

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА ГИБРИДНОГО НЕКРОЗА *NE1* У СОРТОВ МЯКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) УКРАИНЫ

Гибридный некроз – преждевременная постепенная гибель листьев или растений F_{1-2} пшеницы в определенных комбинациях скрещивания, что обусловлено взаимодействием двух доминантных комплементарных генов *Ne1* и *Ne2*, локализованных соответственно в хромосомах 5BL и 2BS [1].

Гибридный некроз является довольно серьезным препятствием для объединения желаемых признаков в одном генотипе и интрогрессии генов от диких видов коммерческим сортам. Также гибридный некроз может способствовать искажению результатов генетического анализа определенных признаков из-за элиминации некоторых генотипов в расщепляющихся популяциях. Поэтому при подборе родительских пар для скрещиваний селекционеры и генетики должны избегать объединения сильных аллелей генов гибридного некроза в одном генотипе. Сведения о сортах-носителях летальных генов *Ne* можно найти в публикациях [2–6]. Однако большинство сортов украинской селекции не идентифицированы по аллелям генов гибридного некроза. Наличие доминантных генов *Ne1* и *Ne2* у сортов выявляют с помощью классического генетического анализа при скрещивании с сортами-тестерами, которые имеют генотипы *nelnelNe2^sNe2^s* и *Ne1^sNe1^sne2ne2* [2–6]. Данный подход требует больших затрат времени и труда, к тому же на фенотипическое проявление гибридного некроза влияют факторы окружающей среды [7, 8]. Использование молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами гибридного некроза, значительно ускорит идентификацию генотипов-носителей генов *Ne1* и *Ne2*. С помощью MAS-подхода можно будет проводить негативный отбор генотипов-носителей сильных аллелей генов гибридного некроза из ценного селекционного материала, либо, напротив, создавать коммерческие сорта с определенными комбинациями аллелей указанных генов. Chu et al. (2006) [9] провели молекулярное картирование генов гибридного некроза

Ne1 и *Ne2* с использованием микросателлитных маркеров и показали, что маркер *Xbarc74-5B* сцеплен с геном *Ne1* на генетическом расстоянии 2,0 сМ, а маркер *Xbarc55-2B* – с *Ne2* на расстоянии 3,2 сМ.

Степень проявления гибридного некроза зависит от силы взаимодействующих доминантных аллелей: трех аллелей *Ne1* (*Ne1^w* – слабый, *Ne1^m* – средней силы, и *Ne1^s* – сильный) и пяти аллелей *Ne2* (*Ne2^w* – слабый, *Ne2^{mw}* – ниже средней силы, *Ne2^m* – средней силы, *Ne2^{ms}* – выше средней силы, и *Ne2^s* – сильный), которые были дифференцированы Hermesen (1963) [7] и Zeven (1972) [8]. В литературных источниках нет информации, как соотносятся аллели (продукты амплификации) локусов *Xbarc74-5B* и *Xbarc55-2B* с аллелями генов *Ne1* и *Ne2*, имеющими разную силу. Поэтому наше исследование направлено на выявление соответствия между определенными аллелями локуса *Xbarc74-5B* и различными по силе аллелями гена *Ne1*, а также на изучение распределения аллелей локуса *Xbarc74-5B* и соответствующих аллелей гена *Ne1* среди сортов пшеницы украинской селекции.

Материалы и методы

Материалом для исследований служил 161 сорт мягкой пшеницы различных селекционных центров Украины из рабочих коллекций отдела общей и молекулярной генетики и отдела селекции и семеноводства пшеницы Селекционно-генетического института-НЦНС. Сорта-носители известных аллелей гена *Ne1*: Chinese Spring (*nel*), Red Egyptian (*nel*), Mentana (*Ne1^w*), Kenya Farmer (*Ne1^w*), Koga (*Ne1^m*), Big Club (*Ne1^s*), Marquillo (*Ne1^s*), Qanahan (*Ne1^s*), предоставленные USDA, Germplasm Resources Information Network (<http://www.ars-grin.gov>).

ДНК выделяли из 5-дневных проростков с помощью СТАВ-буфера [10]. Исследовали ДНК пяти индивидуальных растений каждого сорта. ПЦР с направленными праймерами

к микросателлитному локусу *Xbarc74-5B* проводили на термоциклере PeqStar 96x Universal Gradient («PEQLab», Великобритания). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала буфер (67 мМ трис-НСl pH 8,4; 16,6 ммоль $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,0 ммоль MgCl_2 ; 0,03 % Tween-20); 0,2 ммоль каждого dNTP; 0,25 мкм каждого праймера; 40 нг ДНК; 1 ед. Таq-полимеразы. Условия ПЦР реакции: денатурация при 95°C в течение 30 с (начальная – 5 мин), отжиг при 60°C – 30 с, элонгация при 72°C – 30 мин (заключительная элонгация – 3 мин). Продукты амплификации (10 мкл алиquotы ПЦР-смеси с 2,5 мкл 6x буфера для нанесения) фракционировали в 10 % неденатурирующем полиакриламидном геле в 1xTBE. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили при постоянном напряжении 500 V в аппарате для вертикального гель-электрофореза VE-3 «Helicon» (РФ). Визуализацию продуктов электрофоретического распределения проводили импрегнированием гелей нитратом серебра согласно Budowle (1991). Видеоизображения амплифицированных фрагментов получали с помощью видеосистемы «ImageMaster VDS» («AmershamPharmaciaBiotech», США) согласно инструкции. Калибровку молекулярной массы полученных ампликонов осуществляли с использованием стандарта pUC19/*MspI* и 50 bp DNA Ladder.

Статистическую обработку полученных результатов выполняли по общепринятым методикам [11].

Результаты и обсуждение

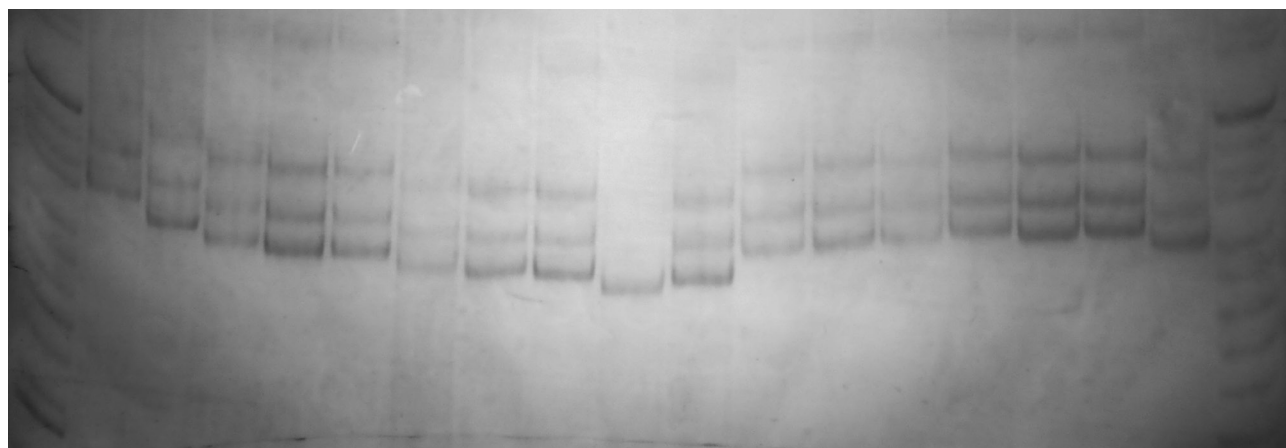
Для определения соответствия аллелей микросателлитного локуса *Xbarc74-5B* различным по силе аллелям гена *Ne1*, с использованием направленных праймеров к локусу *Xbarc74-5B*, провели амплификацию ДНК известных сортов-носителей разных аллелей гена *Ne1*: Chinese Spring (*ne1*), Red Egyptian (*ne1*), Mentana (*Ne1^w*), Kenya Farmer (*Ne1^w*), Koga (*Ne1^m*), Big Club (*Ne1^s*), Marquillo (*Ne1^s*), Qanahan (*Ne1^s*). Показано, что рецессивному аллелю гена *ne1* соответствуют аллели локуса *Xbarc74-5B* размером 156 п.н. и 154 п.н., доминантному аллелю гена *Ne1^w* соответствуют аллели 174 п.н. и 164 п.н., аллелю гена *Ne1^m* – 160 п.н. и аллелю гена *Ne1^s* – аллели 166 п.н. и 158 п.н. (рис. 1).

При исследовании 161 сорта пшеницы мягкой идентифицировано семь аллелей локуса *Xbarc74-5B* размером 174 п.н., 166 п.н., 164 п.н., 162 п.н., 160 п.н., 158 п.н., 156 п.н. (табл.). Выяв-

ленные аллели локуса *Xbarc74-5B* в сортах украинской селекции отнесли к соответствующим по силе аллелям гена *Ne1* согласно данным ПЛР анализа известных сортов-носителей. Аллель размером 162 п.н., выявляемый среди сортов украинской селекции, не обнаружен в изученной выборке известных сортов-носителей аллелей гена *Ne1*. Можно предположить, что аллель 162 п.н. соответствует рецессивному аллелю *ne1* либо доминантному аллелю слабой силы *Ne1^w*, т.к. большинство сортов, имеющих данный аллель, содержат в своем геноме аллель выше средней силы *Ne2^{ms}* [12]. В случае комбинации в одном генотипе генов *Ne1^mNe1^mNe2^{ms}Ne2^{ms}* проявлялся бы некроз в виде уменьшения размера и количества колосьев, в случае *Ne1^sNe1^sNe2^{ms}Ne2^{ms}* – отсутствие колосьев [7]. У сорта Мироновская 808, который также характеризовался аллелем 162 п.н. локуса *Xbarc74-5B*, не наблюдалось вышеуказанных внешних проявлений взаимодействия генов гибридного некроза, и данный сорт является носителем рецессивных аллелей гена *Ne1* (*ne1ne1*) согласно исследованиям В.А. Пухальского [4–6]. В связи с этим можно утверждать, что аллель 162 п.н. соответствует рецессивному аллелю гена *ne1*.

Большинство исследованных сортов украинской селекции (88,3 %) были линейными и характеризовались присутствием одного из аллелей локуса *Xbarc74-5B*. Ряд сортов (11,7 %) оказались неоднородными и состояли из двух генотипов по аллелям вышеуказанного локуса. Популятивные сорта разделили на 7 групп, в зависимости от комбинации генотипов. Частота встречаемости сортов каждой из таких групп была невысокой и составляла от 0,6 % до 5,5 %. Таким образом, все исследуемые сорта можно разделить на 12 групп, 5 из которых представлены однородными сортами, а 7 – неоднородными сортами с объединением двух генотипов с разными аллелями указанного локуса.

В общем наборе сортов с наибольшей частотой встречались аллели локуса *Xbarc74-5B* размером 160 п.н. (36,3 %) и 164 п.н. (35,4 %) (рис. 2). Аллель 164 п.н. соответствует аллелю слабой силы *Ne1^w*. Наиболее распространенный среди сортов украинской селекции аллель 160 п.н. соответствует аллелю средней силы *Ne1^m*. В случае комбинации в одном генотипе генов *Ne1^mNe1^mNe2^{ms}Ne2^{ms}* либо *Ne1^mNe1^mNe2^sNe2^s* будет проявляться гибридный некроз, что необходимо учитывать селекционерам при подборе родительских пар для скрещиваний. С достаточно



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 М

Рис. 1. Результаты ПЛР идентификации аллелей локуса *Xbarc74-5B* в сортах мягкой пшеницы в 9% ПААГ: М – маркер молекулярного веса 10 bp ladder; 142 п.н.: 1 – Mentana (*Ne1^w*); 2 – Big Club (*Ne1^s*); 3 – Kenya Farmer (*Ne1^w*); 4 – Мироновская 808 (*nel*); 5 – Безостая 1; 6 – Koga (*Ne1^m*); 7 – Marquillo (*Ne1^s*); 8 – Qanahan (*Ne1^s*); 9 – Chinese Spring (*ne2*); 10 – Red Egyptian (*nel*); 11 – Лузановка одесская; 12 – Одесская красноколосая; 13 – Обрий; 14 – Щедрость; 15 – Мирхард; 16 – Добрович; 16 – Антоновка

высокой частотой (22,4 %) у сортов изученного набора встречался аллель 162 п.н., соответствующий рецессивному аллелю *nel*. Наименее распространенными среди сортов украинской селекции были аллели 166 п.н. (0,6 %) и 158 п.н. (0,3 %), соответствующие сильному аллелю гена гибридного некроза *Ne1^s*. Аллель 166 п.н. выявлен у двух сортов: Истина одесская и Вдала, а аллель 158 п.н. – у одного сорта – Виктория одесская. Данную информацию также необходимо учитывать селекционерам при планировании схемы скрещиваний.

Наибольший интерес представляет распределение аллелей гена *Ne1* в сортах пшеницы мягкой разных регионов Украины. Среди сортов Юга Украины с наибольшей частотой встречаются аллели 164 п.н. (41,1 %) (*Ne1^w*) и 160 п.н. (39,5 %) (*Ne1^m*) (рис. 2). Первоисточником аллеля 164 п.н. (*Ne1^w*) в сортах украинской селекции был сорт Банатка, но распространение указанного аллеля связано с использованием в селекционном процессе таких сортов как, Безостая 1, Украинка, Альбатрос одесский.

В современных сортах Севера Украины аллель 164 п.н. встречается со значительно меньшей частотой ($d=24,0\pm 8,35$). Аллель 160 п.н. (*Ne1^m*) впервые выявлен у сорта Кооператорка. Широкое распространение данный аллель получил в последние 15 лет, особенно среди сортов Юга Украины (СГИ-НЦСС). На Севере Украины аллель 160 п.н. встречается несколько реже ($d=13,2\pm 8,35$), различия недостоверны.

Частота аллеля 162 п.н. среди сортов Юга Украины (15,4 %) была значительно ниже по сравнению с аллелями 164 п.н. ($d=25,7\pm 5,5$) и 160 п.н. ($d=24,1\pm 5,5$). Аллель 162 п.н. впервые выявлен у сорта яровой пшеницы Артемовка и у сорта Мироновская 808, который получен отбором из Артемовки. Наибольшее распространение аллель 162 п.н. получил у сортов Севера Украины (44,8 %), что связано с использованием в селекционных программах сорта Мироновская 808. Частота аллеля 162 п.н. среди сортов Севера Украины значительно превышала аналогичный показатель среди сортов Юга Украины ($d=29,4\pm 8,75$). Также аллель 162 п.н. встречался на Севере Украины значительно чаще по сравнению с наиболее распространенными на Юге Украины аллелями 164 п.н. ($d=27,7\pm 10,77$) и 160 п.н. ($d=18,5\pm 10,77$), в первом случае различия достоверны.

Преимущественное распространение аллелей 164 п.н. (*Ne1^w*) и 160 п.н. (*Ne1^m*) среди сортов Юга Украины, а также аллеля 162 п.н. (*Ne1*) среди сортов Севера Украины может свидетельствовать о селекционной и адаптивной ценности указанных аллелей локуса *Xbarc74-5B*, точнее аллелей генов сцепленных с указанным локусом, для условий определенных регионов. При этом под генами, сцепленными с локусом *Xbarc74-5B*, подразумевается не только ген гибридного некроза *Ne1*, но и другие гены хромосомы 5BL, которые могут иметь важное адаптивное либо селекционное значение, например, гены морозо-

Генотипы сортов мягкой пшеницы разных регионов Украины по аллелям локуса *Xbarc74-5B*

Аллель	n	$p \pm s_p, \%$	Сорт
174 п.н. (<i>NeI^w</i>)	4	2,5±1,23	Земка, Мирлебен, Подолянка, Спасивка.
164 п.н. (<i>NeI^w</i>)	52	32,3±3,69	Альбатрос од., Банатка, Белоцерковская 198, Бунчук, Буревестник од., Ватажок, Ветеран, Вымпел од., Гирка местная (0274), Годувальница од., Дарунок, Добрович, Эпоха од., Эра, Эритроспермум 15, Жайвир, Журавка, Задумка, Змина, Ильичевка, Куяльник, Лада од., Лебідка, Лютесценс 17, Мелодия, Мудристь, Нагорода од., Никония, Одесская 12, Одесская 26, Одесская 117, Одесская 120, Одесская 265, Одесская 266, Одесская полукарликовая, Оксана, Ольвия, Пыльпывка, Повага, Полевик, Порада, Пошана, Символ од., Сирена од., Струмок, Супутниця, Тира, Украинка, Украинка 0246, Федоровка, Щедрость, Юнат од.
162 п.н. (<i>neI</i>)	33	20,5±3,17	Артемовка, Веселоподолянская 499, Волынская полуинтенсивная, Волошкова, Экономка, Экспромт, Эритроспермум 127, Зенитка, Зирка, Калинова, Колос Миронивщины, Лановой, Легенда Миронивщины, Лиона, Лузановка од., Мирлена, Мироновская 65, Мироновская 808, Мирхард, Обрий, Одесская 162, Одесская 267, Одесская красноколосая, Отаман, Подяка, Прибой, Прогресс, Смила, Снижана, Степова, Фрегат, Хвыля, Шестопаповка
160 п.н. (<i>NeI^m</i>)	51	31,7±3,65	Антоновка, Безмежна, Борвий, Бригантина, Веснянка, Выхованка од., Виген, Гарант, Голубка од., Господыня, Гурт, Дальницкая, Добирна, Едність, Заграва од., Застава од., Земляка од., Зиск, Злагода, Знахидка од., Золотава, Золотоколосая, Книгиня Ольга, Колумбия, Кооператорка, Косовица, Красень, Ластивка од., Лира, Лытановка, Миссия од., Монолог, Наснага, Небокрай, Нива, Одесская 51, Одесская безостая, Одесская остистая полуинтенсивная, Пысанка, Полукарлик 1, Розмай, Скарбница, Служница, Смуглянка, Софийка, Традиция, Турунок, Украинка од., Уникум, Хыст, Черноброва
156 п.н. (<i>neI</i>)	2	1,2±0,85	Лесостепка 75, Фантазия од.
174 п.н. + 162 п.н.* (<i>NeI^w</i> + <i>neI</i>)	3	1,9±1,07	Южная заря, Юбилейная 75, Ясногирка
166 п.н + 164 п.н (<i>NeI^s</i> + <i>NeI^w</i>)	1	0,6±0,61	Истина одесская
166 п.н + 160 п.н (<i>NeI^s</i> + <i>NeI^m</i>)	1	0,6±0,61	Вдала
164 п.н + 160 п.н (<i>NeI^w</i> + <i>NeI^m</i>)	9	5,6±1,79	Благодарка одесская, Дюк, Заможність, Кирия, Леля, Монотип, Селянка, Одесская 66, Звыгтяга
162 п.н + 160 п.н (<i>neI</i> + <i>NeI^m</i>)	3	1,9±1,07	Билява, Роставыця, Ужинок
160 п.н + 158 п.н (<i>NeI^m</i> + <i>NeI^s</i>)	1	0,6±0,61	Виктория одесская
160 п.н + 156 п.н (<i>NeI^m</i> + <i>neI</i>)	1	0,6±0,61	Одом
	161		

Примечание: * – в сорте присутствуют два генотипа с разными аллелями локуса *Xbarc74-5BL*.

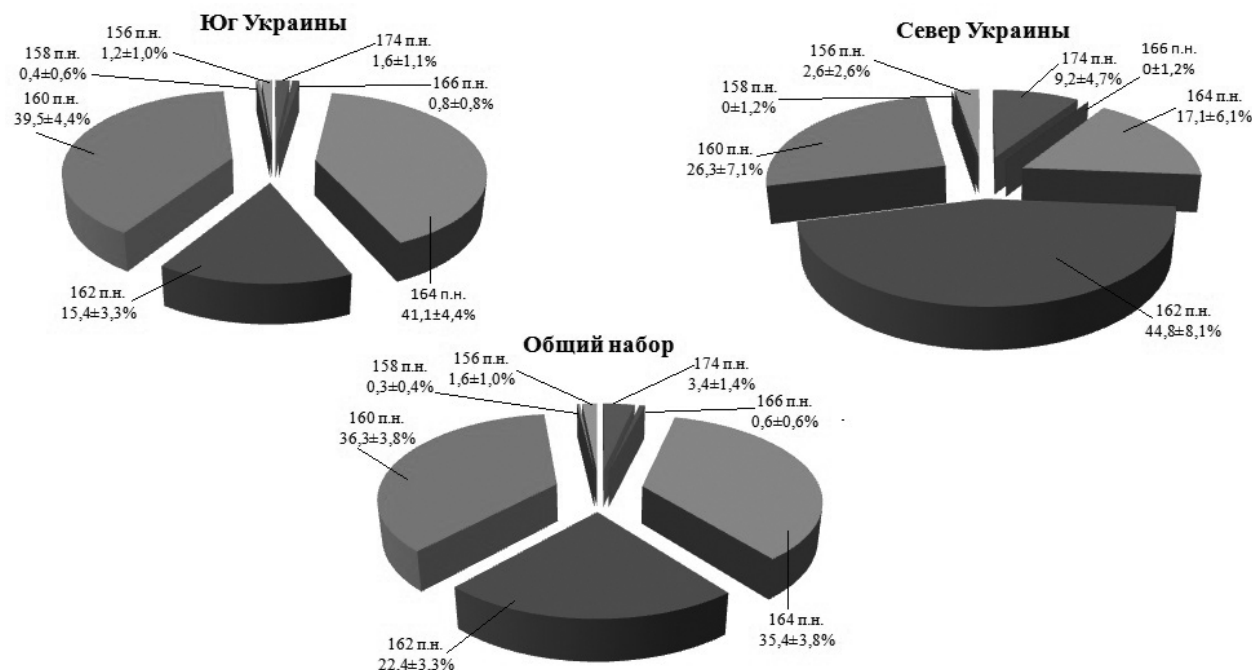


Рис. 2. Частоты аллелей локуса *Xbarc74-5B* в общем наборе сортов и в наборах сортов различных регионов Украины

стойкости (*Fr-B2*), яровизационной потребности (*Vrn-B1*), скороспелости (*Eps-5BL*) и устойчивости к грибным заболеваниям (*Sr49*, *Sr56*, *Yr19*, *Lr18*, *Pm36*, *Stb1*).

Выводы

Идентифицированы по аллелям локуса *Xbarc74-5B*, сцепленного с геном гибридного некроза *Ne1*, генотипы 161 сорта мягкой пшени-

цы различных регионов Украины. Выявлено соответствие аллелей локуса *Xbarc74-5B* различным по силе аллелям гена гибридного некроза *Ne1*: 162 п.н., 156 п.н. и 154 п.н. – *ne1*, 174 п.н. и 164 п.н. – *Ne1^w*, 160 п.н. – *Ne1^m*, 166 п.н. и 158 п.н. – *Ne1^s*. Показано распределение идентифицированных аллелей гена *Ne1* среди сортов пшеницы украинской селекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tsunewaki K. Aneuploid analysis of hybrid necrosis and hybrid chlorosis in tetraploid wheats using the D-genome chromosome substitution lines of durum wheat // *Genome*. – 1992. – 35. – P. 594–601.
2. Nishikawa K., Mori T., Takami N., Furuta Y. Mapping of progressive necrosis gene *Ne1* and *Ne2* of common wheat by the telocentric method // *Japan J Breed*. – 1974. – 24. – P. 277–281.
3. Gupta S., Gupta A.K. Characterization of hexaploid derivatives for *Ne1* and *Ne2* necrotic genes of wheat // *Wheat Inf. Serv.* – 1993. – 77. – P. 23–24.
4. Пухальский В.А., Билинская Е.Н., Иорданская И.В. Распределение генов гибридного некроза у сортов и линий яровой мягкой пшеницы // *Селекция и семеноводство*. – 1998. – № 2. – С. 13–18.
5. Пухальский В.А., Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Гены гибридного некроза пшениц (теория вопроса и каталог носителей летальных генов). – М.: МСХА, 2002. – 316 с.
6. Пухальский В.А., Билинская Е.Н., Мартынов С.П., Добротворская Т.В., Оболенкова Г.А. Новые данные по распространению генов гибридного некроза в сортах озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // *Генетика*. – 2008. – 44, № 2. – С. 209–218.
7. Hermesen J.G.Th. Sources and distribution of the complementary genes for hybrid necrosis in wheat // *Euphytica*. – 1963. – 12. – P. 147–160.
8. Zeven A.C. Determination of the chromosome and its arm carrying the *Ne1*-locus of *Triticum aestivum* L., Chinese Spring and the *Ne1*-expressivity // *Wheat Inf. Serv.* – 1972. – 34. – P. 4–6.
9. Chu C.-G., Faris J.D., Friesen T.L., Xu S.S. Molecular mapping of hybrid necrosis genes *Ne1* and *Ne2* in hexaploid wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* – 2006. – 112. – P. 1374–1381.

10. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Науч.-метод. Руководство. – К.: Аграр. наука, 1998. – 156 с.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – М.: Колос, 1973. – 327 с.
12. Галаев А.В., Галаева М.В., Сиволап Ю.М. Распределение аллелей микросателлитного локуса *Xbarc55-2B*, сцепленного с геном гибридного некроза *Ne2*, в сортах мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. праць / Під ред. В.А. Кунаха [та ін.]. – 2013. – 13. – С. 30–35.

GALAEV A.V., GALAEVA M.V.

Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigations, Ukraine, 65036, Odessa, Ovidiopol'skaya dor., 3, e-mail: galaev7@ukr.net

IDENTIFICATION AND DISTRIBUTION OF ALLELES OF HYBRID NECROSIS GENE *NE1* IN BREAD WHEAT VARIETIES (*TRITICUM AESTIVUM* L.) OF UKRAINE

Aim. Identification of compliance with between certain alleles locus *Xbarc74-5B* and different in strength gene alleles *Ne1*, and their distribution of among the wheat varieties of Ukrainian breeding. **Methods.** Polymerase chain reaction (PCR), PAAgel-electrophoresis. **Results.** 161 genotypes of bread wheat varieties from Ukraine breeding were identified by the locus *Xbarc74-5B* closely linked to hybrid necrosis gene *Ne1*. **Conclusions.** Compliance with the alleles *Xbarc74-5B* of different in strength gene alleles hybrid necrosis *Ne1* was found: 162 bp, 156 bp and 154 bp – *ne1*, 174 bp and 164 bp – *Ne1^w*, 160 bp – *Ne1^m*, 166 bp and 158 bp – *Ne1^s*. The distribution of identified gene alleles *Ne1* among wheat varieties Ukrainian breeding was showed.

Keywords: *Triticum aestivum* L., hybrid necrosis gene *Ne1*, microsatellite analysis.