

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОЦЕНКА
УРОВНЯ ПОЛИМОРФИЗМА ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
СОРТА ЗВЕЗДА И ЛИНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ЕГО ОСНОВЕ

П.Ю. КРУПИН, М.В. КЛИМУШИНА, М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ, А.А. СОЛОВЬЕВ

(Центр молекулярной биотехнологии, кафедра генетики и биотехнологии
РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

По результатам дифференциального С-окрашивания и электрофореза запасных белков было установлено, что сорт Звезда характеризуется высоким уровнем полиморфизма. В то же время линии, полученные на основе этого сорта, отличаются мономорфностью. Методами геномной гибридизации *in situ* и дифференциальным С-окрашиванием показано отсутствие интерогрессий пырея среднего в геном сорта Звезда. Установленные маркерные признаки линий Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная могут быть использованы в дальнейших селекционных программах.

Ключевые слова: отдаленная гибридизация, пшеница, пырей средний, полиморфизм внутрисортовой, дифференциальное С-окрашивание, электрофорез белков.

Высокие адаптивные качества мягкой пшеницы могут быть обусловлены различными факторами. С одной стороны, внутрисортовой полиморфизм среди сортов пшениц коррелирует с их адаптивными характеристиками [8]. Согласно оценке полиморфизма по спектру проламинов отечественные сорта можно условно разделить на три группы: полиморфные высокоадаптивные стародавние и местные сорта; с достаточно высокими адаптивными свойствами сорта 30-60-х годов; наконец, монотипные низкоадаптивные сорта 70-80-х годов [8]. Высокая адаптивность сортов позволяет их выращивать в различных эколого-географических нишах, а также обеспечивает стабильность получаемого урожая по годам [5, 6]. Среди наиболее вероятных причин внутрисортового полиморфизма исследователи называют ранний отбор (из второго поколения) элитных рас-

тений или объединение семей одной гибридной комбинации [7, 13, 15], а также биологическое и механическое засорение при первичном семеноводстве [12].

С другой стороны, одним из эффективных методов обеспечения устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды является отдаленная гибридизация мягкой пшеницы [10], в частности, с пыреем средним *Elytrigia intermedia*. Как известно, данный вид является донором устойчивости к ряду грибных и вирусных заболеваний, зимостойкости и морозоустойчивости [2, 3, 16, 18, 19, 20].

Звезда — первый из сортов озимой пшеницы, полученный в РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева методом отдаленной гибридизации с использованием ступенчатых скрещиваний F1 [*Triticum durum* (Харьковская 46) × *Elytrigia intermedia*] ×

х *T. aestivum* F1 (Мироновская 808 х х Лютеценс 329). С 1992 г. сорт районирован в Московской обл. (автор — А.А. Кондратьев). Сорт Звезда существенно превосходит по урожайности Мироновскую 808, которая является стандартом в Центральном районе Нечерноземной зоны России (ЦРНЗ), обладает высокой морозостойкостью, устойчивостью к полеганию, хорошими хлебопекарными качествами [9].

Несмотря на то, что сорт Звезда относится к третьему, современному периоду сортомены в ЦРНЗ и обладает спектром глиадинов, характерным для современных сортов селекции северных широт [14], он отличается высоким полиморфизмом как по спектрам глиадина, так и по морфологическим признакам [9, 14]. В различные годы сорт обладает стабильным уровнем урожайности вне зависимости от погодных условий. Из него были отобраны линии Звезда низкостебельная, характеризующаяся небольшой высотой стебля, и Звезда одностебельная, отличающаяся преимущественным развитием главного стебля [9].

По темпам роста и развития пшеница сорта Звезда резко отличается от стандарта и очень близка к пырею. Она формирует мощный стелющийся куст с множеством побегов за счет подавления апикального доминирования. Многолетние наблюдения свидетельствуют о большей, чем у обычных сортов, частоте появления в нем спонтанных мутантов [9]. Следовательно, высокие адаптивные свойства сорта Звезда могут быть обусловлены как ее полиморфностью, так и интрогрессией генетического материала со стороны *E. intermedia*.

Целью нашей работы являлось проведение цитогенетического анализа и оценка уровня полиморфизма сорта Звезда и линий, полученных на ее основе. Оценка полиморфизма проводилась по спектру запасных белков

и по распределению С-бэндов хромосом.

Материалы и методы

Семена сорта и линий Звезда одностебельная и низкостебельная были предоставлены А.А. Кондратьевым (Полевая опытная станция РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева). Семена пшенично-пырейного гибрида М3202 были предоставлены В.И. Беловым (Отдел отдаленной гибридизации ГБС РАН имени Н.В. Цицина).

Для исследования полиморфизма у сорта Звезда и линий, созданных на его основе, был проведен анализ спектров запасных белков с помощью SDS-электрофореза.

Анализировали случайную выборку из 100 зерен озимой пшеницы сорта Звезда и полученных на его основе линий низкостебельная и одностебельная. Тотальную экстракцию белков из эндосперма семян осуществляли в соответствии со стандартной методикой [21] с незначительными модификациями. Разделение глютеинов проводили в 12,5% SDS-PAGE при силе тока 30 тА, гель окрашивали в течение суток в 12%-м растворе трихлорацетиловой кислоты, содержащей 0,05% Commasie Brilliant Blue 250 в спирте (5% w/v) с последующей промывкой в 25%-м этаноле и 10%-й уксусной кислоте.

Для выявления интрогрессии генетического материала пырея среднего *E. intermedia* в геном сорта Звезда использовали стандартную методику дифференциального С-окрашивания с некоторыми модификациями [4]. Цитологические препараты обрабатывали насыщенным раствором Ва(ОН)₂ 6 мин при комнатной температуре, споласкивали в IN HCl 10—15 с и промывали струей проточной воды. Препараты подсушивали горячим воздухом, инкубировали в растворе 2xSSC при 60°C в течение 1 ч, промывали в проточной воде не менее 15 мин

и высушивали. Окрашивание проводили 4%-м раствором Гимза «Giemsa-Merck» (кат. № 9204) в 0,125M Tris-HCl буфере (pH=6,8). Степень окрашивания контролировали под микроскопом. Затем раствор красителя смывали струей проточной воды. Препарат сушили горячим воздухом. Сухие стекла споласкивали в метали пара-ксилоле, на препарат наносили каплю энтеллана («Merck», кат. № 7960) и накрывали покровным стеклом 22x22 мм или 24x24 мм. Из-под покровного стекла осторожно удаляли пузырьки воздуха и препараты сушили на ровной горизонтальной поверхности в течение суток [4].

Для определения наличия интрогрессии генетического материала генома *E. intermedia* в геном пшеницы также была использована геномная гибридизация *in situ* по стандартной методике с модификациями [18]. При проведении процедуры геномной гибридизации *in situ* в качестве блока использовали ДНК мягкой пшеницы, а в качестве пробы — ДНК пырея среднего. ДНК была помечена digoxigenin-11-dUTP с помощью стандартного метода ник-трансляции. ДНК-блок был получен путем автоклавирования тотальной ДНК пшеницы в течение 7 мин при давлении в 1 атм. Соотношение блок-метка составляло 1:50. Детекцию и визуализацию сигнала проводили через систему FITC-antidigoxigenin. Контрокрашивание хромосом осуществляли пропидий иодидом 1 мг/мл. Препараты анализировали на флюоресцентном микроскопе Zeiss.

Полученные перечисленными методами изображения фотографировали на цифровую камеру и анализировали в программе Adobe Photoshop.

Результаты и их обсуждение

По результатам электрофоретического анализа сорта Звезда выделено 10 биотипов, среди которых 5 биоти-

пов имели частоту встречаемости более 10% (рис. 1).

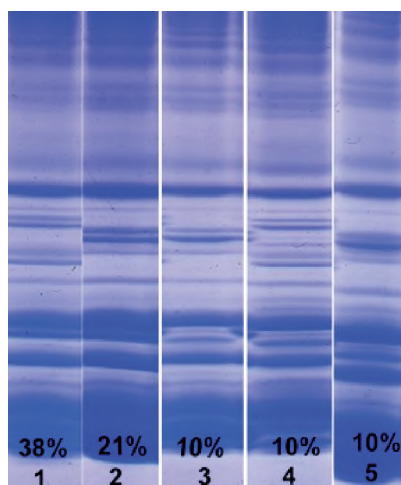


Рис. 1. Электрофоретические спектры спирторастворимых запасных белков основных биотипов (1-5) сорта Звезда

Спектры запасных белков линий Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная не показали полиморфизма, оказались идентичны и совпали со спектрами одного из выделенных биотипов сорта Звезда, частота встречаемости которого составляла 21% (рис. 2).

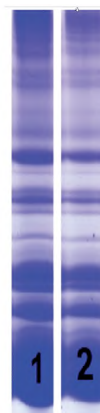


Рис. 2. Электрофоретические спектры спирторастворимых запасных белков линий Звезда одностебельная (1) и Звезда низкостебельная (2)

При составлении кариотипа сорта Звезда с использованием метода С-окрашивания было установлено, что она является гексаплоидной пшеницей и имеет диплоидный набор хромосом $2n = 42$. Фрагментов чужеродного генома данным методом не выявлено, однако установлен полиморфизм по ряду бэндов (обозначены короткими стрелочками) на хромосомах 2А, 5А, 3В (рис. 3), 6В (рис. 4), что согласуется с данными электрофореза запасных белков и анализа морфологических признаков.

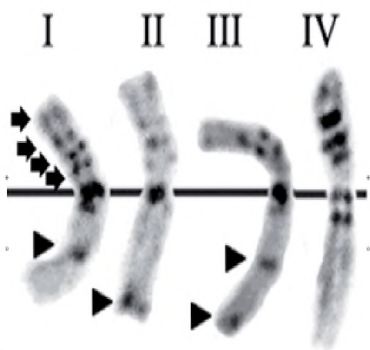


Рис. 3. Полиморфизм С-бэндов хромосомы 3В сорта Звезда

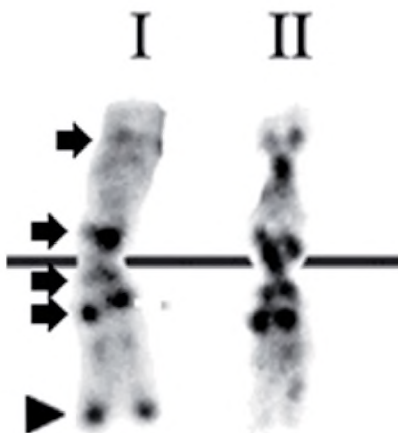


Рис. 4. Полиморфизм С-бэндов хромосомы 6В сорта Звезда

При составлении кариотипа линии Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная были установлены следующие специфические бэнды (короткими стрелочками): интерстициальный бэнд на длинном плече хромосомы 3В среди полиморфных для Звезды бэндов; теломерный бэнд на длинном плече хромосомы 6В, полиморфный для сорта Звезда. Таким образом, кариотип линий Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная характеризуются первым типом хромосомы 3В (см. рис. 3) и первым типом хромосомы 6В (см. рис. 4) в ряду полиморфизма С-бэндов. На длинном плече хромосомы 2В был выявлен небольшой теломерный бэнд у линии Звезда низкостебельная, не обнаруженный у исходного сорта (рис. 5).

Наличие в кариотипе линии Звезда одностебельная хромосомы 2В с теломерным бэндом, не обнаруженной в кариотипе сорта Звезда, может свидетельствовать как о неполном охвате всех биотипов при скрининге исходного сорта, так и о том, что данный бэнд является маркерным для данной линии, полученной методом индивидуального отбора.

Интрогрессия *E. intermedia* в геном сорта Звезда с помощью метода

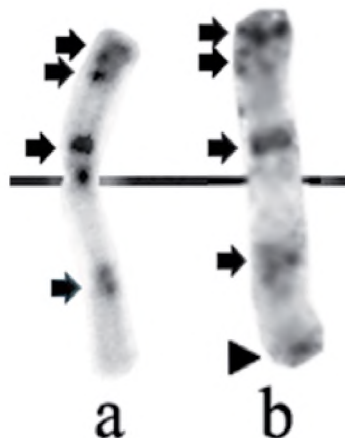


Рис. 5. Хромосома 2В сорта Звезда (а) и линии Звезда одностебельная (б)

дифференциального С-окрашивания не было идентифицировано. В связи с этим была проведена геномная гибридизация *in situ*, обладающая большей разрешающей способностью, чем С-бэндинг.

В качестве положительного контроля осуществлялась геномная гибридизация *in situ* с использованием 56-хромосомной линии М3202 (*T. aestivum* × *E. intermedia*). На метафазных пластинках М3202 при этом наблюдалось отчетливое различие между 42 пшеничными и 14 пырейными хромосомами по цвету флюоресценции (красный и зеленый соответственно, рис. 5 а). Интрогрессия *E. intermedia* в геном сорта Звезда с помощью данного метода выявлено не было (рис. 5 б). Полученные результаты можно объяснить либо отсутствием рассматриваемой интрогрессии как таковой, либо тем, что размеры интрогрессированного участка меньше предельно допустимой разрешающей способности метода геномной гибридизации *in situ*.

Сорт мягкой пшеницы Звезда относится к сортам современной селекции. Вместе с тем, он отличается

высокими адаптивными свойствами, что, по-видимому, обусловлено высокой степенью полиморфизма по ряду признаков, в т.ч., как было продемонстрировано в нашей работе, по распределению С-бэндов хромосом и спектру запасных белков семени.

Согласно полученным нами данным, линии Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная, созданные путем индивидуального отбора, характеризуются мономорфностью как по спектрам запасных белков, так и по распределению С-бэндов, в то время как исходный сорт Звезда показывает полиморфизм по этим показателям. Ряд авторов называют массовый отбор у самоопыляющихся культур как один из факторов, определяющих гетерогенность сорта [7]. Ввиду того, что при создании сорта Звезда использовался именно массовый отбор, это и можно считать наиболее вероятной причиной его полиморфности.

Н.Л. Деева предложила существующие в сорте биотипы разделить на «каркас», т.е. составляющие основу сорта, и «шельф», т.е. типы с малыми частотами [5]. Однако из года в год из-

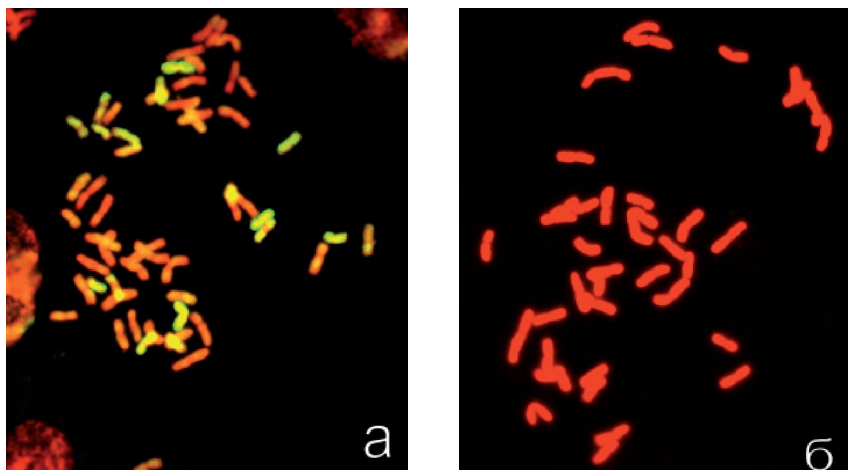


Рис. 5. Геномная гибридизация *in situ* линии пшенично-пырейного гибрида М3202 (а) и сорта Звезда (б) (генетический материал *T. aestivum* — красная флуоресценция; генетический материал *E. intermedia* — зеленая флуоресценция)

меняется как структура, так и состав сортопопуляции [1, 11, 12]. По данным В.В. Пыльнева, на основе электрофореза глиадинов у сорта Звезда был выявлен полиморфизм, что позволило выделить отдельные биотипы [12]. Полученные нами результаты по дифференциальному С-окрашиванию хромосом и электрофорезу запасных белков также свидетельствуют о полиморфизме сорта Звезда. На основе полиморфизма запасных белков нами были выделены биотипы, формирующие «каркас» сорта (см. рис. 1).

На структуру сортопопуляции влияют такие факторы, как процесс создания сорта и его первичное семеноводство [7]. Микроэволюционные изменения по репродукциям и регионам возделывания, видимо, обусловлены естественным отбором, что приводит к стабилизации сорта как полиморфной саморегулирующейся системы [5]. По Н.Н. Кондратьеву, сорт Звезда не требует каких-либо особых приемов семеноводства [9]. Следовательно, показанная структура полиморфизма по белкам (см. рис. 1) характеризует состояние сорта на год изучения и может варьировать по годам.

Таким образом, с помощью методов С-бэндинга и электрофореза запасных белков был установлен высокий полиморфизм внутри сорта, т.е. данный сорт представляет собой совокупность нескольких различных биотипов. При этом интрогрессий со стороны *E. intermedia* установлено не было. Возможно, именно внутрисортным полиморфизмом и объясняются свойственные данному сорту признаки, а также стабильность урожайности по годам.

Выводы

1. С помощью С-метода дифференциального окрашивания и геномной гибридизации *in situ* интрогрессий генетического материала *E. intermedia* в геном сорта Звезда не выявлено.

2. Установлен полиморфизм по спектрам запасных белков семян и по распределению С-бэндов хромосом.

3. Выявленные отличительные признаки кариотипов линий Звезда одностебельная и Звезда низкостебельная могут быть использованы в дальнейших селекционных программах.

Исследования выполнены в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг, государственный контракт № 02.740.11.0286.

Библиографический список

1. Агафонов Н.С., Пишеничная И.А., Туровский А.И., Велибеков М.Д. Генетическая идентификация сортов пшеницы по формулам глиадинов // Новое в селекции и семеноводстве с.-х. культур. Каменная Степь, 1987. С. 48-52.
2. Артамонов В.Д., Семенов В.И., Кузьмина Н.П., Долгова С.П., Кахриманова Н.Н., Келдыш М.А. Исследование факторов, влияющих на стабильность продуктивности 42-хромосомных озимых пшенично-пырейных гибридов и создание ценных форм и линий // Отдален.гибридизация. Теория и практика. М., 2003. С. 211-225.
3. Белов В.И., Иванова Л.П. Улучшение продуктивности октоплоидных промежуточных ППГ // Отдален, гибридизация. Результаты исслед. М., 2001. С. 166-177
4. Большева Н.Л., Бадаева Е.Д., Курочкина А.И., Бадаев Н.С. Сравнение дифференциально окрашенных хромосом у двух родственных форм ржи // Генетика, 1984. 20. С. 2025-2030.
5. Деева Н.Л. Внутрисортной полиморфизм глиадина и фенотипическое разнообразие у озимой мягкой пшеницы // Сб. науч. тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции, 1987. 114. С. 24-34.
6. Дуктова Н.А. Изучение внутрисортной изменчивости количественных признаков у яровой твердой пшеницы // Состояние и пути развития производства сахарной свеклы в Республике Беларусь / Опытная станция по сахарной свекле НАН Беларуси. Минск, 2003. С. 184-187.

7. Илличевский Н.Н., Кудрявцев Л.М., Упелник В.П., Метакровский Е.В. Анализ родословных сортов мягкой пшеницы на основе изучения полиморфизма а-амилазы // Генетика, 1995.31, 12. С. 1650-1654.
8. Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия, 2006. 6. С. 4-22.
9. Кондратьева Н.Н., Кондратьев А. А. Озимая пшеница Звезда // Селекция и семеноводство, 1993. 1. С. 37-40.
10. Крутин П.Ю., Дивашук М.Г., Хомякова О.В., Дьячук Т.И., Карлов Г.И. Молекулярно-цитогенетическая характеристика первичных тритикале, межамфилоидного гибрида и перспективных линий селекции НИИСХ Юго-Востока // Известия ТСХА, 2009. № 3. С. 74-88.
11. Латылов А.З., Снитко М.Л. Внутрисортное генетическое разнообразие сортообразов озимой пшеницы различного происхождения // Проблемы производства продукции растениеводства и пути их решения. Горки, 2000. 1. С. 123-129.
12. Олещук С.В., Блохин Н.И. Внутрисортная изменчивость качества зерна сортов озимой пшеницы мионовской селекции и полиморфизм их глиаина // Селекция, защита растений и агротехника пшеницы, ячменя и тритикале, 1987. С. 63-68.
13. Пшеничная И.А. Внутрисортной полиморфизм глиаина озимой пшеницы и перспективы его использования в селекции: Автореф. канд. дис. НИИСХ ЦЧП имени В.В. Докучаева. Камен. Степь, 1999.
14. Пыльнев В.В. Влияние длительной селекции пшеницы на полиморфизм глиаина // Известия ТСХА, 1994. 4. С. 57-68.
15. Суров В.Ю. Использование метода электрофореза в семеноводстве пшеницы // 6-я рег. конф. мол. уч. Сибири и Дальнего Востока. Секция Селекция и семеноводство. Тез. докл., 1986. С. 40-42.
16. Цицин Н.В. Многолетняя пшеница / М.: Наука, 1978.
17. Chen Q. Detection of alien chromatin introgression from *Thinopyrum* into wheat using S genomic DNA as a probe— A landmark approach for *Thinopyrum* genome research // Cytogenet Genome Res., 2005. 109, 1-3. P. 350-359
18. Karlov G.I., Khrustaleva L.I., him K.B., Van Tuyl J.M. Homoeologous recombination in 2n-gametes producing interspecific hybrids of lillium (*Liliaceae*) studied by genomic *in situ* hybridization (GISH) // Genome, 1999. 42. P. 681-686.
19. Oliver R.E., Cai X., Xu S. S., Chen X., Stack R.W. Wheat-Alien Species Derivatives: A Novel Source of Resistance to Fusarium Head Blight in Wheat Crop Sci., 2005. 45. P. 1353-1360.
20. Tyrka M., Chekowski J. Enhancing the resistance of triticales by using genes from wheat and rye // J. Appl. Genet., 2004.-5(3).-P. 283-295.
21. Yang Z.J., Li G.R., Ren Z.L. Identification of amphiploid between *Triticum durum* cv. Ailanmai native to Sichuan, China and *Secale africanum* // Wheat Inf. Service, 2000. 91. P. 20-24.

Рецензент — д. б. н. В.В. Пыльнев

SUMMARY

According to the results of both C-banding and electrophoresis of seed storage proteins wheat cultivar Zvezda has been found to be highly polymorphic. At the same time, the lines derived from Zvezda are characterized by monomorphism. By both genomic *in situ* hybridization and C-banding no introgression of wheatgrass genome into Zvezda has been shown. Found marker features for the lines Zvezda single-stemmed and short-stemmed can be useful in further breeding schemes.

Key words: wide hybridization, wheat, wheatgrass, intravarietal polymorphism, C-banding, protein electrophoresis.

Крутин Павел Юрьевич — асп. Центра молекулярной биотехнологии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Тел. 977-72-01. Эл. почта: pavelkroupin1985@gmail.com

Климушина Марина Вячеславовна — Тел. 977-72-01.

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

Карлов Геннадий Ильич — к. б. н. Тел. 977-72-01.

Соловьев Александр Александрович — д. б. н. Тел. 976-08-94.