, которые могут быть сцеплены с генами морозостойкости, выявлен полиморфизм ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по трем из них, а именно *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* (табл. 2). Продукты амплификации ДНК сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая при использовании праймеров к локусам *Xwmc289-5B*, *Xwmc289-5D*, *Xcfd57-5D* та *Xgprw303-5D* были идентичными.

В дальнейшем был проведен анализ ДНК 101 РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская

красноколосая по полиморфным микросателлитным локусам *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B*. ДНК-маркеры, как правило, проявляют менделеевский характер расщепления [9]. При различиях родительских сортов по двум аллелям одного локуса и отсутствии селективного преимущества в F₇ должно наблюдаться расщепление линий в соотношении 49,7 линий с аллелем одной родительской формы, 1,6 линий с аллелями обеих родителей и 49,7 линий с аллелем второй родительской формы (табл. 3). Соотношение расщепления по аллелям локусов *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* соответствовало теоретически ожидаемому (табл. 3). Величины критерия соответствия χ^2 для указанных локусов составили 3,67 и 2,12, соответственно, что достоверно меньше $\chi^2_{0,05} = 5,99$ для $df = 2$. Расщепление по аллелям локуса *Xbarc 117-5A* не соответствовало теоретически ожидаемому ($\chi^2 = 12,39$). Такое отклонение с вероятностью 9–24% может быть обусловлено случайными причинами, 5–20 % – расположением локуса на конце группы сцепления и 60–82 % – в определенных горячих точках хромосом, которые связаны с наличием чужеродных транслокаций [10].

Сопоставление двух групп линий-носителей альтернативных аллелей (гетерозиготные линии не учитывали) по каждому из полиморфных локусов позволило выявить достоверные аллельные различия по морозостойкости для локуса *Xgprw3191-5B* (табл. 4). Линии-носители аллеля 178 п.н. от более морозостойкого сорта Лузановка одесская характеризовались более высокой морозостойкостью проростков по сравнению с линиями-носителями аллеля 236 п.н. менее морозостойкого сорта Одесская красноколосая при всех трех промораживаниях. В первом случае аллельные различия составили 12 %, во втором – 17 %, в третьем – 10 %, при размахе варьирования между линиями в популяции по указанному признаку 96, 98, 91 %, соответственно. Следовательно, 12,5 % фенотипического разнообразия популяции по морозостойкости проростков рекомбинантно-инбредных линий F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая в первом опыте связаны с аллельными различиями по локусу *Xgprw3191-5B*, во втором и третьем опыте – 17,3 и 11,0 % соответственно.

Таблица 1. Основные статистические показатели морозостойкости (%) популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая на стадии проростков (I; -12 °С) и растений в фазе кущения (II; -16 °С)

Опыт		$\bar{x} \pm S\bar{x}^*$	N	min	max	y	CV
Проростки	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
Кущение	Февраль 2011	69 ± 2,7	75	11	98	23,0	33
	Март 2011	66 ± 2,9	67	0	100	23,9	36
	Январь 2012	78 ± 1,6	99	21	100	15,7	20

Примечание: * $\bar{x} \pm S\bar{x}$ – среднее значение показателя ± стандартная ошибка, N – количество линий, min – минимальное значение показателя, max – максимальное значение показателя, y – стандартное отклонение, CV – коэффициент вариации.

Таблица 2. Генотипы сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая по аллелям (количество п.н.) микросателлитных локусов пятой группы хромосом

Сорт	Локус						
	<i>Xbarc 117-5A</i>	<i>Xwmc 75-5B</i>	<i>Xwmc 289-5B</i>	<i>Xwmc 289-5D</i>	<i>Xcfd 57-5D</i>	<i>Xgpw 303-5D</i>	<i>Xgpw 3191-5B</i>
Лузановка одесская	224	210	198	164	291	105	178
Одесская красноколосая	230	190	198	164	291	105	236

Таблица 3. Соотношение расщепления по аллелям полиморфных микросателлитных локусов популяции РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая

Аллели сорта	Теоретически ожидаемое	Фактически полученное		
		<i>Xbarc117-5A</i>	<i>Xwmc75-5B</i>	<i>Xgpw3191-5B</i>
Лузановка одесская	49,7	46	49	54
Обоих родителей	1,6	6	4	0
Одесская красноколосая	49,7	49	48	47
χ^2		12,39	3,67	2,12

В то же время, при промораживании растений в фазе кущения при -16 °С в феврале 2011 года наблюдали противоположную закономерность. Морозостойкость линий с аллелем 236 п.н. от сорта Одесская красноколосая по локусу *Xgpw3191-5B* была выше на 12,6 % таковой линий-носителей аллеля 178 п.н. от сорта Лузановка одесская. Аналогичную тенденцию отмечали и при промораживании растений в фазе кущения в

марте 2011 и январе 2012 годов. Различия по морозостойкости между группами линий с альтернативными аллелями локуса *Xgpw3191-5B* в данных двух случаях оказались не достоверными. Изменения рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей одного локуса при промораживании разновозрастных растений (проростки, фаза кущения) были отмечены ранее [11, 12] и, вероятно, связаны с изменениями условий закаливания растений.

Таблица 4. Морозостойкость групп РИЛ F₇ Лузановка одесская/Одесская красноколосая – носителей альтернативных аллелей локусов *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* на стадии проростков (-12 °C) и растений в фазе кущения (-16 °C), % живых растений

Локус	Аллель	Проростки			Кущение		
		1	2	3	Февраль 2011	Март 2011	Январь 2012
<i>Xbarc117-5A</i>	224 п.н. Л	76	85	89	68	66	77
	230 п.н. О	71	77	85	71	67	80
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-
<i>Xwmc75-5B</i>	210 п.н. Л	75	84	88	70	68	79
	190 п.н. О	71	77	84	68	66	79
НСР _{0,05}		-	-	-	-	-	-
<i>Xgprw3191-5B</i>	Л	79	89	91	64	62	78
	О	67	72	81	75	70	79
НСР _{0,05}		8	9	7	10	-	-

Выводы

Выявлен полиморфизм по аллелям трех из семи МС-локусов пятой группы хромосом *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* и *Xgprw3191-5B* различающихся по морозостойкости сортов Лузановка одесская и Одесская красноколосая, а также 101 РИЛ F₇, полученных от скрещивания указанных сортов. Аллельные различия локуса *Xgprw3191-5B* определяют 11–17 % фенотипического разнообразия популяции РИЛ по морозостойкости проростков. Существенное

увеличение морозостойкости линий связано с присутствием в генотипе аллеля 178 п.н., характерного для морозостойкой родительской формы Лузановка одесская. При промораживании растений в фазе кущения отмечена смена рангов генотипов-носителей альтернативных аллелей, большей морозостойкостью характеризовались линии – носители аллеля 236 п.н. сорта Одесская красноколосая.

Литература

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. Удосконалення програми селекції сортів озимої м'якої пшениці універсального типу для умов Півдня України // Збірник наукових праць СГІ-НЦНС. – 2010. – Вип. 16 (56). – С. 9–22.
3. Vagujfalvi A., Galiba G., Cattivelli L., Dubcovsky J. The cold-regulated transcriptional activator *Cbf3* is linked to the frost-resistance locus *Fr-A2* on wheat chromosome 5A // Mol. Genet. Genomics. – 2003. – 269. – P. 60–67.
4. 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. – 107. – P. 509–514.
5. Галаева М.В., Файт В.И., Чеботарь С.В., Сиволап Ю.М. Морозостойкость F₂ популяций пшеницы мягкой озимой и ее связь с аллелями микросателлитных локусов // Вісн. Харків. націон. аграрн. ун-ту. Сер. Біологія. – 2013. – Вип. 3 (30). – С. 68–75.
6. Галаева М.В., Файт В.И., Чеботарь С.В., Галаев О.В., Сиволап Ю.М. Зв'язок алелів мікросателітних локусів п'ятої групи хромосом з морозостійкістю озимої пшениці // Цитологія та генетика. – 2013. – 47, № 5. – С. 3–11.
7. Феоктістов П.О., Гаврилов С.В., Ляшок А.К. та ін. Методологічні принципи оцінки озимої пшениці на терморезистентність в умовах півдня України. – К.: Видавничий центр НАУ, 2006. – 36 с. – (Методичні рекомендації).
8. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
9. Laroche A., Demeke T., Gaudet D.A. Development of PCR marker for rapid identification of the Bt-10 gene for common bunt resistance in wheat // Genome. – 2000. – 43. – P. 217–223.
10. Kammholz S.J., Campbell A.W., Sutherland M.W. Establishment and characterization of wheat genetic mapping populations // Aust. J. Agric. Res. – 2001. – 52. – P. 1079–1088.
11. Файт В.И., Федорова В.Р. Влияние различий генов *Ppd* на адаптацию и урожай в условиях юга степи Украины // Цитология и генетика. – 2007. – 41, № 6. – С. 26–33.
12. Мокану Н.В., Файт В.И. Различия эффектов аллелей генов *Vrd1* и *Ppd-D1* по зимо- морозостойкости и урожаю у озимой пшеницы // Цитология и генетика. – 2008. – 42, № 6. – С. 28–35.

GALAEVA M.V., FAYT V.I., GALAEV A.V., FEDOROVA V.R., SIVOLAP Yu.M.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopolskaya dor., 3, e-mail: mariagall@rambler.ru

FROST RESISTANCE OF WHEAT RECOMBINANT-INBRED LINES AND ITS RELATION WITH MICROSATELLITE LOCI ALLELES

Aim. The study of the relation between allelic differences of microsatellite loci and frost resistance of recombinant-inbred lines Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya. **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR), gel-electrophoresis, test of frost resistance. **Results.** Microsatellite analysis of chromosomes of homeologous group 5 and the analysis of frost tolerance were performed on recombinant-inbred lines (RILs) derived from a cross between winter wheat varieties Luzanovka odesskaya (tolerant to frost) and Odesskaya krasnokolosaya (susceptible to frost). Microsatellite analysis of parental varieties by using 7 microsatellite markers located on chromosomes 5A, 5B and 5D showed polymorphism for loci *Xbarc 117-5A*, *Xwmc75-5B* and *Xgpw3191-5B*. These microsatellite markers were used for analysis of RILs. The association between allelic differences at microsatellite loci and frost resistance was studied. **Conclusions.** Allelic differences of RILs Luzanovka odesskaya/Odesskaya krasnokolosaya for *Xgpw3191-5B* locus showed a significant relationship with the level of frost resistance. Increase of frost resistance of lines at the germination stage by 11–17 % was associated with 178 bp allele for this microsatellite locus, which is typical for the frost resistant variety Luzanovka odesskaya. Increase of frost resistance of lines at the tillering stage was associated with 236 bp allele, which is typical for the variety Odesskaya krasnokolosaya.

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

УДК 579.873.1:577.181.4

ГОРБАЛЬ Л.О.¹, ЮЩУК О.С.¹, ЗАБУРАНИЙ Н.¹, КОБИЛЯНСЬКИЙ А.М.², ОСТАШ Б.О.¹, МАРІНЕЛЛІ Ф.², ЛУЖЕЦЬКИЙ А.М.³, ФЕДОРЕНКО В.О.¹

¹ Львівський національний університет імені Івана Франка,

Україна, 79005, м. Львів, вул. Грушевського 4, e-mail: v_fedorenko@franko.lviv.ua

² Department of Biotechnology and Life Sciences, University of Insubria, Varese and “The Protein Factory” Research Center Politecnico of Milano, ICRM CNR Milano and University of Insubria, Varese Italy

³ Helmholtz-Institute for Pharmaceutical Research Saarland, Germany, Saarbrücken

ГЕНЕТИЧНИЙ ІНСТРУМЕНТАРІЙ ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ ШТАМІВ *ACTINOPLANES TEICHOMYCETICUS* ІЗ ПІДВИЩЕНИМ РІВНЕМ ПРОДУКЦІЇ ТЕЙКОПЛАНІНУ

Виникнення і розповсюдження патогенних мікроорганізмів, стійких до більшості відомих антибіотиків, є однією з найголовніших проблем сучасної медицини. Антибіотичні препарати все частіше стають неефективними у боротьбі зі збудниками інфекцій. Тому існує потреба у пошуку нових антибіотиків. Продуцентами більшості відомих антибіотиків є актинобактерії, а саме представники роду *Streptomyces*. Однак останнім часом зусилля науковців все більше спрямовані на виділення та дослідження метаболічного потенціалу «нестрептоміцетних» актинобактерій, зокрема тих, що належать до роду *Actinoplanes*, серед яких є багато продуцентів біологічно-активних сполук. До цього роду належить *Actinoplanes teichomyceticus* –

продуцент глікопептидного антибіотика тейкопланіну, який застосовується для лікування важких інфекційних хвороб, викликаних множиннорезистентними збудниками. Попри те, що тейкопланін є фармацевтично-важливим препаратом, а кластер генів його біосинтезу виявлено ще у 2004 році [1, 2], особливості генетичного контролю і регуляція продукції цього антибіотика в *A. teichomyceticus* залишаються малодослідженими. Це зумовлено складністю маніпуляцій з цим об'єктом, а також з тим, що методи генетичної та генно-інженерної роботи з ним розроблені недостатньо. Тому розробка нових генетичних підходів щодо *A. teichomyceticus* має важливе значення не тільки для вивчення механізмів біосинтезу тейкопланіну, але й селекції його