

УДК 633.112.9:631.528:632.168

ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗЦОВ ОЗИМОЙ ТРИТИКАЛЕ
НА НАЛИЧИЕ ХРОМОСОМНЫХ ЗАМЕЩЕНИЙ И ИХ СВЯЗЬ
С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ПРОРАСТАНИЮ НА КОРНЮ

М.С. БАЖЕНОВ¹, М.Г. ДИВАШУК², В.В. ПЫЛЬНЕВ¹, Г.И. КАРЛОВ², В.С. РУБЕЦ¹

(¹ Кафедра селекции и семеноводства полевых культур,² Центр молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

Работа выполнена на материале селекционной станции имени П.И. Лисицына РГАУ имени К.А. Тимирязева. С помощью ПЦР проанализировано наличие R/D-замещений и транслокаций у образцов коллекционного питомника озимой тритикале. Сортообразцы Александр, Валентин, Ставропольский 2, Фиделио и КП-08-№2 обладают нормальным хромосомным набором гексаплоидной тритикале. Образец 21759/97 имеет 2R/2D хромосомное замещение. Показана связь между наличием данного замещения и устойчивостью к предуборочному прорастанию зерна в колосе.

Ключевые слова: озимая тритикале, хромосомное замещение, ПЦР, прорастание на корню.

Тритикале — новый род культурных растений семейства злаковых (*Poaceae* Varnhart), созданный человеком путем гибридизации пшеницы с рожью, и представляющий собой совокупность аллополиплоидов различного геномного состава. В настоящее время наибольшее распространение в сельском хозяйстве получила гексаплоидная тритикале ($2n=42$) с геномной формулой AABBRR [8], которую выращивают для получения зерна и зеленого корма.

Зерно тритикале, обладающее высокой активностью амилаз и меньшим содержанием пентозанов по сравнению с зерном ржи, может быть использовано для производства этилового спирта без добавления ферментативных препаратов [15]. Низкое качество клейковины и высокая активность гидролитических ферментов делают муку тритикале мало пригодной для хлебопечения. Для производства хлеба в нее, как правило, приходится добавлять от 10 до 50% муки сильной пшеницы [9].

Частой причиной снижения урожайности и качества зерна тритикале является его прорастание в колосе, вызываемое атмосферными осадками в предуборочный период [6, 22, 23]. Основной способ решения данной проблемы — создание устойчивых к прорастанию на корню сортов [1, 6]. Существуют три основных подхода в селекции на устойчивость к прорастанию в колосе. Главным из них считается увеличение периода физиологического покоя семян после созревания [1, 22]. Второй путь — отбор растений с особой морфологией колоса, не позволяющей воде задерживаться на нем и проникать к зерну — грубый восковой налет, отсутствие опушения, рыхлость колоса, безостость и т.д. [14]. Третий путь — борьба с последствиями

явного и «скрытого» прорастания — отбор на пониженную активность амилаз зерна [1, 17]. Существуют и другие пути селекции на это свойство.

Известно, что улучшение гексаплоидной тритикале по многим хозяйственно значимым признакам и свойствам может быть осуществлено за счет привнесения в ее геном фрагментов генома D мягкой пшеницы путем хромосомных замещений либо транслокаций [3, 4]. Было показано, что наиболее сильное и положительное влияние на устойчивость к прорастанию на корню оказывают 3R/3D и 2R/2D хромосомные замещения [22].

Первые существенные шаги по улучшению тритикале связаны именно с 2R/2D-замещением. Старые формы и сорта тритикале, несмотря на то что давали большую биомассу, были чрезвычайно позднеспелыми, высокорослыми, чувствительными к длине дня и имели сильно морщинистое, щуплое зерно. Привнесение генов фотопериодической нейтральности и короткостебельности (*Rht8*) вместе с 2B-хромосомой позволило исправить некоторые из этих недостатков [23]. Вот почему получение, выявление и использование в селекции R/D-замещенных линий весьма актуально.

Целью нашей работы было выявление форм тритикале с R/D-замещениями и изучение признаков и свойств, связанных с данными замещениями.

Материал и методика

Нами было проанализировано шесть образцов тритикале: из коллекционного питомника — сорта Фиделио, Ставропольский 2 и образец 21759/97; собственной селекции — сортообразцы Валентин, Александр и КП-08-№2. Весь изучаемый материал выращивали на полях Селекционной станции имени П.И. Лисицына в 2008-2009 гг. Площадь делянки 1 м², повторность 3-кратная.

Характеристика образцов тритикале по устойчивости к прорастанию зерна в колосе давалась путем подсчета доли проросших зерен во влажной камере на 8-е сутки. Колосья после уборки просушивали в течение одной недели, связывали в снопики по 10 шт., намачивали путем погружения в воду на 2 мин и помещали в полиэтиленовые пакеты. В течение восьми дней ежедневно производили дополнительное увлажнение из пульверизатора. После этого колосья высушивали на открытом воздухе, обмолачивали на молотилке и производили подсчет доли проросших зерен. Провокация прорастания в колосьях осуществлялась при естественных температурных условиях в открытом помещении, в тени. С каждой делянки было взято по 10 колосьев.

Уровень покоя семян определяли путем вычисления взвешенного индекса прорастания (*ИП*) вымолоченных зерен в чашках Петри по Walker-Simmons [24]

с модификацией для 14 дней испытания:
$$ИП = \frac{(14 \times n_1 + 13 \times n_2 + \dots + 1 \times n_{14})}{D \times N},$$

где n_1, n_2, \dots, n_{14} — число вновь проросших зерен за первые, вторые и последующие сутки; N — общее число зерен; D — общее число дней испытания; 14, 13, 1 — веса, данные числам проросших зерен в первый, второй и последующие дни соответственно. Максимальный $ИП=1,0$. Для проведения данного испытания колосья каждого сорта убирали с поля в фазу восковой спелости зерна. Зерна вымолачивали из колоса вручную и немедленно укладывали в чашки Петри ($d=10$ см) бороздкой вниз на два слоя фильтровальной бумаги, смоченной 10 мл дистиллированной воды. Проращивание проводили при нерегулируемой температуре (22-26°C). Для опреде-

ления индекса прорастания с каждой делянки было отобрано по три типичных колоса. Зерна, вымолоченные из колосьев с одной делянки, смешивали. В чашку Петри помещали по 25 случайно взятых из объединенной пробы зерен. Повторность лабораторного опыта соответствует полевой — 3-кратная.

Среднее время прорастания вычисляли по формуле, приведенной в обзоре

Ranal и Santana [19]: $\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$, где t_i — промежуток времени от начала эксперимента до наблюдения / (дни или часы); r_f — число вновь проросших семян от наблюдения /-1 до наблюдения /: k — последнее наблюдение, связанное с окончанием прорастания.

ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу Bematzky и Tanksley [10] с некоторыми модификациями. Размер выделенной ДНК и степень загрязненности РНК оценивали методом электрофореза в 1,5%-м агарозном геле.

Анализ наличия хромосом генома D у образцов выполняли по описанной ранее методике [2] с помощью следующих SSR-маркеров: Xbarcl49, Xbarc271, Xwmc111, Xgwm349, XЪarcб, Xbarc270, Xwmc285, Xbarcl183, Xwmc233, Xbarcl10, Xbarcl96, XЪarcЮЗО, Xwmc432 [25], STS-маркеров Seel, Sec2 [16], рожьспецифичного маркера [13], STS-маркера на аллельное состояние локуса Glu-D1 [11].

Все праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Продукты ПЦР разделяли в 2%-м агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера размеров использовали «100 bp leader» (Fermentas).

Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ, критерий Стьюдента (при вычислении НСР), коэффициент корреляции Пирсона, коэффициент контингенции Пирсона и коэффициент ассоциации Юла [7].

Для статистической обработки данных использовали однофакторный дисперсионный анализ, критерий Стьюдента (при вычислении НСР), коэффициент корреляции Пирсона, коэффициент контингенции Пирсона и коэффициент ассоциации Юла [7].

Результаты и их обсуждение

По результатам оценки образцов во влажной камере неустойчивыми к прорастанию в колосе оказались сорта Валентин и Фиделио (таблица). Доля проросших зерен в колосьях других образцов тритикале не отличалась значимо от нуля.

Индекс прорастания отражает уровень покоя семян, который считается главным фактором устойчивости зерна к прорастанию в колосе [20, 1]. Сопоставление индекса прорастания с долей проросших зерен в колосе во влажной камере не по-

Некоторые показатели устойчивости образцов тритикале к предуборочному прорастанию в колосе

Образец	Доля проросших зерен в колосе во влажной камере на 8-е сут.	Индекс прорастания	Среднее время прорастания зерна в чашке Петри, сут.
21759/97	0,03	0,58	6,9
Александр	0,04	0,50	8,0
Валентин	0,20	0,75	4,5
КП-08-№2	0,00	0,69	5,4
Ставропольский 2	0,02	0,71	5,1
Фиделио	0,10	0,77	4,2
НСР ₀₅	0,09	0,13	1,8

казало статистически значимой связи между данными показателями. Высокие индексы прорастания, практически не отличающиеся друг от друга, отражают слабый послеуборочный покой семян сортообразцов Валентин, Фиделио, Ставропольский 2 и КП-08-№2. Образцы Александр и 21759/97 показали средний уровень покоя семян (см. таблицу).

Из всего этого можно заключить, что при общем низком уровне покоя семян у тритикале на первый план выступают иные факторы устойчивости к прорастанию на корню. Так, зерно сортообразцов Ставропольский 2 и КП-08-№2 плотно заключено в чешуи колоса, что, по-видимому, препятствует его быстрому увлажнению и задерживает прорастание (см. таблицу).

Между индексом прорастания и средним временем прорастания имеется функциональная зависимость: $ВП = -14ИП + 15$, где $ВП$ — время прорастания в сутках; $ИП$ — 14-дневный индекс прорастания. Данная зависимость наблюдается только лишь в том случае, если за период наблюдения (14 дней, исключая день закладки опыта) прорастут все зерна. Преимущество среднего времени прорастания состоит в том, что эта величина, в отличие от индекса, имеет размерность (сутки, часы и т.д.), что существенно упрощает статистическую обработку и интерпретацию данных. Если же процесс прорастания в установленный срок не завершился, то вычисление среднего времени становится невозможным без продления наблюдений. Однако в последнем случае будет иметь место корреляция между индексом прорастания, вычисленным за 14 дней, и средним временем прорастания, найденным по завершению прорастания. Таким образом, индекс прорастания позволяет более эффективно использовать данные, полученные за ограниченный срок наблюдения.

В результате испытания во влажной камере сорт Валентин показал больший процент проросших зерен, чем сорт Фиделио, несмотря на то, что первый имеет неопушенный колос с достаточно сильным восковым налетом (см. таблицу). Возможно, здесь проявляется действие еще одного фактора, скорее всего, ингибиторов прорастания, вырабатывающихся в чешуях колоса Фиделио.

Таким образом, изучаемые сортообразцы различаются по устойчивости к предуборочному прорастанию. Подобная устойчивость могла быть обусловлена R/D -замещениями.

Для поиска всех возможных R/D-замещений у исследуемых сортообразцов мы использовали микросателлитные маркеры хромосом генома D, по одному маркеру на короткое и длинное плечо соответственно. По наличию амплификации маркеров делали вывод о присутствии в геноме соответствующей хромосомы. Для выявления наличия генетического материала ржи мы использовали рожьспецифичный ДНК-маркер (RYE) [12], молекулярные маркеры на запасные белки пшеницы и ржи, кодоминантный маркер на локус *Ghi-D1* и молекулярные STS-маркеры *Sec1* и *Sec2* [11, 16]. Данные маркеры также могут показывать наличие хромосом 1D, 1R, 2R соответственно.

ПЦР-анализ с использованием вышеприведенных молекулярных маркеров показал отсутствие каких-либо замещений или интрогрессий генома D у образцов Александр, Валентин, Фиделио, Ставропольский 2 и КП-08-№2. С помощью SSR-маркеров было выявлено, что растения образца 21759/97 несут в своем геноме хромосому 2D либо ее фрагменты — это проявлялось в амплификации маркеров Xwmclll и Xgwm349, локусы которых расположены в коротком и длинном плече 2B-хромосомы соответственно.

Применение дополнительных маркеров, специфичных для хромосомы 2D (Xbarc228, Xbarcl43, Xgwm539, Xgwm301, Xgwm102, Xgwm157, Xbarcl68,

Xgwm484, Xwmc 111, Xgwm261) подтвердило наличие у образца 21759/97 целой хромосомы 2D. Одновременно у растений этого образца отсутствовала хромосома 2R, судя по отсутствию амплификации STS- маркера гена Sec2. Наличие других хромосом D генома у растений образца 21759/97 с помощью SSR-маркеров, используя по одному маркеру на каждое хромосомное плечо, не было выявлено. Кроме того, положительные результаты при ПЦР-анализе дали маркеры Seel (на первую хромосому ржи) и RYE (маркер, позволяющий находить интрогрессии ржаной ДНК в геном пшеницы). Наличие R/D-замещения подтверждается также морфологическими особенностями тритикале 21759/97, характерными для мягкой пшеницы: формой зародыша зерна, раннеспелостью, относительной низкорослостью и способностью давать зерно высокого качества.

Во время проведения амплификации SSR- и STS-маркеров на 2D и 2R хромосомы было обнаружено, что часть растений изучаемого образца 21759/97 не несет замещения либо является гетерозиготной. Анализ большей по объему выборки (70 вегетирующих в поле растений) с использованием молекулярных маркеров показал, что 80% растений 21759/97 имеют 20-хромосому при отсутствии 2R-хромосомы, 11% растений несут обе хромосомы и 9% растений имеют хромосому 2R при отсутствии 20-хромосомы. Таким образом, изучаемый нами образец коллекционного питомника на самом деле представляет собой популяцию. Большая часть растений данной популяции имеет 2R/2D замещение. Однако в ней присутствует существенная доля гетерозиготных и растений без 2D-хромосомы. Вероятнее всего, это результат перекрестного опыления с нормальными гексаплоидными тритикале.

Несмотря на то, что в целом образец тритикале 21759/97 характеризуется как достаточно устойчивый к прорастанию на корню, все же среди его семян урожая 2009 г. были обнаружены проросшие и слегка наклюнувшиеся зерна. При выборе примерно одинакового числа зерен с явными признаками прорастания и без признаков прорастания нам удалось получить 14 проростков из наклюнувшихся в колосе зерен и 15 — из непроросших зерен. С помощью ПЦР-анализа нами было установлено наличие 2D- и 2R-хромосом в геноме проростков.

Среди четырнадцати проростков, полученных из наклюнувшихся в колосе зерен, половина имела 2R-хромосому. Причем пять из них имели хромосому 2R совместно с 2D, т.е. они были гетерозиготами, а два — несли 2R-хромосому в чистом виде. Среди растений, полученных из не проросших в колосе зерен, практически все (14 из 15-и) были гомозиготны по 20-хромосоме, и лишь одно растение несло 2R- совместно с 2D-хромосомой.

Так как сравнение выборок по критерию χ^2 -Пирсона в данном случае невозможно вследствие малой численности класса растений с 2R-хромосомой, то мы использовали в данном случае коэффициент ассоциации Юла (O) и коэффициент контингенции Пирсона ($<p$), показывающие, существует ли связь между исследуемыми факторами, но не отражающие ее тесноту. В связи с этим нами была принята гипотеза следующей взаимосвязи — *при наличии в геноме тритикале хромосомы 2R у образца 21759/97 снижается устойчивость зерна к прорастанию в колосе*. Расчет коэффициента ассоциации Юла ($O=0,87$) и коэффициента контингенции Пирсона ($<p=0,48$) подтверждает существование взаимосвязи в данном случае, так как связь между двумя качествами признаками считается подтвержденной, если $O>0,5$, а $<p>0,3$ [7]. Кроме того, следует обратить внимание на то, что количество растений с хромосомой 2R в общей совокупности всех растений образца 21759/97 равно приблизительно 20%, а в образцах, полученных из проросших зерен, — 50%.

Влияние 2R/2D-замещения на устойчивость тритикале к прорастанию на корню, скорее всего, является комплексным. С одной стороны, устойчивость может объясняться отсутствием 2Я-хромосомы, которая, как было показано, несет в себе QTL, влияющий на прорастание зерна в колосе. С другой стороны — наличие 2Б-хромосомы обуславливает раннеспелость, которая в большинстве климатических условий обеспечивает более глубокий покой семян [20]. Низкорослость растений, обуславливаемая геном *Rht8* в 2 D-хромосоме, сама по себе не должна способствовать устойчивости к прорастанию на корню, так как колосья растений оказываются в более влажном и менее подвижном припочвенном слое воздуха, который не позволяет им быстро просохнуть после дождя. В то же время ген короткостебельности может в результате плейотропного действия дать устойчивость к прорастанию в колосе за счет снижения чувствительности клеток алейронового слоя и зародыша зерна к гиббереллинам [17].

Выводы

1. Сортообразцы Валентин и Фиделио имеют пониженную устойчивость к прорастанию зерна в колосе. Александр, 21759/97, Ставропольский 2 и КП-08-№2 отличаются повышенной устойчивостью к прорастанию зерна, причём у первых двух это обусловлено более глубоким покоем семян.

2. В результате проведенных нами исследований выявлено, что образец тритикале 21759/97 является популяцией по 2P1/20-!амещению.

3. Наличие 2R/2D-замещения приводит к повышению устойчивости к прорастанию на корню и усилению признаков, характерных для мягкой пшеницы.

4. С помощью используемых нами молекулярных маркеров не выявлено наличие каких-либо замещений или интрогрессий генома D у сортообразцов Александр, Валентин, Фиделио, Ставропольский 2 и КП-08-№2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования РФ, ГК 02.740.11.0286.

Библиографический список

1. Беркутова Н. С., Буко О. А. Оценка и отбор зерновых культур на устойчивость к прорастанию в колосе. М.: ВНИИТЭИ Агропром, 1982.

2. Дивашук М.Г., Карлов Г.Л., Соловьев А.А. Использование микросателлитных маркеров для идентификации пшенично-ржаных транслокаций у гексаплоидной тритикале // Известия ТСХА, 2007. Вып. 1. С. 61-65.

3. Дивашук М.Г., Крут П.Ю., Соловьев А.А., Карлов Г.П. Молекулярно-цитогенетическая характеристика линии яровой тритикале 131/7, несущей ржано-пшеничную транслокацию // Генетика, 2010. Т. 46, № 2. С. 211-217.

4. Крут П.Ю., Дивашук М.Г., Хомякова О.В., Дьячук Т.П., Карлов Г.П. Молекулярно-цитогенетическая характеристика первичных тритикале, межамфидиплоидного гибрида и перспективных линий селекции НИИСХ Юго-Востока // Известия ТСХА, 2009. Вып. 3. С. 74-80.

5. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур / Под ред. В.В. Пыльнева. М.: КолосС, 2008!

6. Сергеев А.В. Селекция, семеноводство и возделывание тритикале. М.: ВНИИТЭИ Агропром, 1989.

7. Теория статистики / Под ред. проф. Р.А Шмойловой. М.: Финансы и статистика, 1996.

8. Частная селекция полевых культур / В. В. Пыльнев, Ю. Б. Коновалов, Т. И. Хуцацкая и др. М. : КолосС, 2005.

9. Шевченко В.Е. Тритикале. Воронеж : ВГАУ, 1997.

10. Bernatzkv, R., Tankslev S.D. Genetics of actin-related sequences. Theor. Appl. Genet., 1986. 72: 314-321.
11. Ishikawa G., Nakamura T. A new co-dominant PCR-based marker to identify the liigh-molecular-weight glutenin subunit combination “5+10” of common wheat // Wheat Information Service, 2007. 103. P. 1-4.
12. Kato et al. Germination and growth inhibitors from wheat (*Triticum aestivum* L.) husks. J. Agric. Food Chem., 2002. Vol. 50. No. 22. Pp. 6307-6312.
13. Katto M.C., Endo T.R., Nasuda S.A. PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background // Genetics & Genetic Systems, 2004. Vol. 79. № 4. P. 245-250.
14. King R. II', Wettstein-Knowles P. Epicuticular waxes and regulation of ear wetting and pre-harvest sprouting in barley and wheat. //Euphytica, 2000. 112: 157-166.
15. KucerovaJ. The effect of year, site and variety on the quality characteristics and bioethanol yield of winter triticale // Journal of the Institute of Brewing & Distilling, 2007. 113: 142-146.
16. Lee J.H., Gravbosch RA., Lee D.J. Detection of rye chromosome 2R using the polymerase chain reaction and sequence-specific DNA primers // Genome, 1994. Vol. 37. P. 19-22.
17. Mama et al. a-Amylase and programmed cell death in aleurone of ripening wheat grains. Journal of Experimental Botany, 2006. Vol. 57, No. 4. Pp. 877-885.
18. Masojc P. Three classes of loci controlling preharvest sprouting in rye (*Secale cereale* L.) discerned by means of bidirectional selective genotyping (BSG). Euphytica (2009) 170:123-129.
19. Ranal M.A., De Santana D.G. How and why to measure the germination process? // Revista Brasil. Bot., 2006. V29. №1. P. 1-11.
20. Reddy L. V et. al. Effect of temperature on seed dormancy of wheat // Crop Science, 1985 Vol. 25. P. 455 458.
21. Ren Xiao-bo et. al. Mapping QTLs for pre-harvest sprouting tolerance on chromosome 2D in a synthetic hexaploid wheatxcommon wheat cross // J Appl Genet., 2008 49(4). Pp. 333-341.
22. Rvbka K. An approach to identification of rye chromosomes affecting the pre-harvest sprouting in triticale // J. Appl. Genet. 44(4), 2003. Pp. 491-496.
23. Triticale improvement and production: FAO Plant production and protection paper — 179; edited by Mohamed Mergoum and Helena Gomez-Macpherson; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Rome, 2004. — 172 pg. — Режим доступа: <http://www.fao.org/docrep/009/y5553e/y5553e00.HTM> (24 мая 2010).
24. Walker-Simmons M. Enhancement of ABA responsiveness in wheat embryos by high temperature // Plant, Cell and Environment (1988) 11, 769-775.
25. <http://wheat.pw.usda.gov>
26. <http://www.desicca.de/Rye%20gene%20map/index.html>

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

The research is done using materials of plant breeding station named after Lisitsin (Timiryazev Academy). Presence of both R/D substitutions and translocations in winter triticale nursery samples have been analyzed by means of PCR method. Alexander, Valentine, Stavropolskiy 2, Fidelio and KP-08-№2 varieties are found to have normal number of chromosomes of hexaploid triticales. 21759/97 is found to have 2R2D chromosome substitution. Connection between this substitution and resistance to pre-harvest sprouting has been determined.

Key words: winter triticale, chromosomal substitution PCR, germination on root.

Баженов Михаил Сергеевич — асп. кафедры селекции и семеноводства полевых культур. E-mail: bajcnovmi@mail.ru.

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н. Эл. почта: Divashuk@gmail.com.

Пыльнев Владимир Валентинович — д. б. н. Тел. (499) 976-12-72.

Карлов Геннадий Ильич — к. б. н. Эл. почта: karlov@timacad.ru

Рубец Валентина Сергеевна — к. б. н. Тел. (499) 976-12-72.