

БИОТЕХНОЛОГИЯ, ГЕНЕТИКА

Известия ТСХА, выпуск 3, 2009 год

УДК 631.527.5:633.112.9

МОЛЕКУЛЯРНО-ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ТРИТИКАЛЕ, МЕЖАМФИПЛОИДНОГО ГИБРИДА И ПЕРСПЕКТИВНЫХ ЛИНИЙ СЕЛЕКЦИИ НИИСХ ЮГО-ВОСТОКА

П.Ю. КРУПИН, М.Г. ДИВАШУК, О.В. ХОМЯКОВА*, Т.И. ДЬЯЧУК*, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии)

С помощью молекулярных маркеров и геномной *in situ* гибридизации были изучены первичные тритикале, межамфиплоидный гибрид (МАГ) и перспективные линии тритикале селекции НИИСХ Юго-Востока. Было показано, что четыре генотипа (первичные амфидиплоиды АД-1, АД-3, и две перспективные линии 491-07 и 497-07) обладают стандартной геномной конституцией гексаплоидных тритикале. Предполагаемый октаплоид АД-4 оказался пшеничным гексаплоидом с интрогрессией хроматина ржи в субтеломеру одной пары хромосом. Межамфиплоидный гибрид ОГ представляет собой совокупность линий различной геномной конституции, однако большинство растений несут 1D/1R замещение, что открывает широкие перспективы его использования в селекции на улучшение качества зерна тритикале.

Ключевые слова: Тритикале, цитогенетика, геномная *in situ* гибридизация, ДНК-маркеры.

В решении проблем производства зерна особую роль может играть внедрение в производство новых видов зерновых культур. Последние должны быть более конкурентоспособными по сравнению с существующими видами, иметь высокую питательную ценность зерна и сочетать высокий потенциал продуктивности с устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам. Особый интерес в этом плане может играть тритикале — межродовой амфидиплоид, сочетающий хозяйственно ценные признаки двух видов: пшеницы и ржи. Эта культура уже завоевала популярность во многих регионах мира.

Основное использование культуры тритикале — зернокармликовое. Одновременно эта культура признана и как продовольственная. Однако при-

менение тритикале в чистом виде для целей хлебопечения ограничено из-за низкого содержания клейковины и ее плохого качества. В связи с этим проводятся интенсивные разработки технологии получения хлебулочных изделий на основе тритикалевой муки, которая обладает высокой пищевой и биологической ценностью. Хлеб высокого качества из гексаплоидных тритикале можно приготовить из смеси муки тритикале (70%) и сильной пшеницы (30%) или же это соотношение составляет 1:1 [2,4].

Генетическое улучшение сортов тритикале по хлебопекарным качествам предполагает две возможности. Первая из них — наиболее доступная для практической селекции — это получение замещений 1D/1R, которые

* Лаборатория клеточной селекции ГНУ НИИСХ Юго-Востока.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» ГК № 02.740.11.0286 с использованием оборудования Центра коллективного пользования.

можно осуществить при межамфилоидных скрещиваниях или при скрещивании гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей. При этом с хромосомой 1D привносятся локусы запасных белков *GU-1* и *Glu-1*, а элиминация целой хромосомы 1R с локусами *Sec-1* на ее коротком плече и *Sec-3* на длинном обеспечивает улучшение хлебопекарных качеств [15].

Второй — более сложный путь — включает цитогенетическую инженерию хромосомы 1R с получением точковых транслокаций в нужных местах [12]. Наряду с привнесенными локусами *GU-1* и *Glu-1* сохраняются участки хромосомы 1R, положительно влияющие на мощность развития корневой системы и другие адаптивные признаки.

Для создания экологически приспособленных сортов тритикале в рекомбинационной селекции первостепенное значение имеет использование генетически разнообразного исходного материала и в первую очередь местного генофонда пшеницы и ржи новейшей селекции. В русле данной селекционной программы в НИИСХ Юго-Востока были получены первичные тритикале, межамфилоидный гибрид и перспективные линии тритикале: 491-07 и 497-07.

Проведение селекционно-генетической работы с любой культурой требует сопровождения цитогенетическими исследованиями. В случае тритикале такие исследования еще более актуальны в виду ее аллополиплоидной природы. Кроме того, для тритикале показано широкое использование хромосомных замещений и транслокаций с уменьшением доли генетического материала ржи, что позволяет решать многие проблемы, характерные для тритикале [6, 19]. Важным этапом в селекционной работе с формами тритикале является выявление и четкая идентификация возможных замещений или транслокаций с определением вовлеченных хромосом.

Цель данной работы — молекулярно-цитогенетическая характеристика форм тритикале, созданных в НИИСХ Юго-Востока и находящихся на различных этапах селекционного процесса.

Материалы и методы

Растительный материал. Семена первичных тритикале АД-1, АД-3, АД-4, межамфилоидного гибрида (МАГ) и перспективных линий тритикале 491-07 и 497-07 были предоставлены для анализа ГНУ НИИСХ Юго-Востока. Первичные тритикале АД-1 и АД-3, полученные путем гибридизации твердой пшеницы и сорта ржи Саратовская 6, отличающегося засухо- и морозостойкостью, высокой урожайностью и устойчивостью к мучнистой росе. Для получения предположительно октоплоидного тритикале АД-4 материнской формой служила линия озимой мягкой пшеницы селекции НИИСХ Юго-Востока (Л.15/Белоцерковская 51)/(Л.15/Мироновская 25). В качестве опылителя служила диплоидная рожь Саратовская 6. Межамфилоидный гибрид создан от скрещивания первичных тритикале разного уровня плоидности. Первичные гексаплоидные тритикале получены от скрещивания сортообразца озимой твердой пшеницы селекции Краснодарского НИИСХ Леукурум 1701 h389 с диплоидной рожью Саратовская 6 селекции НИИСХ Юго-Востока. Линии 491-07 и 497-7, находящиеся на заключительном этапе селекционного процесса, отличаются скороспелостью, засухоустойчивостью и высокой массой 1000 зерен.

Выделение ДНК. ДНК выделяли из молодых листьев и корешков по методу Bernatzky и Tanksley (1986) с некоторыми модификациями. Размер выделенной ДНК и степень загрязненности РНК оценивали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле [1]. Анализ наличия хромосом генома D у образцов выполняли по описанной ранее методике [1] с помощью следующих SSR-маркеров: Xbarcl49, Xbarc271,

Xwmc111, Xgwm349, Xbarc6, Xbarc270, Xwmc285, Xbarc1183, Xwmc233, Xbarc110, Xbarc196, XbarcЮ30, Xwmc432 [20], STS-маркероBSec1, Sec2[11], рожь-специфичного маркера [9], STS-маркера на аллельное состояние локуса Glu-D1 [7].

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

Продукты ПЦР разделяли в 2%-м агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 V/см. В качестве маркера размеров использовали «100 bp leader» (Fermentas). После окрашивания бромистым этидием продукты ПЦР визуализировали с помощью трансиллюминатора и документировали цифровой камерой «NIKON».

Геномная in situ гибридизация. Геномную in situ гибридизацию осуществляли по стандартной методике [8] с некоторыми модификациями. Хромосомы контрокрашивали пропидий-йодидом 1 мг/мл. Для визуализации сигнала использовали флуоресцентный микроскоп AxioZeiss Imager M1 с помощью специального набора фильтров (FITC). Результат документировали на фотокамеру AxioCam Mrm Zeiss

с последующим контрастированием изображения в программе Axiovision software.

Результаты и их обсуждение

Молекулярное маркирование. Первым этапом исследования был скрининг линий на наличие в их геноме хромосом D-генома и хромосом ржи. Результаты использования молекулярных маркеров представлены в таблице.

В нашей работе были использованы 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. В результате нами было показано наличие всех хромосом генома D у формы АД 4. Большинство образцов МАГ имели в своем геноме хромосому 1D. Однако следует отметить, что встречались отдельные растения, у которых отсутствовала амплификация всех микросателлитных маркеров, свойственных геному D. В линиях тритикале АД-1, АД-3, 491 и 497 хромосомы генома D обнаружены не были.

Результаты амплификации молекулярных маркеров

Маркер	Плечо Хромосомы	АД-1	АД-3	АД-4	ОГ	491-07	497-07
Xbarc 149	1DS	—	—	+	+	—	—
Xwmc432		—	—	+	+	—	—
<i>Glu-D1</i>	1DL	—	—	+	+	—	—
Xbarc 271		—	—	+	+	—	—
Xwmc 111	2DS	—	—	+	—	—	—
Xgwm349	2DL	—	—	+	—	—	—
Xbarc 6	3DS	—	—	+	—	—	—
Xbarc 270	3DL	—	—	+	—	—	—
Xwmc 285	4DS	—	—	+	—	—	—
Xbarc 1183	4DL	—	—	+	—	—	—
Xwmc233	5DS	—	—	+	—	—	—
Xbarc110	5DL	—	—	+	—	—	—
Xbarc 196	6DS	—	—	+	—	—	—
Xbarc 1030	6DL	—	—	+	—	—	—
Xwmc506	7DS	—	—	+	—	—	—
Xbarc53	7DL	—	—	+	—	—	—
RYE		+	+	+	+	+	+
Sec-1	1R	+	+	—	—	+	+
Sec-2	2R	+	+	—	+	+	+

«+» наличие амплификации, «—» отсутствие амплификации, * амплификация субъединиц «5+10».

Для выявления хроматина генома ржи мы использовали рожь-специфичный ДНК-маркер (RYE) [9]. С помощью этого маркера можно идентифицировать даже небольшие интрогрессии хроматина ржи [16]. Как видно из таблицы, во всех изучаемых формах присутствовал генетический материал ржи.

В нашей работе также использовались молекулярные маркеры на запасные белки пшеницы и ржи, оказывающие наиболее существенное влияние на хлебопекарные качества. Кодоминантный маркер на locus *Glu-D1* позволяющий альтернативно определить наличие субъединиц высокомолекулярных глютенинов «5+10» или «2+12» [7]. Одновременно данный маркер может быть использован для дополнительного подтверждения наличия хромосомы 1D. В результате скрининга форм нами было выявлено, что у АД-4 присутствуют гены, кодирующие субъединицы высокомолекулярных глютенинов «5+10». У образцов МАГ также отмечалось присутствие субъединиц «5+10». Однако, как и по микросателлитным маркерам, у этой формы наблюдалось расщепление по наличию / отсутствию амплификации.

На секалины мы использовали молекулярные STS маркеры *Seel* и *Sec2*, амплификация которых свидетельствует о наличии в геноме хромосом Ши 2R соответственно [11]. В результате было выявлено, что у гибрида ОГ отсутствует locus *secalin1*, кроме нескольких отдельных растений, а у формы АД-4 — оба локуса *secalin 1* и *secalin 2*. Во всех остальных образцах оба локуса присутствовали (таблица).

Геномная *in situ* гибридизация. Среди проанализированных методом геномной *in situ* гибридизации генотипов МАГ были выявлены следующие варианты хромосомной конституции: 28П+14Р, 30П+12Р, 30П+14Р, 36П+6Р (где П — число хромосом пшеничных геномов, Р — число хромосом ржаного генома) (рис. 1).

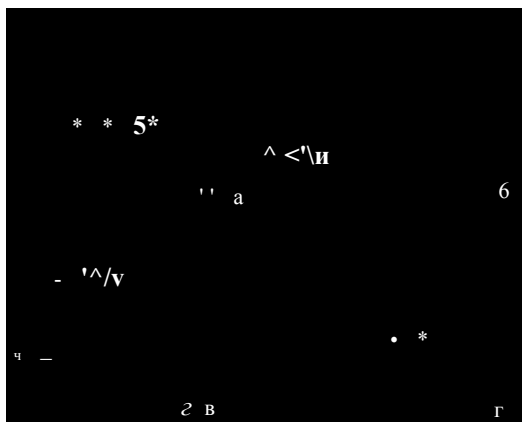


Рис. 1. Геномная *in situ* гибридизация отдельных растений гибрида ОхГ со следующим геномным составом: а — 28П+14Р, б — 30П+12Р, в — 30П+14Р, г — 36П+6Р

(П - хромосомы пшеницы, Р-хромосомы ржи. Генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы — красный.)

Первичные тритикале АД-1, АД-3 и перспективные линии 491-07 и 497-07 обладают геномной конституцией 28П+14Р (рис. 2). В линии АД-3 встречались единичные растения с набором хромосом 27П+13Р, в линии 491 — с набором 27П+13Р и 28П+15Р.

Предполагаемый октаплоидный амфидиплоид АД-4 имел в своем генотипе 42 пшеничные хромосомы, при этом одна пара хромосом в субтеломерном участке показала гибридизацию с меткой на рожь (рис. 3).

Форма ОГ. МАГ представляет собой совокупность нескольких линий, что следует из полиморфизма амплификации маркера на хромосому 1D, а также многообразия геномных вариантов, полученных в ходе геномной *in situ* гибридизации. Наличие выявленных замещений и дополнений объясняется несбалансированностью D-генома, возникающей при создании вторичных тритикале путем скрещивания окта- и гексаплоидных форм [3, 5]. Отсутствие амплификации маркера *Sec-1* на хромосому Ши наличие амплификации

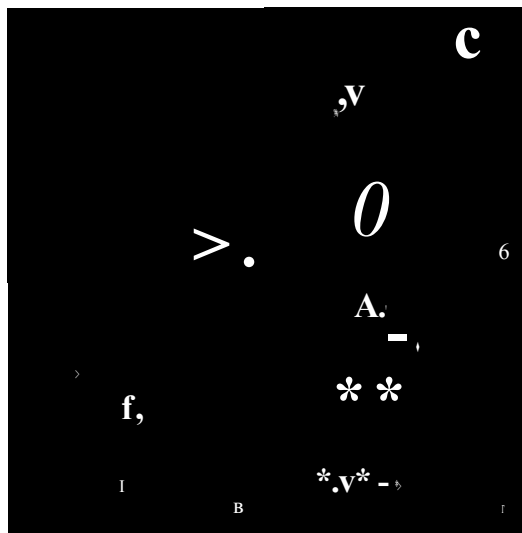


Рис. 2. Геномная *in situ* гибридизация линий тритикале: а — АД-1, б — АД-3, в — 497, г — 491 (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы — красный)

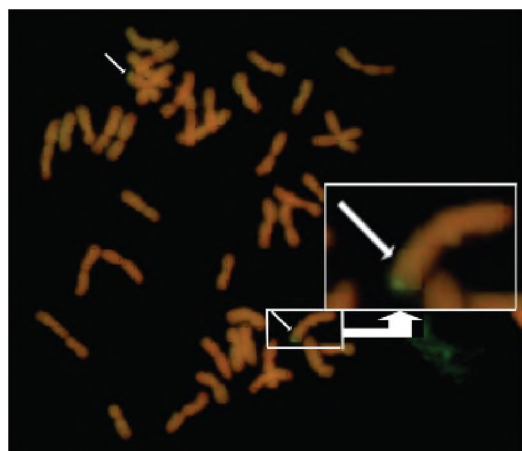


Рис. 3. Геномная *in situ* гибридизация линии тритикале АД-4 (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы — красный)

маркеров, локализованных на 1D, в совокупности с результатами геномной *in situ* гибридизации, свидетельствует о наличии в анализируемых образцах линий с гомеологичным замещением 1D(1R). В случае образца с формулой (30П+14Р), вероятно, име-

ло место дополнение, что привело к образованию этой 44-хромосомной дисомно-дополненной линии. В настоящей работе в качестве маркеров на хромосому 1D кроме микросателлитных был использован STS-маркер на аллельное состояние гена *Glu-1*. В результате было установлено, что растения МАГ несут в своём геноме аллель «5+10», который отвечает за синтез высокомолекулярных глютеинов, обеспечивающих высокие хлебопекарные качества тритикале [13]. Было продемонстрировано отсутствие амплификации маркера на белок секалин-1 (*Sec-1*), негативно влияющий на хлебопекарные качества [10]. Следовательно, из формы ОГ возможно вести отбор линий с наличием Ши отсутствием 1R-хромосомы с использованием молекулярных маркеров.

Таким образом, изучаемый МАГ представляет собой агрономически ценный селекционный материал, содержащий хромосомные перестройки, обуславливающие улучшение хлебопекарных качеств. Вместе с тем данный образец является совокупностью линий, геномная конституция которых различна. Для получения однородного материала рекомендуется проведение отбора, основанного на молекулярных и цитогенетических маркерах с последующей оценкой отобранных линий на хлебопекарные качества.

Перспективные линии 49-071, 497-07 и первичные тритикале АД-1 и АД-3. С помощью молекулярных маркеров и геномной *in situ* в генотипах линий 491-07, 497-07 и первичных тритикале АД-1 и АД-3 не было выявлено каких-либо хромосомных перестроек. Следовательно, они относятся к гексаплоидным тритикале со стандартной хромосомной конституцией, и их улучшенные свойства обусловлены удачно подобранной комбинацией пшеничных и ржаных генов. Наличие форм с нестандартным числом хромосом в линии 491-07 и пшенично-ржаном амфидиплоиде АД-3 не является для

тритикале редким явлением [18]. Кроме того, стоит отметить, что, несмотря на наличие 40- и 43-хромосомных растений, подавляющее большинство проанализированных образцов имело 42 хромосомы.

Линия АД-4. Результаты цитогенетического анализа позволяют отнести АД-4 к мягким пшеницам ($2n=42$), при этом пара хромосом её в субтеломерном регионе несёт интрогрессию генетического материала ржи (см. рис. 3). Это и обуславливает амплификацию рожь-специфичного маркера (RYE). При этом данная интрогрессия вероятнее всего уже присутствовала у родительской пшеничной формы, однако это требует дополнительных исследований. В геноме некоторых сортов пшеницы могут быть небольшие интрогрессии ржаного хроматина, даже у сортов, в родословных которых не было ржи [16]. Кроме того, на примере линии АД-4 можно видеть, что наличие амплификации рожь-специфичного маркера и маркера на

D-геном совсем не обязательно может свидетельствовать о том, что данная форма является октаплоидной тритикале. То есть использование только молекулярных маркеров без цитогенетических оценок может привести к получению ложных результатов.

Выводы

1. С помощью молекулярных маркеров и геномной *in situ* гибридизации показано, что первичные амфидиплоиды АД-1, АД-3 и две перспективные линии 491-07 и 497-07 обладают стандартной геномной конституцией гексаплоидных тритикале.

2. Предполагаемый октаплоид АД-4 оказался пшеничным гексаплоидом с интрогрессией хроматина ржи в субтеломеру одной пары хромосом.

3. Межамфидиплоидный гибрид ОГ представляет собой совокупность линий различной геномной конституции, однако большинство растений несут 1D/1R замещение, что открывает перспективы его использования в селекции на улучшение качества зерна тритикале.

Библиографический список

1. Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А. Использование микросателлитных маркеров для идентификации пшенично-ржаных транслокаций у гексаплоидной тритикале // Известия ТСХА, 2007. Вып. 1. С. 61-65.
2. Еркинбаева Р.К. Технологии хлебобулочных изделий из тритикалевой муки // Хлебопечение России, 2004. №4. С. 14-15.
3. Ригин Б.В., Орлова И.Н. Пшенично-ржаные амфидиплоиды. JL: Колос, 1977.
4. Сокол Н.В., Донченко Л.В., Храмова Н.С., Ковтуненко В.Я., Грищенко С.А. Хлебопекарные свойства из муки из тритикале и перспектива её использования // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология, 2006. №1. С. 38-39.
5. Budak H., Baenziger P.S., Beecher B.S., Graybosch R.A., Campbell B.T., Shipman M., Erayman M., Eskridge K.M. The effect of introgressions of wheat D-genome chromosomes into Presto' triticale // Euphytica, 2004. Vol. 137. №2. P. 261-270.
6. Gustafson J.P., Lukaszewski A.J., Roberts J.K. Chromosome substitutions and modifications in hexaploid triticale: a re-evaluation // Genetics and Breeding of Triticale, EUCARPIA meeting, Clermont-Ferrand, 2-5 July, 1984. P. 15-27.
7. Ishikawa G., Nakamura T. A new co-dominant PCR-based marker to identify the high-molecular-weight glutenin subunit combination «5+10» of common wheat // Wheat Information Service, 2007. 103. P. 1-4.
8. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., Lim K.B., Van Tuyl J.M. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of Liliaceae studied by genomic *in situ* hybridization (GISH) // Genome, 1999. Vol. 42. № 4. P. 681-686.

9. *Katto M.C., Endo T.R., Nasuda S.A* PCR-based marker for targeting small rye segments in wheat background // *Genes & Genetic Systems*, 2004. Vol. 79. № 4. P. 245-250.

10. *Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Lukaszewski A.J., Wesenberg D.W.* Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat, 2003. *Crop Sci.* 43: 1643-1651.

11. *Lee J.H., Graybosch R.A., 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.

12. *Lukaszewski A.J.* Cytogenetically Engineered Rye Chromosomes 1R to improve Bread-making Quality of hexaploid triticale / A.J. Lukaszewski // *Crop Sci.*, 2006. Vol. 46. P. 2183-2194.

13. *Martinek P., Vinterovdc M., Buresovda I., Vyhndnekc T.* Agronomic and quality characteristics of triticale (X Triticosecale Wittmack) with HMW glutenin subunits 5+10 // *Journal of Cereal Science*, 2008. Vol. 47, Issue 1. P. 68-78.

14. *Payne P.I.* Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on breadmaking quality *Annu. Rev. Plant Physiol*, 1987. 38: 141-153.

15. *Payne P.I., Holt L.M., Jackson E.A., Law C.N.* Wheat storage proteins: Their genetics and their potential for manipulation by plant breeding. *Philos. Trans. R. Soc. London B Biol. Sci.*, 1984. 304: 359-371.

16. *Ribeiro-Carvalho C., Guedes-Pintot H., Harrison G., Heslop-harrison J.S.* Wheat—rye chromosome translocations involving small terminal and intercalary rye chromosome segments in the Portuguese wheat landrace Barbela // *Heredity*, 1997. 78. P. 539-546.

17. *Salmon et al. FAO, Triticale improvement and production, 2004. P. 27-36.*

18. *Tsuchiya T., Larter E.N.* Further results on chromosome stability of hexaploid triticale // *Euphytica* 20 (1971) : 591-596.

19. *Zilinsky F.J.* The influence chromosome substitutions in some agronomic characteristics of hexaploid triticale // *Hodow. Rosl. Aklimat. I nasien.*, 1980. Vol. 24, № 4. S. 383-388.

20. <http://wheat.pw.usda.gov>

Рецензент — д. б. н. А.А. Соловьев

SUMMARY

The primary triticale lines, interamphiploid hybrid and perspective triticale lines have been studied by the microsatellite markers and genomic in situ hybridization. The four genotypes (the primary amphiploids AD-1 and AD-3 and the two perspective lines 491-07 and 497-07) have been shown to possess the standard genomic constitution of hexaploid triticale. The expected octaploid AD-4 has turned out to be the wheat hexaploid with the rye chromatin introgression into the subtelomere of a chromosome pair. The interamphiploid hybrid has been found to be the aggregation of the lines with the different genomic constitution. However, most of the plants of the given sample carries 1D/1R substitution which provides the opportunity to involve it in the breeding for triticale grain quality improvement.

Key words: triticale, cytogenetics, genomic in situ hybridization, DNA markers.