

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К УЛУЧШЕНИЮ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ТРИТИКАЛЕ

Тритикале (*×Triticosecale* Wittmack) является одной из важнейших зерновых культур для Республики Беларусь и в настоящее время возделывается на площади около 500 тыс. га. Столь значительный рост посевных площадей обусловлен успехами, достигнутыми за последние десятилетия в селекции данной культуры. Современные сорта тритикале успешно конкурируют по урожайности зерна и зеленой массы с лучшими сортами ржи, ячменя, овса и пшеницы; имеют высокие кормовые достоинства и повышенное содержание лизина в белке; способны расти на бедных, подтопленных и кислых почвах; хорошо переносят неблагоприятные условия перезимовки и резкие похолодания в весенне-летний период; лучше других зерновых культур подходят для малозатратных, ресурсосберегающих технологий (из-за способности усваивать больше питательных веществ из почвы и существенно меньшей потребности в химической защите). Вместе с тем в селекции тритикале имеется целый ряд нерешенных проблем, к наиболее существенным из которых относятся склонность посевов к полеганию и предуборочному прорастанию зерна в колосе. Представленные в литературе данные свидетельствуют о сложном генетическом контроле данных признаков у тритикале, что значительно затрудняет селекцию на их улучшение с использованием классических подходов. Возможности традиционной селекции существенно ограничивает и то, что ряд значимых для проявления анализируемых признаков генов локализован в хромосомах D-генома пшеницы, отсутствующего у обычных гексаплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов [1]. Наиболее реальный выход из сложившейся ситуации видится в использовании хромосомно-инженерных технологий в сочетании с методами молекулярно-цитогенетического и ДНК-маркирования. В статье изложены результаты создания вторичных рекомбинантных форм тритикале и их изучения на перспективность использования в селекции на короткостебельность и устойчивость к предуборочному прорастанию.

Материалы и методы

Для получения вторичных рекомбинантных форм тритикале были использованы современные сорта тритикале Лана, Карго, Мешко ($2n = 6x = 42$; AABBRR), отобранные по комплексу хозяйственно-полезных признаков, а также D(A)- и D(B)-замещенные формы гексаплоидных тритикале, синтезированные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в 90-х годах прошлого столетия на основе популярных в то время образцов октоплоидных тритикале [2]: ПРАГЗ-2 с 1D (1A), 2D (2B)-замещениями, ПРАГЗ-3 с 1D (1A), 6D (6B)-замещениями, ПРАГЗ-4 с 1D (1A), 2D (2B), 6D (6B)-замещениями.

Анализ геномной структуры экспериментального материала проводился с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [3, 4]. Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готовых наборов реактивов «Genomic DNA Purification Kit» K0512 («Fermentas», Литва). Для выявления аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1* и *Rht8* использовались праймеры в модификации Zhang X. et al. (2006) [5]. Для определения аллельного состава гена *Viviparous-1B* использовали STS-маркер Vp1B3, разработанный Yang et al. (2007) [6]. Продукты ПЦР фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в $1 \times TAE$ буфере в течение 45 минут при напряжении в 100 В. Результат документировался в системе гель-документации QUANTUM ST4-1100. Для точного определения размера амплифицированных фрагментов с SSR-маркерами был проведен фрагментный анализ продуктов ПЦР. Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором AppliedBiosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты и обсуждение

Получение линейного материала вторичных рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале

С целью создания вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале замещенные линии гексаплоидных тритикале

ПРАГ3-2, ПРАГ3-3 и ПРАГ3-4 были скрещены с сортами тритикале Лана, Карго, Мешко. Полученные гибриды F_1 и F_2 выращивались в условиях принудительного самоопыления. Для создания линейного материала сбор урожая в F_3 был произведен индивидуально по каждому растению. Часть собранных с растения зерен была использована для идентификации хромосомного состава с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг). Анализ геномной структуры гибридных форм показал, что хромосомы D-генома пшеницы включаются в кариотип сортов тритикале с высокой частотой. В общей сложности по всем комбинациям скрещиваний было проанализировано 96 индивидуальных растений, из которых 73 (76%) содержали хромосомы D-генома пшеницы в моносомном и дисомном состоянии, при этом наблюдалась зависимость процесса интрогрессии D-хромосом от генотипической среды вновь синтезированного гибридного растения. Самая низкая частота интрогрессии хромосом D-генома (41,2%) отмечена в комбинации скрещивания Лана×ПРАГ3-4, тогда как в комбинации Лана×ПРАГ3-3 этот показатель был равен 100%, из чего следует, что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов и хромосомно-замещенных линий, можно

существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм.

Если оценивать в целом частоту интрогрессии индивидуальных хромосом D-генома в кариотип гексаплоидных тритикале, то более низкой частотой характеризовалась хромосома 6D (36,1%). Хромосома 2D в проанализированном материале встречалась с частотой 49%, причем у 88% индивидуальных растений присутствовала в дисомном состоянии (рис. 1, а). Самая высокая частота интрогрессии была отмечена для хромосомы 1D — её содержали 65,6% растений F_4 , в том числе в дисомном состоянии — 73%. В потомстве F_4 были отмечены случаи образования aberrантных хромосом: 1DS.1DL-1AL (рис. 1, б) у двух растений (Лана×ПРАГ3-4) и 3DS-3AS.3AL у растения в комбинации Лана×ПРАГ3-3.

По результатам геномного анализа из гибридных популяций F_4 было выделено 8 стабильных рекомбинантных линий с различными типами D(A)- и D(B)-замещений хромосом в дисомном состоянии (табл. 1, рис. 1, а).

У отобранных рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале с помощью ДНК-маркеров был изучен аллельный состав генов, влияющих на формирование короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht8*) и устойчивости к предуборочному прорастанию (*Vp-1B*), для оценки на перспектив-

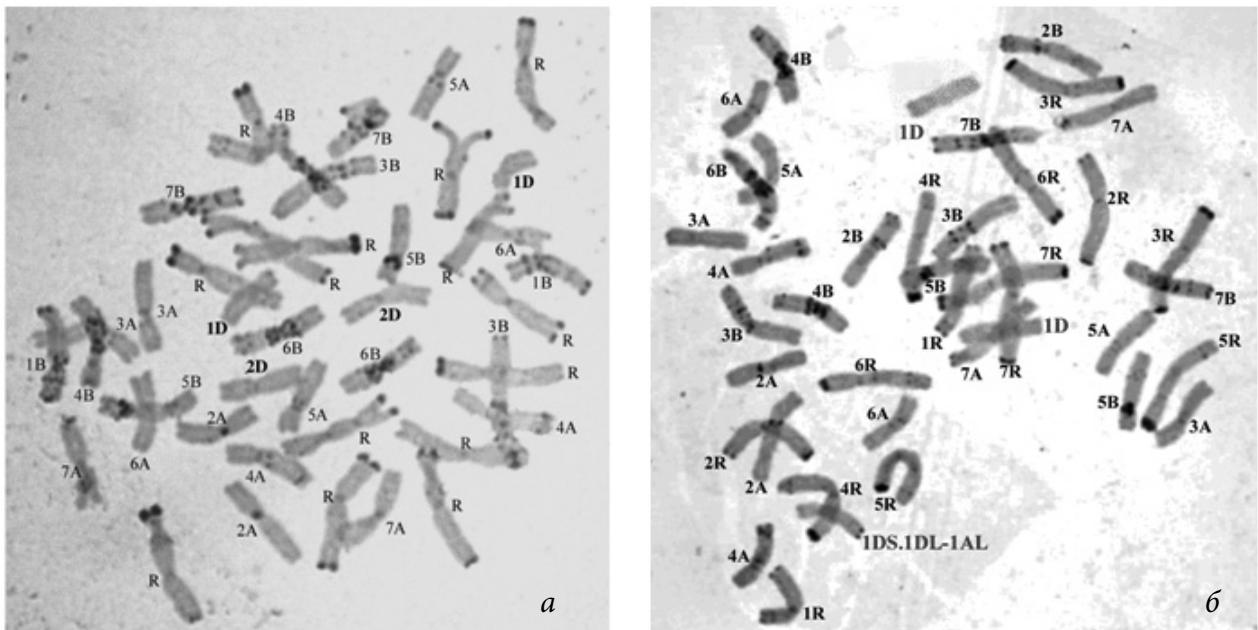


Рис. 1. Кариотипы растений: а — рекомбинантная линия № 12 с 1D(1A)- и 2D(2B)-замещениями хромосом; б — форма из комбинации скрещивания Лана×ПРАГ3-4 с 1D(1B)-замещением хромосом и aberrантной 1DS.1DL-1AL-хромосомой

Таблица 1

**Типы межгеномных замещений хромосом
у вторичных рекомбинантных форм
гексаплоидных тритикале**

Комбинация скрещивания	Номер линии	Типы межгеномных замещений хромосом
Лана × ПРАГЗ-2	6	2D (2B)
	12	1D (1A), 2D (2B)
Лана × ПРАГЗ-3	4	6D (6B)
	11	1D (1A), 6D (6B)
Карго × ПРАГЗ-3	14	1D (1A)
	22	1D (1A)
Мешко × ПРАГЗ-3	3	1D (1A)
	7	1D (1A)

ность использования в селекции по данным признакам.

Анализ аллельного состава генов короткостебельности Rht-B1 и Rht8 у рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

Проведенный нами предварительный анализ геномной структуры вторичных линий тритикале с помощью дифференциального окрашивания хромосом по Гимза дает возможность целенаправленно использовать ПЦР-маркеры для идентификации аллелей генов короткостебельности. Как известно, ген *Rht-B1* локализован в коротком плече хромосомы 4В и, следовательно, будет присутствовать у всех отобранных рекомбинантных линий. Интерес для селекции на короткостебельность представляет мутантный аллель этого гена *Rht-B1b*, гомозиготность по которому по имеющимся данным обеспечивает снижение высоты растений пшеницы на 41–42%.

Анализ рабочей коллекции по аллельному составу гена *Rht-B1* показал, что мутантный аллель *Rht-B1b* содержат все рекомбинантные линии, за исключением № 3 и № 7. Линия № 3 характеризуется наличием дикого аллеля гена *Rht-B1* (*Rht-B1a*) (рис. 2), а у линии № 7 ген *Rht-B1* представлен как диким, так и мутантным аллелем.

Ген *Rht8* локализован в коротком плече хромосомы 2D. Согласно данным кариотипирования хромосома 2D присутствует в геноме двух отобранных вторичных рекомбинантных линий — № 6 и № 12 (табл. 1). При использовании молекулярного маркера *Xgwm261* к гену *Rht8* амплифицируются фрагменты размером 165, 174, 180, 192, 200, 204 п.н., однако только фрагмент 192 п.н. специфичен для коммерческого аллеля данного гена *Rht8c*. В ходе фрагментного анализа полученных продуктов ПЦР было установлено, что у исследованных замещенных форм гексаплоидных тритикале присутствует аллель дикого типа *Rht8a* (165 п.н.) (рис. 3).

Анализ аллельного состава гена Vp-1B, ассоциированного с устойчивостью к предуборочному прорастанию, у рекомбинантных линий гексаплоидных тритикале

Ген *Viviparous-1B*, локализованный в длинном плече хромосомы 3В пшеницы, идентифицирован в качестве основного гена, детерминирующего покой семян. Установлено, что аллель дикого типа данного гена *Vp-1Ba* (652 п.н.) ассоциирован со склонностью к предуборочному прорастанию зерна, тогда как аллели мутантного

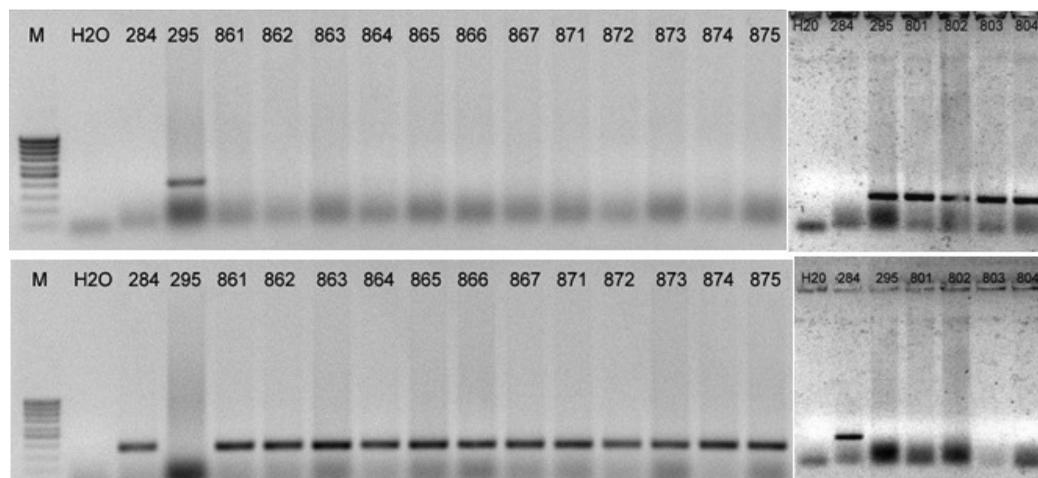


Рис. 2. Электрофореграмма детекции аллелей *Rht-B1a* (верхняя) и *Rht-B1b* (нижняя) у рекомбинантных линий тритикале № 14, № 22 и № 3. М — маркер молекулярного веса Праймтех™, М100 bp, 284 — DEO6232/01 (положительный контроль на *Rht-B1b*), 295 — ПРАГЗ-5 (положительный контроль на *Rht-B1a*); с 861 по 867 — образцы линии № 14; с 871 по 875 — образцы линии № 22; с 801 по 804 — образцы линии № 3

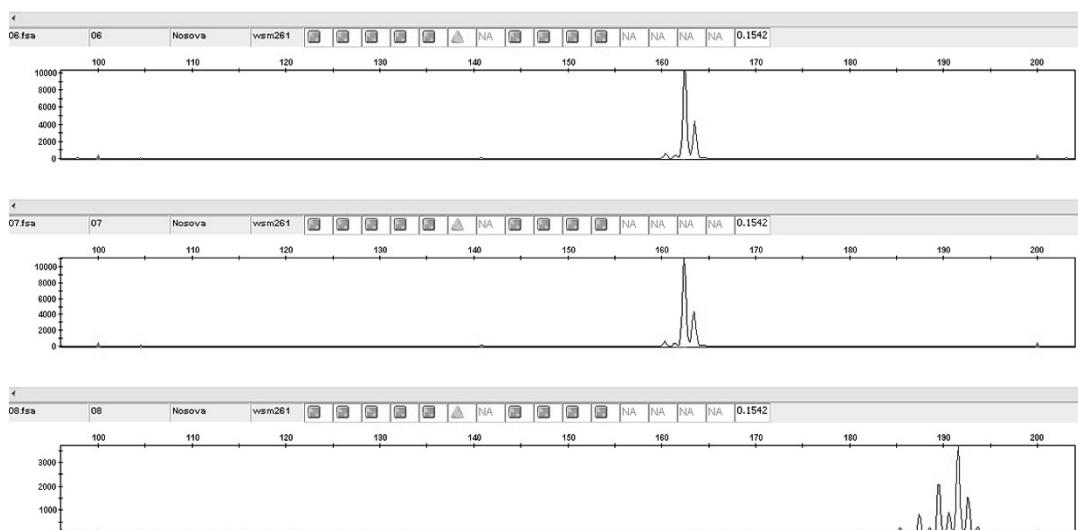


Рис. 3. Данные фрагментного анализа образцов: 1 — Лана×ПРАГ3-2, линия № 6; 2 — Лана×ПРАГ3-2, линия № 12; 3 — Безостая (положительный контроль на *Rht8c*, 192 п. н.) в среде программы GeneMapper 4.1

типа *Vp-1Bв* (845 п. н.) и *Vp-1Bс* (569 п. н.) определяют устойчивость к прорастанию зерна в колосе.

У вторичных рекомбинантных форм тритикале, включенных в исследование, были идентифицированы два аллеля гена *Vp-1B*: *Vp-1Ba* и *Vp-1Bс*. Мутантный аллель *Vp-1Bс* содержали рекомбинантные линии № 3, № 4, № 7 и № 14. Линии № 6 и № 12 характеризовались наличием аллеля дикого типа *Vp-1Ba*, а у линий № 11 и № 22 ген *Vp-1B* представлен как диким *Vp-1Ba*, так и мутантным *Vp-1Bс* аллелями.

Выводы

Представленные выше результаты исследований свидетельствуют об эффективности применения хромосомно-инженерных технологий для расширения генетического разнообразия гексаплоидных тритикале. В ходе экспериментов

показана высокая частота включения хромосом D-генома в кариотип сортов тритикале и довольно быстрая стабилизация хромосомного состава гибридного материала. Выявлена зависимость результативности процесса интрогрессии хромосом D-генома пшеницы в кариотип гексаплоидных тритикале от генотипической среды создаваемой гибридной формы, из чего следует, что, расширяя генетическое разнообразие включенных в гибридизацию сортов тритикале, можно существенно повысить частоту образования рекомбинантных A/B/DRR форм. По совокупности молекулярно-цитогенетического и молекулярно-генетического анализа выделены рекомбинантные линии гексаплоидных тритикале, которые могут быть использованы в селекционном процессе в качестве исходного материала при создании сортов тритикале, устойчивых к полеганию и предуборочному прорастанию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Куркиев К. У., Тырышкин Л. Г., Колесова М. А., Куркиев У. К. Идентификация генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у образцов гексаплоидного тритикале с помощью ДНК маркеров // Информационный вестник ВО-ГиС. — 2008. — 12, № 3. — С. 372–376.
2. Дубовец Н. И., Дымкова Г. В., Соловей Л. А., Штык Т. И., Бормотов В. Е. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом // Генетика. — 1995. — 31, № 10. — С. 1394–1399.
3. Бадаева Е. Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.15 «Генетика». — М., 1984. — 181 с.
4. Badaeva E. D., Sozinova L. F., Badaev N. S., Muravenko O. V., Zelenin A. V. «Chromosomal passport» of *Triticum aestivum* L. em Thell. cv. Chinese Spring and standartization of chromosomal analysis of cereals // Cereal Res. Commun. — 1990. — 18, № 4. — P. 273–281.
5. Zhang X., Yang S., Zhou Y., He Z., Xia X. Distribution of the *Rht-B1b*, *Rht-D1* and *Rht8* reduced height genes in autumn-sown Chinese wheats detected by molecular markers // Euphytica. — 2006. — 152, № 1. — P. 109–116.

6. Yang Y., Zhao X. L., Xia L. Q., Chen X. M., Xia X. C., Yu Z., He Z. H., Röder M. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting tolerance in Chinese wheats // *Theor. Appl. Genet.*— 2007.— № 115 (7).— P. 971–980.

DUBOVETS N.I., SYCHEVA Y.A., BONDAREVICH Y.B., SOLOVEY L.A.

*Institute of Genetics and Cytology of Natl. Acad. Sci. of Belarus,
Belarus, 220072, Minsk, Akademicheskaya str., 27, e-mail: N.I.Dubovets@igc.bas-net.by*

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO IMPROVEMENT OF TRITICALE ECONOMICALLY VALUABLE TRAITS

Aims. Development of triticales secondary recombinant gene pool for use in breeding for semidwarfness and resistance to pre-harvest sprouting. **Methods.** Chromosome-engineering technologies in combination with molecular-cytogenetic and DNA labelling of genotypes. **Results.** Hybridization of substituted 6x-triticales forms with modern crop cultivars was carried out. Eight stable recombinant lines with different D(A)- and D(B)-chromosome substitutions were selected out of hybrid populations F_4 by chromosome differential Giemsa staining (C-banding). Allelic composition of genes affecting formation of semidwarfness (*Rht-B1*, *Rht8*) and resistance to pre-harvest sprouting (*Vp-1B*) was investigated in the selected forms. **Conclusions.** A high frequency of D-genome chromosome inclusion in karyotype of triticales cultivars and dependence of the effectiveness of the introgression process on the genotypic environment of the developed hybrid form were revealed. Recombinant triticales lines, promising for breeding, were selected according to the data of molecular-genetic analysis.

Keywords: triticales, chromosome-substitution lines, semidwarfness, resistance to pre-harvest sprouting, molecular markers.