

УДК 631.527:633.11

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PLUG-МАРКЕРОВ ДЛЯ АНАЛИЗА КОЛЛЕКЦИИ ДИСОМНО ДОПОЛНЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ХРОМОСОМАМИ *DASYPYRUM VILLOSUM*

П.А. СОКОЛОВ¹, П.Ю. КРУПИН^{1,2}, М.Г. ДИВАШУК^{1,2}, Г.И. КАРЛОВ^{1,2}

(¹ РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева;
² ВНИИ Сельскохозяйственной биотехнологии)

*Мягкая пшеница является одной из наиболее распространенных возделываемых сельскохозяйственных культур. В связи с обеднением ее генофонда происходит снижение устойчивости к заболеваниям и, как следствие, существенные потери урожая. Одним из возможных путей решения данной проблемы является использование отдаленной гибридизации. Ценным донором генов устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам является дикорастущий сородич пшеницы *Dasyrium villosum*. Использование дисомно дополненных линий облегчает перенос генов хозяйственно-ценных признаков от этого вида в мягкую пшеницу. Успех переноса чужеродного генетического материала при межвидовой гибридизации зависит от возможности его эффективного контроля. В данной работе проведены исследования по созданию набора хромосом-специфичных PLUG (PCR-based Landmark Unique Gene) маркеров для эффективного выявления генетического материала *D. villosum* в геномном окружении мягкой пшеницы. Верификация набора проведена на коллекции дисомно дополненных линий мягкой пшеницы с хромосомами *D. villosum*. Показана эффективность двух V-геном-специфичных SCAR-маркеров *DV1* и *Dbc11* для первичной идентификации линий пшеницы, несущих генетический материал *D. villosum*. Из 37 хромосом-специфичных PLUG-маркеров, отобранных на различные делеционные участки хромосом мягкой пшеницы, 12 маркеров пригодны для успешного выявления хроматина *D. villosum* в генетическом бэкграунде *T. aestivum*. В результате исследования предложен набор PLUG-маркеров пшеницы, позволяющих выявить все гомеологичные хромосомы *D. villosum* в геномном окружении пшеницы.*

Ключевые слова: *мягкая пшеница, *Dasyrium villosum*, дисомно дополненные линии, отдаленная гибридизация, чужеродный генетический материал, молекулярные маркеры, SCAR, PLUG, ПЦР.*

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L., $2n=42$) является одной из самых древних возделываемых человечеством культур. По данным FAO, мировое потребление пшеницы в 2015–2016 гг. составило 714,6 млн т, а в 2016–2017 гг. прогнозируется повышение потребления еще на 21,9 млн т [6]. Ввиду быстрых темпов внутривидовых эволюционных преобразований фитопатогенов и отсутствия в генофонде пшеницы эффективных генов устойчивости к ряду биотических и абиотических факторов внешней среды потенциал роста производства пшеницы в настоящее время ограничен. Для решения этой проблемы активно ведется поиск новых генов устойчивости в дикорастущих сородичах пшеницы и их интрогрессия в ее геном.

Ценным донором таких генов является *Dasyphyrum villosum* (L.) Candargy (syn. *Haynaldia villosa* (L.) Schur $2n=14$, V-геном) – многолетний дикорастущий злак, распространенный в Средиземноморском регионе, на юге России, Румынии и Венгрии [3]. *D. villosum* является носителем гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr52*, который обеспечивает умеренную устойчивость к расе стеблевой ржавчины *Ug99* растений пшеницы [14]. Робертсоновская транслокация T6AL·6VS была использована для переноса в мягкую пшеницу из *D. villosum* гена устойчивости к мучнистой росе *Pm21* [14]. Ген устойчивости *Wss1* к вирусу веретеновидной полосатой мозаики пшеницы перенесен с помощью транслокации T4VS·4DL [18]. Благодаря изучению дисомно дополненных линий мягкой пшеницы с хромосомами *D. villosum* обнаружено наличие на хромосоме 4V-гена устойчивости к возбудителю глазковой пятнистости злаковых [13]. Также отмечается устойчивость *D. villosum* к засолению почв и засухе, а также зимостойкость, высокое содержание белка в зерне, хорошая способность к кущению [5]. Анализ возможности использования генетического материала *D. villosum* для дальнейшего его применения в селекции пшеницы продолжается. Созданные на основе *D. villosum* дополненные и замещенные линии пшеницы являются ценным материалом для таких исследований и направленного переноса генов хозяйственно-ценных признаков. При этом важно иметь инструмент для быстрого и эффективного мониторинга генетического материала *D. villosum* в геноме пшеницы.

Молекулярные PLUG (PCR-based Landmark Unique Gene) маркеры пшеницы разработаны Ishikawa с соавторами в 2007 г. [10] на основе консерватизма ортологичных генов пшеницы и риса. Праймеры подбираются на участки экзонов, фланкирующие интрон. Экзоны злаковых отличаются высоким консерватизмом и благодаря высокой степени гомологии PLUG-маркеры, разработанные для мягкой пшеницы, могут амплифицироваться и на близких ей видах. А интронные участки, обладающие большой вариабельностью, позволяют отличать по размерам или нуклеотидному составу продукты амплификации разных видов. Данный тип маркеров широко применяется исследователями. В работе [15] благодаря использованию PLUG-маркеров удалось установить, что в анализируемом растительном материале присутствует замена хромосомы 6D на гомологичную хромосому 6Ai пырея среднего. Отобранные молекулярные PLUG-маркеры рекомендуются исследователями для селекции линий, полученных с участием сортов с замещением 6Ai(6D) Тулайковская 5, Тулайковская 10, Тулайковская 100. В работе [12], с помощью молекулярных PLUG-маркеров, удалось разработать наборы праймеров, способные амплифицировать последовательности ржи в геномном окружении пшеницы. Удалось локализовать 79 из 110 маркеров на всех семи хромосомах ржи (1R–7R), используя семь пшенично-ржаных дополненных и замещенных линий.

Целью данной работы является создание набора хромосом-специфичных PLUG-маркеров для эффективного выявления генетического материала *D. villosum* в геномном окружении мягкой пшеницы.

Материалы и методы

В работе использовали коллекции дисомно дополненных линий мягкой пшеницы сорта Chinese Spring хромосомами *D. villosum* сицилийской популяции (CSPDVIL 1V-7V #3). Дополненные линии созданы A.J. Lukaszewski (University of California, Riverside, CA) и любезно предоставлены Kansas State University, Department

of Plant Pathology. В качестве контролей использовали образцы *D. villosum* W6 21717 (GRIN), *T. aestivum* сорта Иволга и Таня.

Выделение ДНК

Для выделения ДНК использовали высушенные при температуре 42°C молодые листья растений, измельченные на гомогенизаторе Tissue Lyser II (Qiagen). Геномную ДНК выделяли СТАВ-методом по протоколу Doyle и Doyle [4].

ПЦР-анализ

Полимеразную цепную реакцию ставили в объеме 25 мкл реакционной смеси, содержащей геномную ДНК с концентрацией 500–1300 ng/ul, dNTP (100 mM, ЗАО «Силекс»), Taq-буфер с 25 mM MgCl₂ (ЗАО «Силекс»), прямые и обратные праймеры (15 пкмоль/мкл), Taq-полимераза colored (2,5 ед./мкл, ЗАО «Силекс»). Все праймеры были синтезированы в ЗАО «Синтол». ПЦР проводили на амплификаторе BIORADC 1000 ThermalCycler.

Для первичного анализа коллекции применяли SCAR-маркеры. V-геном-специфичные маркеры (*D. villosum*) DV1 [17] и DbC11 [11]. Использовали следующие программы амплификации. Для DV1: 94°C – 4 мин; 30 циклов (94°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с); 72°C – 10 мин; хранение – 4°C. Для DbC11: 94°C – 3 мин; 30 циклов (94°C – 1 мин, 60°C – 1 мин, 72°C – 2 мин); 72°C – 10 мин; хранение – 4°C.

ПЦР с PLUG-маркерами проводили по следующей программе: 95°C – 6 мин; 35 циклов (94°C – 30 с, 57 или 60°C – 30 с, 72°C – 30 с); 72°C – 10 мин; хранение – 4°C. Оптимальную температуру отжига подбирали для каждого из используемых молекулярных PLUG-маркеров индивидуально. В настоящем исследовании использовали 37 PLUG-маркеров: TNAC 1001 (1S); TNAC 1009 (1S); TNAC 1021 (1L); TNAC 1041 (1L); TNAC 1088 (1L); TNAC 1109 (1S); TNAC 1010 (1S); TNAC 1102 (2S); TNAC 1142 (2L); TNAC 1118 (2L); TNAC 1176 (2S); TNAC 1178 (2S); TNAC 1204 (2L); TNAC 1210 (2L); TNAC 1248 (3S); TNAC 1263 (3L); TNAC 1300 (3S); TNAC 1383 (3L); TNAC 1421 (4AS 4BL 4DL); TNAC 1428 (4AS 4BL 4DL); TNAC 1485 (5S); TNAC 1503 (5S); TNAC 1510 (4AS 4BL 4DL); TNAC 1514 (5L); TNAC 1559 (5L); TNAC 1614 (5L); TNAC 1616 (5L); TNAC 1663 (4AL 4BS 4DS); TNAC 1674 (6S); TNAC 1685 (6S); TNAC 1763 (6L); TNAC 1702 (6L); TNAC 1752 (6L); TNAC 1805 (7S); TNAC 1806 (7S); TNAC 1903 (7L); TNAC 1957 (7L) [9].

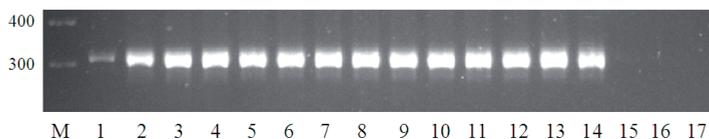


Рис. 1. Электрофореграмма ПЦР-продуктов со SCAR-маркером DV1. Дисомно дополненные линии обозначены *nVDA*, где *n* – номер гомеологической группы дополнительной пары хромосом от *D. villosum* (1V–7V), DA – disomicadditional: М – ДНК-маркер размеров 100 bp Ladder; 1 – 1VDA; 2 – 2VDA; 3, 4 – 3VDA; 5, 6 – 4VDA; 7, 8 – 5VDA; 9, 10 – 6VDA; 11, 12 – 7VDA; 13, 14 – *D. villosum*; 15, 16 – *T. Aestivum* Иволга; 17 – *T. aestivum* Таня

Для проведения рестрикционного анализа использовали следующие эндонуклеазы *TaqI*, *HaeIII*, *MspI*, *BstHII*. Продукты ПЦР инкубировали в течение 12 ч при рекомендованных производителем условиях (ООО «СибЭнзим-М»). Продукты ПЦР и рестрикции разделяли в 1,5- и 2%-ном агарозном геле, соответственно, в буфере TBE при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера молекулярных масс использовался 100 bp Ladder (Fermentas, Литва).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования была проанализирована коллекция из семи дисомно дополненных линий мягкой пшеницы с хромосомами *D. villosum*. На первом этапе была оценена эффективность использования геном-специфичных SCAR-маркеров для подтверждения наличия хроматина *D. villosum* в дополненных линиях пшеницы.

В результате ПЦР с использованием ДНК дополненных линий пшеницы со SCAR-маркерами DV1 и DbC11 наблюдалась амплификация целевых фрагментов с размерами 320 и 330 п. н., соответственно, на всех дополненных линиях. При этом амплификация с ДНК *T. aestivum* отсутствует, что свидетельствует о корректности работы маркеров на анализируемом материале.

На рис. 1 представлен пример анализа коллекции дисомно дополненных линий с помощью маркера DV1.

Далее коллекцию анализировали с помощью набора хромосом-специфичных PLUG-маркеров, которые ранее были картированы в геноме мягкой пшеницы [9]. Маркеры отбирали таким образом, чтобы они были представлены на каждом из плеч хромосом семи гомеологичных групп мягкой пшеницы. На первом этапе данной работы протестировали PLUG-маркеры на способность выявлять полиморфизм между *D. villosum* и *T. aestivum*, для чего ставили серию ПЦР с ДНК этих видов. В ходе эксперимента был выявлен перечень PLUG-маркеров, демонстрирующих полиморфизм по ПЦР-продуктам или после их рестрикции (эндонуклеазы в таком случае подбирались к маркерам индивидуально). Если на электрофореграмме ПЦР-продуктов не наблюдался полиморфизм, позволяющий детектировать в дополненных линиях наличие чужеродного хроматина, то ПЦР-продукт обрабатывали несколькими эндонуклеазами рестрикции. По результатам рестрикционного анализа выбирались эндонуклеазы для каждого PLUG-маркера, дающие полиморфные фрагменты. Из 37 PLUG-маркеров 20 оказались неэффективными, 17 маркеров успешно выявляли полиморфизм между *D. villosum* и *T. aestivum*. Видоспецифичные фрагменты *D. villosum* были выявлены с помощью следующих молекулярных маркеров: TNAC 1021 (1L) – 800, 580 п. н. *TaqI*; TNAC 1041 (1L) – 550 п. н. *TaqI*; TNAC 1088 (1L) – 380 п. н. *HaeIII*; TNAC 1009 (1S) – 600, 320 п. н. *HaeIII*; TNAC 1142 (2L) – 1000 п. н. ПЦР; TNAC 1118 (2L) – 750 п. н. *TaqI*; TNAC 1248 (3S) – 1000 п. н. ПЦР; TNAC 1421 (4AS 4BL 4DL) – 400, 320 п. н. *MspI*; TNAC 1510 (4AS 4BL 4DL) – 1300 п. н. ПЦР; TNAC 1663 (4AL 4BS 4DS) – 850 п. н. ПЦР; TNAC 1514 (5L) – 700, 300 п. н. *HaeIII*; TNAC 1614 (5L) – 700, 330 п. н. *HaeIII*; TNAC 1616 (5L) – 800 п. н. ПЦР; TNAC 1559 (5L) – 600, 300 п. н. *TaqI*; TNAC 1752 (6L) – 600 п. н. *HaeIII*; TNAC 1903 (7L) – 400 п. н. *TaqI*; TNAC 1805 (7S) – 750 п. н. *BstHII*.

На рис. 2 представлен пример детекции полиморфизма между *D. villosum* и *T. aestivum*.

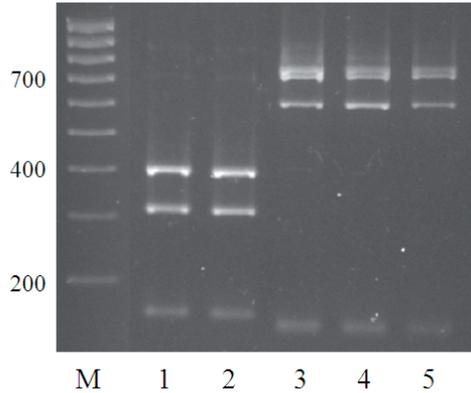


Рис. 2. Электрофореграмма продукта рестрикции с эндонуклеазой *MspI* маркера TNAC 1421 (4AS 4BL 4DL): М – ДНК-маркер размеров 100 bp Ladder; 1, 2 – *D. villosum*; 3, 4 – *T. Aestivum* Иволга; 5 – *T. Aestivum* Тяня

17 PLUG-маркеров, выявившие полиморфизм между *D. villosum* и *T. aestivum*, были использованы для анализа коллекции дополненных линий. В качестве контроля прохождения реакции нами использовалась ДНК мягкой пшеницы и *D. villosum*. 12 молекулярных маркеров выявили фрагменты, характерные для *D. villosum* на материале дополненных линий. Условия амплификации целевых фрагментов и используемые эндонуклеазы рестрикции (при необходимости) для ПЦР-продуктов каждого из 12 маркеров представлены в таблице. С пятью маркерами, локализованными на различных хромосомах, специфичных фрагментов для генома *D. villosum* выявлено не было. При этом другие PLUG-маркеры показывали наличие этих хромосом в дополненных линиях. Это может быть связано с тем, что дополненные хромосомы *D. villosum* несли делеции по этим участкам. Другим объяснением этого результата может быть преимущественная амплификация только с генома мягкой пшеницы.

На рис. 3 представлена детекция чужеродного хроматина в коллекции дисомно дополненных линий на примере PLUG-маркера TNAC1118 с рестрикцией *TaqI* и картированного на длинном плече второй гомеологичной группы (линия пшеницы, несущая хромосому 2 *D. villosum*, обозначена стрелкой). Как видно из рис. 3, на дополненной линии, несущей хромосому 2V, имеется фрагмент, характерный для *D. villosum* размером 750 п. н., отсутствующий у других дополненных линий и мягкой пшеницы. Это свидетельствует о специфичности данного маркера для хромосомы 2V и об отсутствии его кросс-амплификации.

В таблице представлены результаты исследования коллекции дисомно дополненных линий мягкой пшеницы хромосомами *D. villosum*. Указаны PLUG-маркеры, идентифицировавшие хроматин *D. villosum* в коллекции, условия и размеры фрагментов, характерных для чужеродного генетического материала в геномном окружении мягкой пшеницы.

Перенос молекулярных маркеров на *D. villosum* осуществляли ранее. Так, при анализе коллекции дисомно дополненных линий мягкой пшеницы с хромосомами *D. villosum* пшеничными микросателлитными маркерами удалось получить ампли-

**PLUG-маркеры, выявляющие хроматин *Dasypyrum villosum*
в бэкграунде *Triticum aestivum***

PLUG-маркер	Температура отжига праймеров, °С	Локализация на хромосомах мягкой пшеницы	Эндонуклеаза рестрикции	Приблизительный размер целевого фрагмента <i>D. villosum</i> , п. н.
TNAC 1088	60	1AL1BL 1DL	HaeIII	380
TNAC 1118	58	2AL 2BL 2DL	TaqI	750
TNAC 1142	55	2AL 2BL 2DL	–	1000
TNAC 1248	60	3AS3BS3DS	–	1000
TNAC 1421	58	4AS 4BL 4DL	MspI	400, 320
TNAC 1510	60	4AL 4BS 4DS	–	1300
TNAC 1559	60	5AL 5BL 5DL	TaqI	600, 300
TNAC 1614	60	5AL 5BL 5DL	HaeIII	700, 330
TNAC 1616	60	5AL 5BL 5DL	–	800
TNAC 1752	60	6AL 6BL 6DL	HaeIII	600
TNAC 1903	60	7AL 7BL 7DL	TaqI	400
TNAC 1805	60	7AS7BS7DS	BstHFI	750

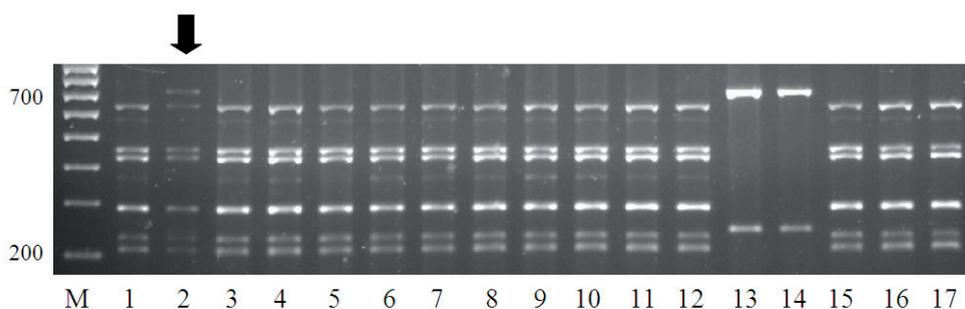


Рис. 3. Электрофореграмма продукта рестрикции с эндонуклеазой *TaqI* маркера TNAC 1118 (2L):
 М – ДНК-маркер размеров 100 bp Ladder; 1 – 1VDA; 2 – 2VDA; 3,4 – 3VDA;
 5, 6 – 4VDA; 7, 8 – 5VDA; 9, 10 – 6VDA; 11, 12 – 7VDA; 13, 14 – *D. villosum*;
 15, 16 – *T. aestivum* Иволга; 17 – *T. aestivum* Тая.
 Линия пшеницы, несущая хромосому 2 *D. villosum*,
 обозначена стрелкой

фикацию полиморфных фрагментов между мягкой пшеницей и *D. villosum* со 148 из 276 праймерами. При том, что семь праймеров дали амплификацию хромосом-специфичных фрагментов для всех гомеологичных групп *D. villosum* [19]. Перенос молекулярных PLUG-маркеров, разработанных для пшеницы на генетический материал *D. villosum*, выполнен впервые, как и их ассоциация со всеми гомеологичными группами хромосом этого дикорастущего сородича пшеницы.

Молекулярные PLUG-маркеры, разработанные для мягкой пшеницы, использованы в ряде исследований на других видах, родственных мягкой пшенице. Например, в исследованиях на *Th. elongatum* видоспецифическая амплификация была показана при постановке ПЦР с пятью парами праймеров из 46 (11% успешного переноса) [8]. В ходе эксперимента с *Secale cereale* из 144 пар праймеров, отобранных на различные делеционные участки каждой гомеологичной группы хромосом мягкой пшеницы, 110 пар праймеров показали на электрофореграммах специфичные для ржи фрагменты, а 79 из них были ассоциированы с различными хромосомами ржи (76% успешного переноса) [12]. 39 PLUG-маркеров из 46 дают фрагменты, характерные для *Pseudoroegneria spicata* и отличные от мягкой пшеницы Chinese Spring (88% успешного переноса) [7]. В результате апробации PLUG-маркеров на линиях, полученных путем отдаленной гибридизации, таких как линии пшенично-пырейных гибридов Tritipurum, была установлена возможность амплификации с этим типом маркеров фрагментов, характерных для генома конкретного вида, участвовавшего в скрещивании. 10 PLUG-маркеров из 27 обнаружили информативный фрагмент, ассоциированный с геномом E^b (37% успешного переноса) [16].

Для исследования коллекции линий мягкой пшеницы, созданных на селекционной станции им. П.И. Лисицына (РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева) с привлечением генетического материала *Triticum timopheevii*, находящихся на различных этапах селекционного процесса, были отобраны 53 молекулярных PLUG-маркера. Из них успешно выявляли полиморфизм между *T. timopheevii* и *T. aestivum* 14 наборов PLUG-маркеров. С данными маркерами успешно была верифицирована коллекция линий (26% успешного переноса) [2]. Целью исследования коллекции яровой гексаплоидной тритикале, состоящей из 86 сортов и линий, кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева было обнаружение замещения 2R/2D. Наличие замещений определялось с помощью молекулярных SSR-, STS- и PLUG-маркеров. С помощью PLUG-маркеров установлено, что линия Л2412 несет в себе замещение 2B/2D и, соответственно, является перспективной для использования ее в качестве донора в селекционном процессе, так как объединяет в себе хромосому 2R, положительно влияющую на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам окружающей среды, и хромосому 2D, на которой локализованы гены короткостебельности и чувствительности к фотопериоду [1]. В ходе эксперимента удалось получить амплификацию *D. villosum*-специфичных фрагментов у 17 маркеров из 37, но на дисомно дополненных линиях мягкой пшеницы удалось получить видоспецифичную амплификацию при работе с 12 маркерами (46% маркеров давало видоспецифичные фрагменты, 32,4% маркеров успешно апробированы на дополненных линиях). Таким образом, сравнивая с результатами других авторов, можно заключить, что PLUG-маркеры в целом достаточно успешно могут быть использованы для выявления интрогрессии чужеродного генетического материала от дикорастущих сородичей (процент успешного переноса маркеров варьируется от 11 до 88%) в геном пшеницы и являются удобным инструментом для мониторинга чужеродного генетического материала в ее геномном окружении.

Выводы

1. Из 37 отобранных для исследования PLUG-маркеров 17 детектируют полиморфизм между *D. villosum* и *T. Aestivum*.

2. 12 из 17 *D. villosum*-специфичных PLUG-маркеров помимо фрагментов, характерных для профиля мягкой пшеницы, показали специфичные фрагменты для *D. villosum* на дисомно дополненных линиях мягкой пшеницы Chinese Spring с хромосомами *D. villosum* (1 маркер на хромосому 1V, 2- на 2V, 1- на 3V, 2- на 4V, 3- на 5V, 1- на 6V, 2- на 7V).

3. Показано, что все 12 PLUG-маркеров локализованы на тех же гомеологических группах хромосом *D. villosum*, что и у *T. aestivum*.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-16-00097 от 27 января 2016 года).

Библиографический список

1. Коршунова А.Д., Дивашук М.Г., Карлов Г.И., Соловьев А.А. Распространение замещения 2R/2D среди сортообразцов яровой гексаплоидной тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) // Известия ТСХА. 2014. Вып. 6. С. 5–14.

2. Соколов П.А, Полховский А.В., Крупин П.Ю. и др. Использование PLUG-маркеров для выявления чужеродного генетического материала на разных этапах селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 3. С. 535–543.

3. Cremonini R. Cytological studies on *Dasypyrum villosum* // Dipartimento di Scienze Botaniche, 1999.

4. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bulletin. 1987. Vol. 19. P. 11–15.

5. Gradzielewska A. The genus *Dasypyrum*. Part 2: *Dasypyrum villosum*— a wild species used in wheat improvement // Euphytica. 2006. Vol. 152. P. 441–454.

6. URL: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru/>.

7. Hu L., Li G., Zhan H. et al. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat – *Thinopyrum intermedium* derivative lines // Journal of genetics. 2014. Vol. 93. No. 1. P. 69–74.

8. Hu L.J., Liu C., Zeng Z.X. et al. Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrumelongatum* revealed by mapped functional molecular markers // Genes & Genomics. 2012. Vol. 34. No. 1. P. 67–75.

9. Ishikawa G., Nakamura T., Ashida T., Saito M., Nasuda S., Endo T.R., Wu J., Matsumoto T. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers // Theoretical and Applied Genetics. 2009. Vol. 118. No. 3. P. 499–514.

10. Ishikawa G., Yonemaru J., Saito M., Nakamura T. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes // BMC genomics. 2007. Vol. 8. No. 1. P. 135.

11. Li G. R., Liu C., Wei P. et al. Chromosomal distribution of a new centromeric Ty3-gypsy retrotransposon sequence in *Dasypyrum* and related Triticeae species // Journal of Genetics. 2012. Vol. 91. No. 3. P. 343–348.

12. Li J., Endo T.R., Saito M. et al. Homoeologous relationship of rye chromosome

arms as detected with wheat PLUG markers // *Chromosoma*. 2013. Vol. 122. No. 6. P. 555–564.

13. Murray T. D., R.C. de la Pena, Yildirim A., Jones S.S. A new source of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides*, cause of eyespot disease of wheat, located on chromosome 4V of *Dasypyrum villosum* // *Plant Breeding*. 1994. Vol. 113. No. 4. P. 281–286.

14. Qi L.L., Pumphrey M.O., Friebe B. et al. A novel Robertsonian translocation event leads to transfer of a stem rust resistance gene (Sr52) effective against race Ug99 from *Dasypyrum villosum* into bread wheat // *Theoretical and applied genetics*. 2011. Vol. 123. No. 1. P. 159–167.

15. Salina E. A., Adonina I.G., Badaeva E.D. et al. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // *BMC genomics*. 2015. Vol. 204. No. 1. P. 91–101.

16. Zeinali G., Mirzaghaderi G., Badakhshan H. Genome structure and salt stress response of some segregated lines from wheat and *Tritopyrum* crosses // *Cytologia*. 2013. Vol. 78. No. 4. P. 367–377.

17. Zhang J., Long H., Pan Z. et al. Characterization of a genome-specific Gypsy-like retrotransposon sequence and development of a molecular marker specific for *Dasypyrum villosum* (L.) // *Journal of Genetics*. 2013. Vol. 92. No. 1. P. 103–108.

18. Zhang Q., Li Q., Wang X. et al. Development and characterization of a *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line T4VS·4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus // *Euphytica*. 2005. Vol. 145. No. 3. P. 317–320.

19. Zhang W., Gao A.L., Zhou B., Chen P.D. Screening and applying wheat microsatellite markers to trace individual *Haynaldia villosa* chromosomes // *Acta Genetica Sinica*. 2006. Vol. 33. No. 3. P. 236–243.

USING PLUG-MARKERS TO ANALYZE THE COLLECTION OF SOFT WHEAT LINES DISOMICALLY COMPLEMENTED WITH DASYPYRUM VILLOSUM CHROMOSOMES

P.A. SOKOLOV¹, P.YU. KRUPIN^{1,2}, M.G. DIVASHUK^{1,2}, G.I. KARLOV^{1,2}

(¹ Russian Timiryazev State Agrarian University;

²All-Russian Scientific Research Institute of Agricultural Biotechnology)

*Soft wheat is one of the most common cultivated crops. Due to the depletion of its gene pool and disease resistance, a significant loss of yields is observed. One of possible solutions to this problem is the use of remote hybridization. A valuable donor of genes for the resistance to biotic and abiotic stresses is a wild relative of *Dasypyrum villosum* wheat. The use of disomically supplemented lines facilitates the transfer of genes of economically valuable traits from this species to soft wheat. The success of the transfer of alien genetic material during interspecific hybridization depends on a possibility of its effective control. The paper outlines the results of studies conducted to develop a set of chromosome-specific PLUG (PCR-based Landmark Unique Gene) markers for the effective detection of *D. villosum* genetic material in the genomic environment of soft wheat. The set verification was carried out for a collection of disomically supplemented soft wheat lines with *D. villosum* chromosomes. The studies have shown the efficiency of two V-genome-specific SCAR markers of DVI and Dbc11 for the primary identification of wheat lines containing *D. villosum**

genetic material. 12 out of 37 chromosome-specific PLUG markers selected for different deletions of soft wheat chromosomes, have proved suitable for the successful detection of *D. villosum* chromatin in the *T. aestivum* genetic background. As a result of the study, the authors have proposed a set of PLUG wheat markers, which makes it possible to identify all the homological *D. villosum* chromosomes in the genomic environment of wheat.

Key words: soft wheat, *Dasypyrum villosum*, disomically augmented lines, distant hybridization, foreign genetic material, molecular markers, SCAR, PLUG, PCR.

References

1. Korshunova A. D., Divashuk M.G., Karlov G.I., Solovyev A.A. Rasprostraneniye zameshcheniya 2R/2D sredi sortobraztsov yarovoy geksaploidnoy tritikale (*×Triticosecale* Wittm.) [Distribution of 2R / 2D substitution among varieties of spring hexaploid triticale (*×Triticosecale* Wittm.)] // Izvestiya TSKhA. 2014. Issue 6. P. 5–14.
2. Sokolov P.A, Polkhovskiy A.V., Krupin P.Yu. i dr. Ispolzovaniye PLUG-markerov dlya vyyavleniya chuzherodnogo geneticheskogo materiala na raznykh etapakh selektsii myagkoy pshenitsy (*×Triticum aestivum* L.) [Using PLUG markers for the detection of foreign genetic material at different stages of selection of soft wheat (*×Triticum aestivum* L.)] // Selskokhozyaystvennaya biologiya. 2017. Vol. 52. No. 3. P. 535–543.
3. Cremonini R. Cytological studies on *Dasypyrum villosum* // Dipartimento di Scienze Botaniche, 1999.
4. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bulletin. 1987. Vol. 19. P. 11–15.
5. Gradzielewska A. The genus *Dasypyrum*. Part 2: *Dasypyrum villosum*– a wild species used in wheat improvement // Euphytica. 2006. Vol. 152. P. 441–454.
6. Available at: <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/ru/>.
7. Hu L., Li G., Zhan H. et al. New St-chromosome-specific molecular markers for identifying wheat – *Thinopyrum intermedium* derivative lines // Journal of genetics. 2014. Vol. 93. No. 1. P. 69–74.
8. Hu L.J., Liu C., Zeng Z.X. et al. Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrumelongatum* revealed by mapped functional molecular markers // Genes & Genomics. 2012. Vol. 34. No. 1. P. 67–75.
9. Ishikawa G., Nakamura T., Ashida T., Saito M., Nasuda S., Endo T.R., Wu J., Matsumoto T. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers // Theoretical and Applied Genetics. 2009. Vol. 118. No. 3. P. 499–514.
10. Ishikawa G., Yonemaru J., Saito M., Nakamura T. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes // BMC genomics. 2007. Vol. 8. No. 1. P. 135.
11. Li G. R., Liu C., Wei P. et al. Chromosomal distribution of a new centromeric Ty3-gypsy retrotransposon sequence in *Dasypyrum* and related Triticeae species // Journal of Genetics. 2012. Vol. 91. No. 3. P. 343–348.
12. Li J., Endo T.R., Saito M. et al. Homoeologous relationship of rye chromosome arms as detected with wheat PLUG markers // Chromosoma. 2013. Vol. 122. No. 6. P. 555–564.
13. Murray T. D., R.C. de la Pena, Yildirim A., Jones S.S. A new source of resistance to *Pseudocercospora herpotrichoides*, cause of eyespot disease of wheat, located on chromosome 4V of *Dasypyrum villosum* // Plant Breeding. 1994. Vol. 113. No. 4. P. 281–286.

14. Qi L.L., Pumphrey M.O., Friebe B. et al. A novel Robertsonian translocation event leads to transfer of a stem rust resistance gene (Sr52) effective against race Ug99 from *Dasypyrum villosum* into bread wheat // Theoretical and applied genetics. 2011. Vol. 123. No. 1. P. 159–167.

15. Salina E. A., Adonina I.G., Badaeva E.D. et al. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases // BMC genomics. 2015. Vol. 204. No. 1. P. 91–101.

16. Zeinali G., Mirzaghaderi G., Badakhshan H. Genome structure and salt stress response of some segregated lines from wheat and Tritopyrum crosses // Cytologia. 2013. Vol. 78. No. 4. P. 367–377.

17. Zhang J., Long H., Pan Z. et al. Characterization of a genome-specific Gypsy-like retrotransposon sequence and development of a molecular marker specific for *Dasypyrum villosum* (L.) // Journal of Genetics. 2013. Vol. 92. No. 1. P. 103–108.

18. Zhang Q., Li Q., Wang X. et al. Development and characterization of a *Triticum aestivum*-*Haynaldia villosa* translocation line T4VS·4DL conferring resistance to wheat spindle streak mosaic virus // Euphytica. 2005. Vol. 145. No. 3. P. 317–320.

19. Zhang W., Gao A.L., Zhou B., Chen P.D. Screening and applying wheat microsatellite markers to trace individual *Haynaldia villosa* chromosomes // Acta Genetica Sinica. 2006. Vol. 33. No. 3. P. 236–243.

Соколов Павел Андреевич – асп. РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; e-mail: pav2395147@yandex.ru).

Крупин Павел Юрьевич – к. б. н., ст. преподаватель кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

Дивашук Михаил Георгиевич – к. б. н., доц. кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

Карлов Геннадий Ильич – д. б. н., зав. Центром молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49).

Pavel A. Sokolov – Post Graduate Student, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49; e-mail: pav2395147@yandex.ru).

Pavel Yu. Krupin – PhD (Ag), Senior lecturer of Department of GE-transmission kinetics, biotechnology, breeding and seed production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49).

Mikhail G. Divashuk – PhD (Ag), Associate Professor of Department of GE-transmission kinetics, biotechnology, breeding and seed production, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49).

Gennadiy I. Karlov – DSc (Ag), Head of Center for Molecular Biotechnology, Russian Timiryazev State Agrarian University (127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 49).