

УДК 631.52: 577.21

АДАПТАЦИЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ SSR-МАРКЕРОВ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНОМОВ ПЫРЕЯ СРЕДНЕГО, ПЫРЕЯ УДЛИНЕННОГО И ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ

П.Ю. КРУТИН, М.Г. ДИВАШУК, И.А. ФЕСЕНКО, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии РГАУ – МСХА имени К.А. Тимирязева)

Адаптированы микросателлитные маркеры пшеницы для анализа генома пырея среднего и пырея удлинённого. В результате проведенных исследований из 37 маркеров пшеницы для анализа генома пырея среднего было адаптировано 29, для пырея удлинённого — 32 маркера. В пшенично-пырейном гибриде Истра 1 для шести маркеров (Xgwm46, Xgwm340, Xgwm314, Xgwm156, Xgwm292, Xwmc221) показана амплификация фрагментов, характерных для пырея. Полученные результаты могут быть использованы для изучения геномов пырея среднего и пырея удлинённого, а также в селекционной работе с пшенично-пырейными гибридами.

Ключевые слова: мягкая пшеница, пырей средний, пырей удлинённый, пшенично-пырейный гибрид, отдалённая гибридизация, SSR-маркеры, микросателлитные маркеры.

Промежуточные пшенично-пырейные гибриды (ППГ) — селекционный материал, обладающий большим потенциалом [1, 9]. В своём геноме ППГ ($2n=56$) сочетают 38–42 хромосомы пшеницы и 14–18 хромосом пырея [6]. При их получении используют различные виды пырея разного уровня пloidности: понтийский (*Thinopyrum ponticum*, $2n=70$), средний (*Th. intermedium*, $2n=42$), удлинённый (*Th. elongatum* $2n=14$). При этом у различных ППГ набор хромосом пырея отличается друг от друга и представляет собой уникальную комбинацию из хромосом пырея среднего, пырея понтийского или пырея удлинённого [3, 6].

Благодаря наличию пырейного субгенома ППГ обладают комплексной устойчивостью к грибным и вирусным заболеваниям, высокой зимостойкостью и некоторые из них — способностью отрастать после скашивания и многолетним образом жизни [1, 9]. Разные комбинации пырейных хромосом обеспечивают биоразнообразие форм, различающихся между собой по этим признакам. Таким образом, ППГ может служить как селекционным мостиком для переноса хозяйственно ценных признаков в геном пшеницы, так и модельным объектом для изучения взаимодействия пшеничного и пырейного геномов [8].

Из-за слабой молекулярно-генетической изученности геномов пырея возникают сложности при анализе ППГ. Использование молекулярных маркеров геномов пырея позволило бы картировать хозяйственно полезные признаки на пырейных хромосомах и направленно интродуцировать их в хромосомы пшеницы, а также глубже понять взаимодействие геномов у отдалённых гибридов [2, 4, 7, 13].

Наиболее эффективными и полиморфными маркерами для молекулярной характеристики злаков являются микросателлитные маркеры (SSR). Они основаны на

полиморфизме микросателлитных повторов и продемонстрировали высокую эффективность при картировании генома пшеницы. В настоящее время разработано более 1500 маркеров для маркирования ее генома [10]. Разработка SSR-маркеров для малоизученных в молекулярно-генетическом плане видов является длительным, трудоемким и затратным процессом. В качестве альтернативы в настоящее время успешно применяется так называемый перенос (transfer), или адаптация SSR-маркеров, созданных для родственных видов. Такой подход был успешно использован для нескольких SSR-маркеров генома пшеницы при изучении геномов видов пырея [15].

Цель данной работы — адаптация микросателлитных маркеров пшеницы для изучения геномов пырея среднего и пырея удлиненного, а также пшенично-пырейного гибрида.

Материал и методы

В работе использовали ДНК пырея среднего (каталожный номер системы GRIN 401200, Иран), пырея удлиненного (каталожный номер системы GRIN 401007, Турция), пшенично-пырейного гибрида Истра 1 (Отдел отдалённой гибридизации ГБС РАН имени Н.В. Цицина).

ДНК выделяли СТАВ-методом из этиолированных проростков по методу Bematzky и Tanksley [5].

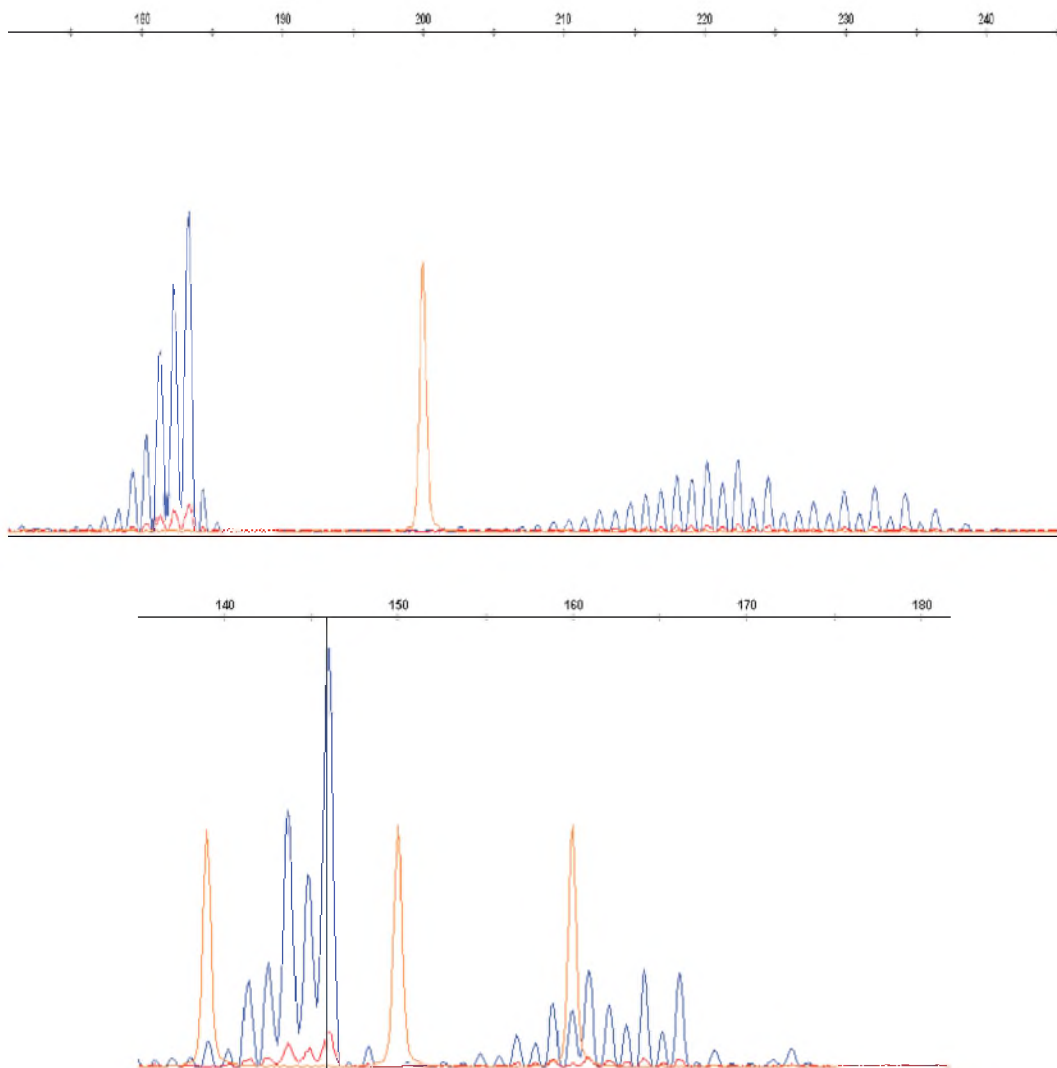
Выбранные для работы SSR-маркеры [11, 16] перечислены в таблице. ПЦР проводили при температуре отжига, рекомендованной в литературе [11] и в соответствии с методикой Schuelke [12]. Первый раунд ПЦР заключался в синтезе ПЦР-продукта с использованием прямого (0,04 пкмоль/мкл) и обратного праймеров (0,16 пкмоль/мкл). Второй раунд ПЦР состоял в мечении полученного ПЦР-продукта при температуре отжига 53°C. Полученный продукт анализировали методом фрагментного анализа с помощью секвенатора ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Результаты и их обсуждение

Первым этапом в работе был отбор микросателлитных маркеров для дальнейшего фрагментного анализа. Была проведена полимеразная цепная реакция с 37 SSR-маркерами на образцах пшеницы, пырея и ППГ. После разделения фрагментов в агарозном геле отобрали 33 маркера, для которых наблюдался продукт амплификации при использовании ДНК диких сородичей (см. таблицу). Для маркеров Xgwm205, Xgwm264, Xgdm33, Xgwm44 не наблюдали амплификации на пырее удлиненном и пырее среднем, и они были исключены из дальнейшего фрагментного анализа.

В ходе фрагментного анализа было установлено, что зачастую с геномов пырея среднего, пырея удлиненного и пшенично-пырейного гибрида Истра 1 амплифицируются фрагменты двух типов: микросателлитный тип (так называемая «гребенка») и немикросателлитный тип (монопик). В нашей работе при анализе полученных данных мы учитывали лишь фрагменты, дающие амплификацию по микросателлитному типу (рисунок). Сравнение с фрагментами пшеницы осуществляли на основании литературных данных [10, 11, 16].

Адаптация микросателлитных маркеров пшеницы для изучения генома пырея среднего и пырея удлиненного может найти широкое применение. SSR-маркеры мо-



Фрагментный анализ продуктов амплификации SSR-маркера Xgdm8 (пырей средний и пырей удлинённый): красный — маркер размеров, синий — анализируемый фрагмент

гут быть использованы в филогенетических и популяционных исследованиях этих видов, а также при переносе хозяйственно полезных признаков в пшеницу [4, 7]. В результате проведенных нами исследований в геноме пырея среднего и пырея удлинённого следующие SSR-маркеры давали фрагменты микросателлитного типа: Xcfd168, Xgdm8, Xgwm312, Xgwm325, Xgwm46, Xgwm340, Xgwm382, Xgwm642, Xbarc57, Xgwm341, Xgwm319, Xgwm397, Xgwm149, Xgwm335, Xgwm268, Xgwm484, Xgwm174, Xgwm111, Xgwm314, Xgwm232, Xgwm71, Xgwm52, Xgwm156, Xgwm292, Xgwm493, Xgwm538, Xwmc170, Xwmc221, Xwmc153. Кроме того, SSR-маркеры Xgwm157, Xgwm469 и Xcfd68 давали продукт только у пырея удли-

Результаты фрагментного анализа на пшенице, пырее среднем, пырее удлиннном и ППГ сорта Истра 1
(размеры указаны с учётом приращения на 20 п.н. за счёт праймера M13)

Маркер	Xcfd168	Xgdm8	Xgwm312	Xgwm325	Xgwm46	Xgwm157	Xgwm469	Xgwm428	Xgwm340	Xgwm382
Локализация на хромосоме	2D, 2A	5B, 3D	2A	6B, 6D	7BS	2DL	1B, 5D, 6DS.	7D	3BL	2AL, 2B, 2D
Размер у пшеницы (по лит. данным)	197		216, 219	133, 138	186, 179	106, 110	172, 170	137, 133	159	86, 184, 108
Пырей средний	238, 245, 247, 256, 260, 284, 326, 336	127, 130, 145, 160, 170, 184, 207, 220	187	93, 100, 105, 125, 143, 154, 227, 240, 340, 343	92, 97, 102, 113, 140 , 145, 155, 165, 175, 314	0	0	0	140 , 145, 147, 162, 175, 179, 187, 197, 192, 210	93, 103, 108, 120, 125
Пырей удлиннный	180, 187, 190, 232, 245, 254, 260, 265, 267, 273, 276	120, 137, 146, 160, 162, 165, 175	163, 177, 180, 187, 197, 247	96, 126, 140, 142, 153, 225, 238, 243	102, 118, 125, 143 , 157, 172, 182, 188, 194	117, 127, 137, 139, 165,	118, 130, 153, 160,	0	84, 103, 105, 125, 140 , 145, 170, 175, 185, 205, 207, 212, 220, 225, 227	103, 105, 109, 111, 115, 121, 140
ППГ (Сорт Истра 1)	235, 257, 275	158, 160, 165, 184, 266	112, 145, 170, 176, 237	151	122, 130, 142, 145 , 197, 224,	122, 127	117, 160, 184	162, 170, 180	140 , 178, 236	104, 129, 218, 270
Маркер	Xgwtm642	Xbars57	xgwm341	Xgwm319	Xgwm397	Xgwm149	Xgwm335	Xgwm268	Xgwm484	Xgwm174
Локализация на хромосоме	1DL	3A	3D	7A, 2B	4A	4B	5BL, 5EL, 7EL	1B	2D	5DL
Размер у пшеницы (по лит. данным)	187, 179		166 157	170 168	175 193	161 152	203 240	204 198	153 143	233 204

Пырей средний	94, 97, 143, 160, 170, 182, 195, 213, 240, 303	205, 210, 217, 230, 253, 263 186	108, 116, 128, 132, 186	183, 185, 205, 223	165, 184, 230, 239, 260, 270	120, 162, 170, 172, 230, 255	153, 167, 228	85, 92, 97, 143, 145, 159, 177, 204, 215, 227, 235, 243, 265, 286, 293, 305, 388	114, 135, 145, 155, 180, 244, 275, 304, 310, 315, 318, 325	149, 153, 315, 325, 326, 363, 370
Пырей удлиненный	88, 95, 138, 157, 187, 195, 200, 205, 207, 230, 304, 310, 315	211	108, 110, 126	168, 187, 197, 205, 222, 235, 290, 295, 307, 337	162, 180, 187, 190, 198, 215, 222	110, 115, 162, 167, 172, 187, 195, 200, 214, 225, 230, 243, 255	156, 223, 257	120, 134, 147, 175, 177, 185, 190, 200, 205, 215, 220, 235, 237, 245, 265, 267, 285, 287, 290, 295, 377,	115, 137, 144, 150, 155	170, 173, 180, 297, 300, 308, 310, 320, 363, 403
Истра 1	97, 140, 158, 184, 190, 198, 220, 245,	257	108, 117, 124, 144	133, 135, 156., 193, 216,	157, 181, 194, 219	171	187, 208	87, 115, 130, 165, 205, 210, 233, 235, 255, 257, 265	164	187, 354, 415
Маркер	Xgwm111	Xgwm314	Xgwm232	Xgwm71	Xcfd68	Xgwm156	Xgwm292	Xgwm52.2	Xgwm493	Xgwm538
Локализация на хромосоме	7D	4B, 3D	1D, 5D	3D, 2DS, 2BS, 2AS	7A, 7D	6B, 5B, 5A	5DL, 6ES	3DL	3B	4BL
Размер у пшеницы (по лит. данным)	206 184	182 171	140 144	126 124 120 118 101	204	300 279	214 188	142 128	179, 171	168 149

Пырей средний	150, 350, 353, 355, 359	106, 113, 137, 142, 152, 155 , 165, 170, 182, 200, 215, 238, 250, 252	141	122, 125, 127, 132, 165,	0	176 , 186, 287	176, 181, 186 , 264	125, 140, 155	120, 208,	117, 177, 197, 235
Пырей удлиненный	150, 153	114, 132, 140, 146, 150, 152, 157 , 161, 167, 182, 200, 255 , 265, 271, 292, 294, 324	120, 126, 140, 151, 287, 290	115, 124, 132,	128	160, 170, 177 , 183, 287	185	124, 140, 147, 152, 240, 255, 265	180, 207, 218	140, 153, 184, 190, 195, 210,
Истра 1	155, 220	114, 141, 153, 156 , 181, 203, 254	140, 160, 281, 286	110, 118, 122, 124, 127, 138, 140	186, 227	176 , 186, 280, 286	187 , 191, 233	125, 170, 366	157	156, 167, 172
Маркер	Xwmc170	Xwmc221	Xwmc153	Xgwm205	Xgwm264	Xgdm33	Xgwm44			
Локализация на хромосоме	2A	7D	3AL, 1D	5A, 5D	1A, 1B, 3B, 7B	1A, 1B, 1D	7D			
Размер у пшеницы (по лит. данным)	230	209	177							
Пырей средний	214, 245,	105, 109, 120, 145, 157, 208, 225, 232, 262, 265, 275, 278	153, 157, 277, 281	0	0	0	0			
Пырей удлиненный	272, 277, 285, 292	143, 210, 223,	98, 100, 154	0	0	0	0			
Истра 1	240	130, 145, 226, 229,	100, 154, 172							

ненного. Маркер Xgwm428 ни на пырее среднем, ни на пырее удлинённом фрагментов не показал. Таким образом, из 37 SSR-маркеров генома пшеницы могут быть использованы 29 маркеров для анализа генома пырея среднего и 32 маркера для пырея удлинённого.

Успешные результаты по адаптации SSR-маркеров пшеницы для анализа геномов пырея позволили провести оценку их эффективности на модельном пшенично-пырейном гибриде Истра 1, полученном с участием различных видов пырея и сортов пшеницы [1]. Сорт ППГ Истра 1 хорошо изучен с агрономической, ботанической, технологической и фитопатологической точек зрения. Кроме того, данный сорт получил подробную молекулярно-цитогенетическую характеристику пырейных хромосом [3]. У пырея среднего, пырея удлинённого и Истры 1 среди продуктов ПЦР были отмечены фрагменты, близкие по размеру к пшенице у следующих SSR-маркеров: Xcfd168, Xgwm382, Xgwm642, Xgwm341, Xgwm319, Xgwm397, Xgwm149, Xgwm268, Xgwm111, Xgwm232, Xgwm71, Xgwm52, Xwmc153. У SSR-маркеров Xgdm8, Xgwm157, Xgwm469 и Xgwm484 среди ампликонов наблюдались фрагменты, общие у пырея удлинённого, пшеницы и Истры 1. Так как данные микросателлитные маркеры среди фрагментов давали близкие по размеру к пшеничным, а полная родословная данного образца неизвестна, то при анализе ППГ нельзя достоверно установить, амплифицируются они с пшеничного или пырейного геномов.

У микросателлитных маркеров Xgwm46, Xgwm340, Xgwm314, Xgwm156, Xgwm292 среди ампликонов были отмечены фрагменты, общие у пырея среднего, удлинённого и Истры 1, однако не встречающиеся у пшеницы (таблица, бэнды выделены жирным курсивом). Для маркера Xwmc221 кроме основного (226 п.н.) нами было установлено наличие дополнительного пика у Истры 1 размером 229 п.н., который также встречался и у других ППГ, и у пырея понтийского, но отсутствовал у пшеницы. Маркер Xwmc221 ранее использовался для картирования пшенично-пырейной транслокации и давал полиморфизм по бэндам между пшеницей и пыреем [4]. Маркер Xgwm325, согласно литературным данным, даёт специфичный в целом для пырейного генома бэнд размером 100 п.н. [15]. В нашей работе на Истре 1 он не наблюдался, однако был отмечен на пырее среднем и пырее удлинённом (см. табл.).

Таким образом, нами было выявлено 6 микросателлитных маркеров, дающих фрагменты у пырея среднего и/или удлинённого и Истры 1, отсутствующие у пшеницы. Так как различные ППГ отличаются друг от друга составом пырейных хромосом, данная группа маркеров может быть использована при оценке разнообразия пырейного генома в коллекциях ППГ, а также при проведении селекционных скрещиваний с целью отслеживания передачи хромосом пырея. Эти маркеры локализованы на всех семи гомеологичных группах пшеницы, кроме второй и четвёртой (таблица). Возможно, они локализованы на соответствующих гомеологичных группах пырея, что позволяет в дальнейшем их использовать при создании дополненных или замещенных линий по конкретной паре хромосом на основе ППГ.

У маркеров Xgwm335, Xcfd68, Xgwm493, Xgwm538 и Xwmc170 среди фрагментов амплификации на пырее среднем и удлинённом не было обнаружено близких по размеру к пшенице и ППГ. Благодаря их отличию от пшеничных фрагментов они также могут быть использованы при работе с отдалёнными гибридами и интрогрессионными линиями.

Выводы

1. Из 37 SSR-маркеров мягкой пшеницы для анализа генома пырея среднего адаптировано 29, для генома пырея удлинённого — 32.

2. В пшенично-пырейном гибриде Истра 1 показана амплификация пырей-специфичных фрагментов для шести SSR-маркеров (Xgwm46, Xgwm340, Xgwm314, Xgwm156, Xgwm292, Xwmc221).

3. Отобрано 11 SSR-маркеров (Xgwm46, Xgwm340, Xgwm314, Xgwm156, Xgwm292, Xwmc221, Xgwm335, Xcfd68, Xgwm493, Xgwm538, Xwmc170 и Xgwm325), дающих специфичные фрагменты в геноме пырея, которые могут быть использованы при анализе пшенично-пырейных гибридов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России», государственный контракт ГК П1048.

Библиографический список

1. Белов В.И., Иванова Л.П. Улучшение продуктивности октоплоидных промежуточных ППГ // Отдален. гибридизация. М.: Изд-во ТСХА, 2001. С. 166–177.

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

3. Крутин П.Ю., Дивашук М.Г., Белов В.И., Глухова Л.И., Александров О.С., Карлов Г.И. Сравнительная молекулярно-цитогенетическая характеристика промежуточных пшенично-пырейных гибридов // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 492–498.

4. Avala-Navarrete L., Tourton E., Mechanicos A.A., Larkin P.J. Comparison of *Thinopyrum intermedium* derivatives carrying barley yellow dwarf virus resistance in wheat // Genome, 2009. Vol. 52. P. 537–546.

5. Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences // Genetics, 1986. Vol. 112. P. 887–898.

6. Fedak G., Han F. Characterization of derivatives from wheat–*Thinopyrum* wide crosses // Cytogenet. Genome Res., 2005. Vol. 109. P. 360–367.

7. Lammer D., Cai X., Arterburn M., Chatelain J., Murray T., Jones S. A single chromosome addition from *Thinopyrum elongatum* confers a polycarpic, perennial habit to annual wheat // Journal of Experimental Botany, 2004. Vol. 55. №. 403. Pp. 1715–1720.

8. Larkin P.J., Banks P.M., Lagudah E.S., Apple R., Chen X., Xin Z.Y., Ohm H.W., McIntosh R.A. Disomic *Thinopyrum intermedium* addition lines in wheat with barley yellow dwarf virus resistance and with rust resistances // Genome, 1995. Vol. 38. P. 385–394.

9. Newell M., Larkin P., Hayes R., Norton M. Evaluation of perennial wheat germplasm in an Australian environment // “Food Security from Sustainable 7. Agriculture” Proceedings of the 15th Australian Agronomy Conference (Eds H Dove & R. Culvenor). 15–18th November, 2010. Lincoln, Christchurch, New Zealand. Australian Society of Agronomy: http://www.regional.org.au/au/asa/2010/crop-production/physiology-breeding/6906_newellmt.htm

10. Röder M.S., Huang X.-Q., Ganai M.W. Wheat Microsatellites: Potential and Implications // Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement / Biotechnology in Agriculture and Forestry, 2005. Vol. 55. P. 255–266.

11. Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.-H., Leroy P., Ganai M.W. A Microsatellite Map of Wheat // Genetics, 1998. 149. P. 2007–2023

12. Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments // Nature Biotechnology, 2000. Vol. 18. http://www.nature.com/nbt/journal/v18/n2/full/nbt0200_233.html

13. Sepsí A, Molnár I, Molnár-Láng M. Physical mapping of a 7A.7D translocation in the wheat–*Thinopyrum ponticum* partial amphiploid BE-1 using multicolour genomic *in situ* hybridization and microsatellite marker analysis. // Genome, 2009. Vol.52. P. 748–754.

14. Wang L.-M., Li X.-F., Liu S.-B., Wang H.-G. Studies on the Transferability of Common Wheat (*T. aestivum*) Microsatellites (SSR) Markers Used in *Thinopyrum intermedium* // Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 2007-06

15. You M.-S., Li B.-Y., Tian Z.-H., Tang Z.-H., Liu S.-B., Liu G.-T. Development of specific SSR marker for Ee genome of *Thinopyrum spp.* using wheat microsatellites // Chinese Journal of Agricultural Biotechnology. 2004. 1. P. 143–148.

16. <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>

Рецензент — д. б. н. В.В. ПЫЛЬНОВ

SUMMARY

Microsatellite wheat markers for genome analysis of both wheatgrass and intermediate wheatgrass are adapted. As a result of research done, out of 37 wheat markers for genome analysis of intermediate wheatgrass 29 markers have been adapted, whereas 32 markers have been adapted for wheatgrass. In wheat-wheatgrass hybrid Istra 1 for six markers (Xgwm46, Xgwm340, Xgwm314, Xgwm156, Xgwm292, Xwmc221) amplification of fragments, typical of wheatgrass, is shown. The results given can be used for both wheatgrass and intermediate wheatgrass genome study, and also in selection work with wheat-wheatgrass hybrids.

Key words: soft wheat, intermediate wheatgrass, wheatgrass, wheat-wheatgrass hybrid, remote hybridization, SSR-markers, microsatellite markers.

Крупин Павел Юрьевич — Тел. (499) 977-72-01.

Эл. почта: pavelkroupin1985@mail.com

Дивашук Михаил Георгиевич — к. б. н. Тел. (499) 977-72-01.

Фесенко Игорь Александрович — к. б. н. Тел. (499) 977-72-01.

Карлов Геннадий Иванович — д. б. н. Тел. (499) 977-72-01.

Эл. почта: karlov@timacad.ru