

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПШЕНИЧНО-РЖАНОЙ ТРАНС ЛОКАЦИИ У ГЕКСАПЛОИДНОЙ ТРИТИКАЛЕ

М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ, А.А. СОЛОВЬЕВ

(Центр молекулярной биотехнологии, кафедры генетики)

С помощью микросателлитных маркеров, специфичных для D-генома пшеницы, изучена линия гексаплоидной тритикале 131/7, несущая пшенично-ржаную транслокацию. Установлено, что в геноме линии 131/7 присутствует длинное плечо 2D хромосомы. Подобраны 3 специфичных микросателлитных маркера на вторую хромосому D генома пшеницы, которые могут быть использованы для быстрого скрининга замещений 2D/R у различных форм гексаплоидной тритикале. Гексаплоидная форма тритикале 131/7 может быть использована в селекционно-генетических программах яровой тритикале, а также для генетических исследований пшенично-ржаных транслокаций.

По данным Всемирной организации ФАО за 2004 г., посевные площади под тритикале неукоснительно растут и составляют более 3 млн га [2]. Это связано с широкими возможностями использования этой новой синтезированной человеком культуры. Одно из важных преимуществ тритикале — способность давать в сравнении с другими культурами высокий урожай, особенно на почвах с невысоким уровнем плодородия в различных климатических условиях. Основными направлениями использования тритикале являются кормовое и техническое для производства спирта [7].

Гексаплоидная тритикале объединяет в своем геноме хромосомы пшеницы (как правило геномы А и В, иногда D) и ржи (R), что позволяет проводить манипуляции как с количественным составом, так и их соотношением. Использование в селекции форм тритикале с разными хромосомными наборами позволяет решать проблему изменения качественного состава зерна тритикале, укорочения вегетационного периода и др. [4, 9]. Важное значение в селекции тритикале имеют манипуляции с хромосомами D-генома.

На кафедре генетики РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева создана коллекция форм тритикале, различающихся по уровню пloidности, геномному и хромосомному составу. Одной из наиболее интересных в генетическом и селекционном плане является линия гексаплоидной тритикале 131/7. Эта линия превосходит лучшие образцы коллекции тритикале по многим агрономически ценным признакам. Как было показано [13] методом геномной *in situ* гибридизации, линия 131/7 несет транслокацию пшеничной хромосомы в ржаную, причем короткое плечо и прицентромерная область представлена генетическим материалом ржи, а длинное плечо — генетическим материалом пшеницы. Геномная формула данного тритикале — $28П + 12R + 2R/П$ (П — пшеница, R — рожь, R/П — рекомбинантная хромосома рожь/пшеница). Также было показано, что данная линия мейотически стабильна. Это может свидетельствовать об участии в транслокации хромосомы D-генома.

Для идентификации чужеродных интрогрессий наиболее широко используются методы молекулярно-генети-

ческого маркирования. Одними из наиболее информативных являются микросателлитные маркеры.

Микросателлиты, или SSR — это участки ДНК, состоящие из tandemно повторяющихся коротких единиц размером 1-6 пар нуклеотидов, наследуемых кодоминантно [3]. Они широко распространены в геномах эукариот и имеют высокий уровень полиморфности. Микросателлиты могут быть расположены в кодирующих и некодирующих областях генома [10].

Среди нескольких наиболее важных систем ДНК-маркеров, микросателлитные маркеры показывают наибольший уровень полиморфизма [8]. На данный момент на пшенице и ржи построено несколько молекулярно-генетических карт сцепления с использованием микросателлитных маркеров (<http://wheat.pw.usda.gov>), причем установлено, что определенные SSR маркеры являются строго специфичными как для отдельных хромосом, так и для конкретных плеч хромосом. В этом случае по наличию или отсутствию продуктов амплификации микросателлитных маркеров после проведения полимеразной цепной реакции можно судить о наличии или отсутствии участка хромосомы, в котором картирован данный маркер.

Целью данной работы являлась идентификация пшеничного хроматина, вовлеченного в транслокацию на линии гексаплоидной тритикале 131/7, с помощью микросателлитных маркеров.

Материалы и методы

В работе использовали линию гексаплоидной тритикале 131/7; в качестве положительного контроля — мягкую пшеницу сорта Иволга, октаплоидную тритикале линию ПРАО-1, линию гексаплоидной тритикале к-1185, несущую 2D/2R замещение; в качестве отрицательного контроля — яровую рожь сорта Селенга, гексаплоидную тритикале линию 131/16, гексаплоидную тритикале линию к-1242;

а также образцы твердой пшеницы — сорт Безенчукская янтарная, линию IG-82775 и гибрид F; тритикале линия 131/7 на рожь сорта Селенга.

Тотальную ДНК выделяли по методу, описанному в [11].

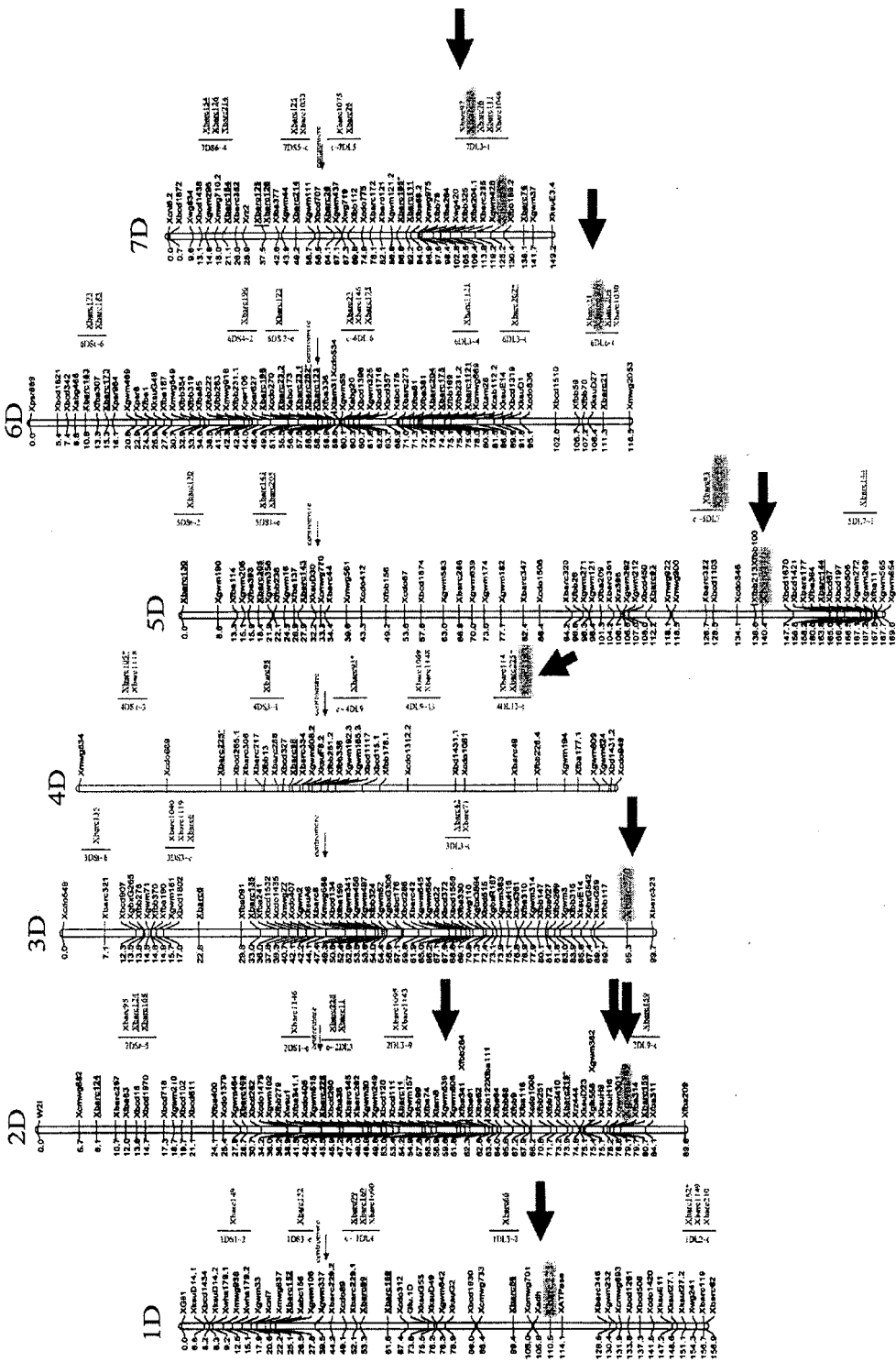
Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси. В 25 мкл ПЦР-смеси содержалось: 70 мМ Трис-НС1, рН 8,6 (25°C), 0,001% Тритон X 100, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄, 1,5 мМ Mg Cl₂, 0,25 мМ каждого dNTP (Силекс М), 0,5 мкМ каждого праймера, 100-150 нг ДНК и 1 ед. Таq-полимеразы («Силекс М», Москва).

Для проведения анализов были отобраны следующие микросателлитные маркеры, специфичные для длинных плеч хромосом D-генома: Xbarc271 — 1DL; Xgwm349, Xgwm539, Xgwm301 — 2DL; Xbarc270 — 3DL; Xbarcll83 — 4DL; XbarcllO — 5DL; Xbarc96 — 6DL; Xbarc53 — 7DL.

Праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол», Москва. Условия ПЦР: t 94,0°C — 2 мин, далее 35 циклов t 94,0°C — 1 мин, температура, специфичная для каждой пары праймеров — 45 с, t 72,0°C — 30 с, конечная элонгация t 72,0°C — 7 мин. ПЦР проводили на амплификаторах «Терцик-МЦ2» («ДНК-Технология», Москва). Детекцию полученных результатов проводили в 2%-м агарозном геле.

Результаты и их обсуждение

На основании литературных данных были выбраны микросателлитные маркеры, специфичные для длинного плеча каждой хромосомы D-генома: Xbarc271 — 1DL, Xgwm349 — 2DL; Xbarc270 — 3DL; Xbarcll83 — 4DL; XbarcllO — 5DL; Xbarc96 — 6DL; Xbarc53 — 7DL (рис. 1). На рис. 1 стрелками показаны использованные в нашей работе микросателлитные маркеры. По карте сцепления можно увидеть, что все они расположены в дистальной части длинных плеч хромосом, что должно обеспечивать их амплифи-



Молекулярно-генетическая карта D-генама (<http://wheat.pw.usda.gov>). Стрелкой указано расположение использованных в ра-
боте маркеров

кацию при вовлечении того или иного плеча хромосомы в изучаемую нами транслокацию.

В качестве контроля нормального прохождения ПЦР использованы мягкая пшеница сорта Иволга и октаплоидная тритикале — линия ПРАО-1, имеющие в своем составе все хромосомы D-генома. В контрольных образцах используемые нами SSR маркеры демонстрировали наличие ПЦР-продукта после амплификации.

После проведения полимеразной цепной реакции и электрофореза ампликонов результатов в 2%-м агарозном геле получены следующие результаты на линии 131/7. Хромосомноспецифичные микросателлитные маркеры D — генома Xbarc271 (1D), Xbarc270 (3D), Xbarcl 183 (4D), Xbarcl10 (5D), Xbarc96 (6D), Xbarc53 (7D) отсутствуют в геноме линии гексаплоидного тритикале 131/7. После проведения ПЦР на микросателлитный маркер Xgwm349, являющийся специфичным для 2DL, обнаружено, что у линии 131/7 амплифицируется фрагмент ожидаемого размера 243 бп (рис. 2).

На рис. 2 представлены результаты электрофореза в агарозном геле после амплификации с праймерами маркера Xgwm349 на ряде образцов. Как можно видеть, продукт амплификации маркера Xgwm349 отсутствует у следую-

щих образцов: гексаплоидная тритикале (геномный состав AABBRR), твердая пшеница (геномный состав AABB). В то же время продукт амплификации присутствовал у следующих образцов: мягкая пшеница (геномный состав AABBDD), октаплоидная тритикале (геномный состав AABBDDRR), линия к-1185 — гексаплоидная тритикале, несущая 2D/2R замещение, линия гексаплоидной тритикале 131/7 и у гибридов линии 131/7 с рожью. Полученные результаты свидетельствуют, во-первых, о том, что данный маркер является специфичным для 2D хромосомы (амплификация на замещенной форме к-1185 и отсутствие амплификации на полнокомплектных гексаплоидных образцах тритикале), во-вторых, что линия гексаплоидной тритикале 131/7 несет в своем геноме длинное плечо 2D хромосомы. Следует отметить, что в настоящее время в длинном плече 2D хромосомы пшеницы уже картирован ряд хозяйственно ценных признаков [1, 5, 6, 12].

Для проверки полученных результатов нами были подобраны дополнительно еще два микросателлитных маркера, специфичных для длинного плеча 2D хромосомы — Xgwm539 и Xgwm301. Результаты электрофореза приведены на рис. 3, из которого видно, что маркеры Xgwm539 и Xgwm301



Рис. 2. Результаты ПЦР на маркер Xgwm349. Д-2-1а, Д-2-16 — мягкая пшеница сорта Иволга; Д-6-1 — октаплоидная тритикале линия ПРАО-1; Д-8-1а, Д-8-1-6 — гексаплоидная тритикале линия 131/16; Д-12-1а, Д-12-16 — твердая пшеница сорта Безенчукская янтарная; Д-7-1а, Д-7-16 — твердая пшеница линия IG-82775; Д-13-1а — гибрид F, 31/7 x рожь сорта Селенга; Ч.Т.-1, Ч.Т.-2 — гексаплоидная тритикале линия к-1242; к-1185 — линия гексаплоидная тритикале с 2D/2R замещением; Т-2, Т-3, Т-4, Т-5, Т-6, Т-7 — гексаплоидная тритикале линия 131/7

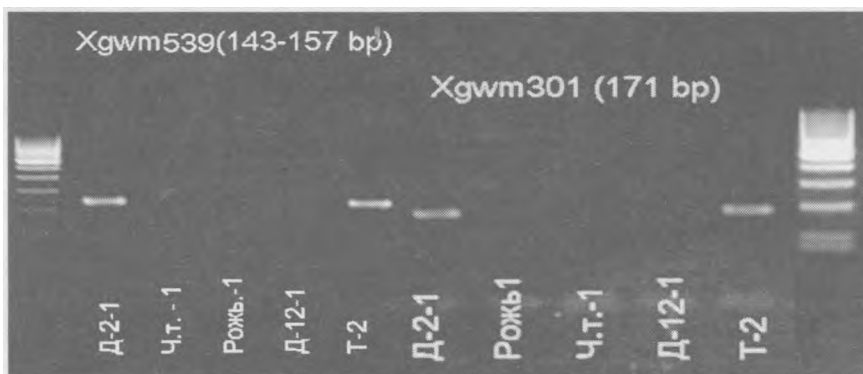


Рис. 3. Результаты ПЦР на Xgwm539 и Xgwm301. Д-2-1 — мягкая пшеница сорта Иволга; Д-12-1 — твердая пшеница сорта Безенчукская янтарная; Ч.Т.-1 — гексаплоидная тритикале линия к-1242; Рожь-1 — яровая рожь сорта Селенга; Т-2 — гексаплоидная тритикале линия 131/7

присутствуют в геноме линии гексаплоидной тритикале 131/7, это подтверждает результаты, полученные с маркером Xgwm349.

Таким образом, линия гексаплоидного тритикале 131/7 несет в своем геноме длинное плечо 2D хромосомы. Подобраны 3 специфических микросателлитных маркера на вторую хромосому D-генома пшеницы, которые могут быть использованы для быстрого скрининга 2D/R-замещений и транслокаций с участием 2D хромосомы у различных форм гексаплоидной тритикале.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Bresghello Flavio, Sorrells Mark E.* // *Genetics*, 2006, 172: 1165-1177. — 2. *FAO Plant Production and Protection Paper*. 179. *Triticale improvement and production*. Ed. M. Mergoum. FAO, Rome, 2004. — 3. *Johansson M., Ellegren H., Andersson L.* // *Heredity*, 1992, 83, 196—198. — 4. *Lukaszevski A.I.* // *Genome*,

1994, 37, 945-949. — 5. *Mardi M., Buerstmayr H., Ghareyazie B. et al.* // *Plant Breeding*, 2005, 124, 329-333. — 6. *Prasad M., Varshney R.K., Kumar A. et al.* // *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99:341-345. — 7. *Preifer W.A.* // *Triticale: Today and Tomorrow*, 1996, 551-580. — 8. *Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M. et al.* // *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95, 714-722. — 9. *Schlegel R.* // *Triticale: Today and Tomorrow*, 1996, 25-31. — 10. *Tyih G., G6sp6ri Z., Jurka J.* // *Genome Research*, 2000, 10, 967-981. — 11. *Van der Beek J.G., Verkerk K., Zabel P., Lindhout P.* // *Theoretical and Applied Genetics*, 1991, 84: 106-112,— 12. *Varshney R.K., Prasad M., Roy J.K. et al.* // *Cereal Research Communications*, 2001, 29(1-2), 33-40. — 13. *Карлов Г.И., Андреева Г.Н., Хрусталева Л.И., Соловьев А.А.* Характеристика линии тритикале, несущей пшенично-ржаную транслокацию // *Сельскохозяйственная биотехнология*. Изб. работы. Т. 1. М.: Воскресение, 2000. С. 39-43. — 14. Материалы сайта <http://wheat.pw.usda.gov>

SUMMARY

With the help of microsatellite markers, specific for wheat D-genome, hexaploid triticale 131/7 line having wheat-rye translocation has been studied. Three specific microsatellite markers for the second chromosome of wheat D-genome have been sorted out that can be used for quick screening of 2D/R substitutions with various forms of hexaploid triticale hybrid. The presence of 'long shoulder' of 2D chromosome has been found out. Hexaploid triticale 131/7 form can be used in genetic selection programmes of spring triticale and also for genetic research into wheat-rye translocations.