

ЦИТОЛОГІЧНА ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ, ОТРИМАНИХ ЗА ІНТРОГРЕСИВНОЇ СЕЛЕКЦІЇ ТА МУТАГЕНЕЗУ

Створення нових інтенсивних сортів м'якої озимої пшениці, які поєднують максимальну урожайність, високі технологічні якості насіння, стійкість до різноманітних стресів, хвороб та шкідників, є нагальною потребою сьогодення. Генетичного матеріалу самої м'якої пшениці недостатньо для вирішення цих завдань. На сучасному етапі проблема розширення генетичного різноманіття пшениці вирішується, головним чином, за допомогою інтрогресивної гібридизації та експериментального мутагенезу. Джерелом генів господарсько-цінних ознак можуть бути різноманітні види триби *Triticeae*, які характеризуються значним генетичним поліморфізмом важливих селекційних ознак. Одним із найпоширеніших донорів таких ознак є жито. Найбільшого розповсюдження набули пшенично-житні транслокації, серед яких особливе значення мають 1BL/1RS та 1AL/1RS, утворені в результаті переносу короткого плеча хромосоми 1R жита на довге плече хромосоми 1B або 1A пшениці [1].

Для моніторингу й ідентифікації пшенично-житних транслокацій 1BL/1RS та 1AL/1RS або заміщення хромосоми 1B пшениці на хромосому 1R жита використовують біохімічні, молекулярні, цитогенетичні та інші методи. Стадії отримання та розмноження створених гібридів потребують постійного цитологічного моніторингу протягом ряду поколінь після гібридизації, оскільки практикою доказано, що через деякий час чужорідні хромосоми можуть повністю еліминуватися з геному і спонтанно замінюватися на хромосоми свого виду. Крім того, незважаючи на те, що пшениця є самозапилювачем, у неї все ж відбувається перехресне запилення, частота якого складає від 0,1 до 10 % і вище [2]. Тому проблема генетичної стабільності рослинного матеріалу гібридного походження набула особливої актуальності.

Велике значення в селекційній практиці має застосування молекулярно-генетичних методів, які дають можливість охарактеризувати внутрішньо- та міжвидове генетичне різноманіття рослин, порівнювати геноми та встановлювати ступінь їх спорідненості, виявляти відмінності між сортами на рівні генотипу, а також приховану мінливість. Широкого застосування набули в наш час молекулярні маркери (RAPD, RFLP, SSR, AFLP, SNP), які дозволяють швидко оцінювати генетичний матеріал. Використання молекулярно-генетичних маркерів для ідентифікації окремих генних локусів є сучасним і достатньо ефективним способом аналізу геномів рослин. Знаючи інформацію про походження сортів або ліній, дослідивши перебіг мейозу та стійкість до фітопатогенів, підбирають молекулярні маркери до відомих цільових генів, зокрема для аналізу генотипів із пшенично-житною транслокацією [3–5].

Метою нашої роботи було дослідження перебігу мейозу в інтрогресивних сортів м'якої пшениці, оцінка їх цитологічної стабільності та наявності пшенично-житних транслокацій за використання різних маркерних систем.

Матеріали і методи

Матеріалом досліджень слугували сорти пшениці м'якої озимої української селекції Гілея, Княгиня Ольга, Славна, Смуглянка, Солоха, Сотниця, Чорнява, носії транслокації 1AL/1RS. Як стандарт використано сорт Ятрань 60.

Аналіз мейозу проводили на материнських клітинах пилку (МКП). У кожному варіанті досліджували по 10–15 колосів, які ще не вийшли з трубки. Матеріал фіксували в суміші Карнуа. Тимчасові давлені препарати готували за загальноприйнятою методикою [6]. В одному колосі аналізували всі пиляки, мейоцити яких знаходилися на різних стадіях мейозу. Для кожного сор-

ту вивчали в середньому по 40–60 чітких пластинок на стадії метафази 1 (M1). На стадіях A1-A2 аналізували не менше 50 клітин на колос. На останній стадії мейозу досліджували по 150–200 тетрад на рослину та визначали мейотичний індекс як співвідношення кількості тетрад без порушень до загального числа тетрад, що є показником як нормального перебігу мейозу, так і стабільності генотипів [7]. Препарати аналізували за допомогою мікроскопа *Amplival* (Zeiss) із збільшенням 15x40 та 15x100.

Для ідентифікації пшенично-житньої транслокації у сортах пшениці проводили молекулярно-генетичний аналіз ДНК методом ПЛР. Реакційні суміші об'ємом 20 мкл включали: по 0,25 мкМ форвардних та реверсних праймерів (до локусу *SCM9* та гена *TaTM20*), 1×реакційний буфер BD (Solis BioDyne), 2 мМ $MgCl_2$, 200 мкМ суміші дезоксирибонуклеотид-3-фосфатів (Thermo Scientific), 0,75 од. полімерази FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne), 100 нг сумарної рослинної ДНК. Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за такою програмою: первинна денатурація – 94°C 4 хв та 34 цикли: денатурація – 94°C 30 с, реасоціація – 60°C 30 с, елонгація – 72°C 1 хв, кінцева елонгація – 72°C 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 2 % агарозному гелі з 0,5 мкл/мл бромистим етидієм [8]. Для оцінки розмірів продуктів ампліфікації використовували маркер GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific).

Результати та обговорення

Дослідження мікроспорогенезу у сорту Ятрань 60 показало, що хромосомні асоціації в M1 представлені в основному закритими бівалентами. На стадіях A1-T1 клітин із порушеннями не виявлено. На стадії T2 спостерігали лише поодинокі тетради з мікроядрами. Таким чином, отримані дані свідчать про відсутність інтрогресивного матеріалу в каріотипі цього сорту та його цитологічну стабільність.

Аналіз характеру кон'югації хромосом в M1 у сортів Гілея, Княгиня Ольга, Смуглянка, Славна, Солоха, Сотниця, Чорнява засвідчив, що у каріотипах вуїх сортів утворювалися асоціації хромосом, представлені в основному закритими (21^{II}_3) та відкритими ($20^{II}_3+1^{II}_B$, $19^{II}_3+2^{II}_B$, рідше $18^{II}_3+3^{II}_B$) бівалентами. При цьому в усіх сортів спостерігали переважання закритих бівалентів, що свідчить про високу інтенсивність процесу синапсису.

Наявність відкритих бівалентів вказує на послаблення кон'югації хромосом, проте, доказано, що десинапсис не має негативного впливу на перебіг мейозу [9, 10].

Основним типом порушень мейозу на цій стадії є присутність мікроспороцитів з унівалентними хромосомами (рис. 1 а). У всіх досліджуваних сортів клітини з унівалентами, в основному з двома ($20^{II} + 2^I$), траплялися з частотою до 3 %, що є в межах норми для інтрогресивних сортів. У сортів Сотниця та Чорнява помічено біля 8 % таких клітин (7,5 та 8,8 % – відповідно). Поява унівалентів є показником послаблення або відсутності кон'югації (асинапсис) між гомологічними хромосомами і може свідчити про наявність транслокацій або заміщень [11, 7], а також може вказувати на цитологічну нестабільність таких матеріалів, якщо вміст їх перевищує 5 % [2, 12]. Як правило, унівалентні хромосоми розташовуються за межами метафазної пластинки і не беруть участі в її формуванні. В мейоцитах з унівалентами відбувається в основному випадкове розходження хромосом до полюсів в анафазі 1, що в подальшому може призводити до утворення неповноцінних гамет. Крім того, у сортів Гілея, Сотниця, Солоха та Чорнява траплялися поодинокі анеуплоїдні клітини з асоціаціями хромосом $20^{II}+3^I$, $21^{II}+1^I$ та $19^{II}+3^I$. Відсутність кон'югації і утворення різної кількості унівалентів пояснюють різними причинами: мутаціями в генах, що контролюють синапсис; інтрогресією значної кількості чужорідного матеріалу, що призводить до порушення одночасно декількох генетичних систем; зміною генетичного контролю за проходженням мейозу, що викликається як присутністю нових генів від виду-донора, так і заміщенням генів, які контролюють мейоз у виду-реципієнта; цитоміксисом [13, 14].

На стадії метафази 2 порушення мейозу були представлені, головним чином, викидом хромосом за межі веретена поділу, проте частота клітин була на рівні 2 %, що знаходиться в межах норми.

На стадіях A1-T1 та A2 спостерігали за характером розходження хромосом до полюсів веретена поділу. Порушення мейозу на цих стадіях були представлені в основному типовими анафазними абераціями: мостами (рис. 1 б), відсталіми хромосомами, фрагментами (рис. 1 в) тощо. Кількість клітин із порушеннями на цих стадіях коливалася у різних сортів від 9,5 % (с. Гілея) до 17,7 % (с. Сотниця). На стадії A2 основним типом порушень був асинхронний поділ

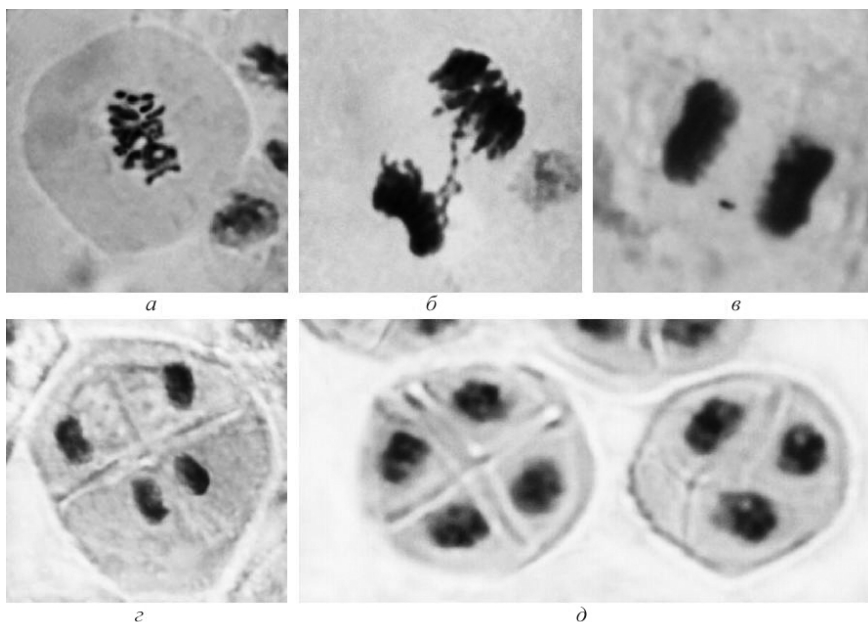


Рис. 1. Порушення мейозу в клітинах досліджуваних форм: а – клітина з закритими та відкритими бівалентами, присутність унівалентів; б – анафаза I з мостом; в – анафаза I з викидом хромосоми; г – асинхронний поділ; д – нормальна тетрада (зліва) та з одним відсутнім ядром (справа)

в діадах, коли в одній клітині проходила стадія ранньої анафази, в другій – пізньої анафази/ранньої телофази, (рис. 1 г). Частота таких клітин у досліджуваних генотипів варіювала в межах від 1,0 до 7,1 %.

На останній стадії мейозу аналізували утворені тетради та визначали мейотичний індекс, який є показником цитологічної стабільності генотипів. Наслідки порушень, що відбулися на попередніх стадіях мейозу, проявляються в тетрадах у вигляді мікроядер, наявності мікроспороцитів із різними за величиною ядрами, відсутності 1–2 мікроспор, передчасному цитокінезі, появі поліад або інших аномалій [14]. У наших дослідженнях тетради з мікроядрами спостерігали з різною частотою в усіх проаналізованих сортів. Найбільша кількість таких клітин (17,6 %) помічена у сорту Чорнява, найменша (5,9 %) – у сорту Гілея. Іншим типом аномалій на цій стадії мейозу була наявність однієї-двох без'ядерних мікроспор (рис. 1 д), частота яких коливалася від 2,3 до 8,5 % (табл.). Проте слід зазначити, що присутність до 10 % тетрад із порушеннями вважається нормальним для інтрогресивних сортів. Показано, що мікроядра в тетрадах утворюються з відсталих хромосом або фрагментів [12, 15]. Появу тетрад без мікроспор пояснюють наявністю в М1 або М2 автономного веретена, а також відсутністю кінетохорних фібрил або аномальним передчасним цитокінезом в профазі 2 [16].

За дослідження мейотичного індексу з'ясовано, що сорти Гілея та Княгиня Ольга мають високий показник – 91 %; Славна, Смуглянка, Со-

лоха – знижений – 84 %; Сотниця та Чорнява – низький 74 % та 79 % відповідно (табл.). Високим мейотичним індексом зазвичай характеризуються цитологічно стабільні форми з нормальним перебігом мейозу, що зумовлює в подальшому утворення життєздатного пилку. Знижений мейотичний індекс також свідчить про цитологічну стабільність таких сортів, але у них спостерігаються певні порушення мейозу на стадіях М1-А2, що може призводити до зниження фертильності пилку. Сорти, що характеризуються низьким мейотичним індексом, генетично не стабільні і мають підвищений рівень порушень на різних стадіях мейозу. Вважається, що в таких матеріалах ще відбувається формоутворюючий процес [17].

Таким чином, дані цитологічного аналізу мейозу засвідчили, що всі досліджені сорти є носіями пшенично-житньої транслокації, але різняться за рівнем цитологічної стабільності: сорти Гілея, Княгиня Ольга, Славна, Смуглянка, Солоха є цитологічно стабільними, характеризуються практично нормальним перебігом мейозу. Сорти Сотниця та Чорнява генетично не стабільні і мають підвищений рівень порушень перебігу мейозу.

Для підтвердження наявності у зазначених сортів *1AL.IRS* або *1BL.IRS* транслокацій були проведена мультиплексна полімеразна ланцюгова реакція з використанням праймерів до мікросателітного локусу *SCM9* жита (*IRS* плече) та праймерів до референтного гена пшениці *TaTM20* (амплікон 934 п.н.) [8, 18, 19]. За наявно-

Аналіз стадії тетрад та визначення мейотичного індексу

Сорт	Стадія тетрад				Мейотичний індекс, %
	К-ть клітин, шт.	З них			
		нормальні, шт.	з мікроядрами, %	з іншими порушеннями, %	
Ятрань 60	1120	1116	0,3±0,2	-	99,6±0,3
Гілея	510	463	5,9±1,0	2,3±0,7	91,8±1,3
Княгиня Ольга	509	459	6,9±1,1	2,9±0,7	91,2±1,4
Славна	787	664	8,5±1,0	6,6±0,9	84,8±1,4
Смуглянка	1345	1138	8,6±0,8	6,8±0,7	84,6±1,1
Солоха	1127	946	11,5±0,9	4,5±0,6	83,9±1,2
Сотниця	738	586	12,0±1,2	8,5±1,0	79,4±1,7
Чорнява	575	426	17,6±1,6	8,3±1,2	74,1±1,8

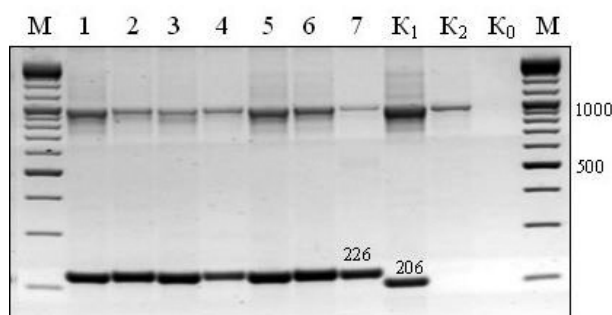


Рис. 2. Спектр продуктів ампліфікації ДНК досліджуваних зразків за використання праймерів до мікросателітного локусу *SCM9* жита та до референтного гену пшениці *TaTM20* (934 пн): 1 – сорт Смуглянка; 2 – Солоха; 3 – Славна; 4 – Чорнява; 5 – Сотниця; 6 – Гілея; 7 – Княгиня Ольга; K_1 – позитивний контроль на наявність *IBL.IRS* транслокації (сорт Новокиївська); K_2 – контроль на відсутність транслокації (сорт Ятрань 60); K_0 – негативний контроль (без додавання ДНК); М – маркер молекулярних мас (GeneRuler DNA Ladder Mix)

сті *IAL.IRS* транслокації спостерігали амплікон розміром 226 п.н., *IBL.IRS* транслокації – амплікон 206 п.н., а за відсутності транслокації сигналу не спостерігали.

Результати, представлені на рис. 2 (доріжки 1–7), показали, що усі досліджувані сорти пше-

ниці містили амплікон довжиною 226 п.н., що вказує на наявність транслокації у першій хромосомі пшениці геному А. Для пшениці сорту Новокиївська детектували фрагмент у 206 п.н., що засвідчує присутність у її геномі *IBL.IRS* пшенично-житньої транслокації (K_1). Сорт Ятрань 60 характеризувався відсутністю транслокацій (K_2).

Висновки

Проведені дослідження підтвердили доцільність комплексного аналізу за використання цитологічних та молекулярно-генетичних методів для визначення наявності та локалізації пшенично-житніх транслокацій у сортах пшениці української селекції. Усі досліджувані сорти пшениці містили амплікон довжиною 226 п.н., що вказує на наявність транслокації *IAL.IRS* у першій хромосомі пшениці геному А. Дані цитологічного аналізу мейозу підтвердили, що всі досліджені сорти є носіями пшенично-житньої транслокації, але різняться за рівнем цитологічної стабільності: сорти Гілея, Княгиня Ольга, Славна, Смуглянка, Солоха є цитологічно стабільними, характеризуються практично нормальним перебігом мейозу. Сорти Сотниця та Чорнява генетично не стабільні і мають підвищений рівень порушень перебігу мейозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. // *Euphytica*. – 1998. – 100. – P. 323–340.
2. Мощный И.И., Чеботарь С.В., Сударчук Л.В., Галаев А.В., Сиволап Ю.М. Идентификация замещения (1В)1R и транслокации 1BL.1RS у интрогрессивных линий озимой пшеницы цитологическим и молекулярно-генетическим методами // *Вавилов. ж. ген. и сел.* – 2012. – 16, № 1. – С. 212–222.
3. Сиволап Ю.М., Чеботарь С.В., Сударчук Л.В. Детекція 1RS.1AL, 1RS.1BL та модифікованої транслокації за 1RS хромосомою у селекційних форм м'якої пшениці. Методичні рекомендації. – Одеса, 2011. – 13 с.
4. Landjeva S., Korzun V., Tsanev V., Vladova R., Ganeva G. Distribution of the wheat-rye translocation 1BL.1RS among bread wheat varieties of Bulgaria // *Plant Breeding*. – 2006. – 125. – P. 102–104.
5. Waines J.G., Hegde S.G. Intraspecific gene flow in bread wheat as affected by reproductive biology and pollination ecology of wheat flowers // *Crop Sci.* – 2003. – 43. – P. 451–463.
6. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Агрохимиздат, 1988. – 271 с.
7. Орловская О.А., Леонова И.Н., Салина Е.А., Хотылева Л.В. Особенности поведения хромосом в мейозе у линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала тетраплоидных видов рода *Triticum* // *Экологическая генетика*. – 2015. – XIII, № 1. – С. 16–22.
8. Степаненко А.І. Розробка систем молекулярно-генетичних маркерів для детекції якісних ознак у пшениці та ячменю: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. біол. наук. – К., 2015. – 26 с.
9. Сечняк А.Л., Голуб Ю.В. Регулярность мейоза у гибридов аллоплазматических пшениц с пшенично-чужеродным амфиплоидом // *Достижения і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. праць*. – К.: Логос, 2007. – 2. – С. 157–161.
10. Лемеш В.А., Саматадзе Т.Е., Гузенко Е.В., Железнякова Е.В., Амосова А.В., Зеленін А.В., Муравенко О.В. Особенности развития и репродукции трансгенных растений льна-долгунца // *Онтогенез*. – 2014. – 45, № 6. – С. 406–411.
11. Силкова О.Г., Шапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // *Генетика*. – 2011. – 47, № 4. – С. 437–448.
12. Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Санина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // *Генетика*. – 2009. – 45, № 12. – С. 1616–1626.
13. Соснихина С.П., Михайлова Е.И., Тихолиз О.А., Цветкова Н.В. и др. Проявление и наследование десинаптической формы ржи с нарушением гомологичности синапсиса // *Генетика*. – 2007. – 43, № 10. – С. 1424–1433.
14. Сидорчук Ю.В., Дорогова Н.В., Дейнеко Е.В., Шумный В.К. Преждевременный цитокinesis в материнских клетках пыльцы трансгенных растений табака (*Nicotiana tabacum* L.) // *Цитология*. – 2008. – 50, № 5. – С. 447–451.
15. Силкова О.Г., Перемыслова Е.Э., Шапова А.И., Шумный В.К. Генетическая регуляция деления центромерных районов унивалентных хромосом ржи и пшеницы в анафазе I мейоза ди-моносомиков // *Генетика*. – 2008. – 44, № 1. – С. 102–111.
16. Shamina N.V., Dorogova N.V., Sidorchuk I.V., Zagorskaya A.A., Deineko E.V., Shumny V.K. Abnormalities of meiotic division caused by T-DNA taget mutation in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) // *Cell Biol. Int.* – 2001. – 25, № 4. – P. 367–369.
17. Лапочкина И.Ф., Иорданская И.В., Ячевская Г.Л., Адхам аль Лаббан Цитологическое изучение коллекции синтетической пшеницы из национальной коллекции злаков США (National Small Grain Collection of USDA-AKS) в условиях нечерноземной зоны России // *Сельхоз. биология*. – 2014. – № 3. – С. 77–82.
18. Степаненко А.І., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Адаменко Н.І., Великожон Л.Г. Скринінг сортів озимої м'якої пшениці на наявність пшенично-житньої транслокації за ДНК-маркерами // *Вісник Укр. товариства генетиків і селекціонерів*. – 2012. – 10, № 2. – С. 311–318.
19. Моргун Б.В., Степаненко А.І., Чугункова Т.В., Лялько І.І., Великожон Л.Г. Використання ДНК-маркерів для виявлення пшенично-житніх транслокацій у сортах м'якої пшениці та їх цитологічна характеристика // *Физиология растений и генетика*. – 2014. – 46, № 4. – С. 319–324

MORGUN B.V.^{1,2}, LYALKO I.I.², STEPANENKO A.I.^{1,2}, BAVOL A.V.^{1,2}, VELYKOZHON L.G.^{1,2}

¹ *Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 31/17*

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnogo str., 143*

CYTOLOGICAL AND MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF VARIETIES OF WINTER WHEAT PRODUCED VIA INTROGRESSIVE BREEDING AND MUTAGENESIS

Aim. The aim of investigation was to reveal availability of wheat-rye translocations in genomes of wheat varieties using cytological and molecular methods. **Methods.** Cytological analysis of meiosis. PCR analysis of DNA. **Results.** The presence of wheat-rye translocation and its localization in all studied varieties. Cytologically unstable varieties were identified. **Conclusions.** It was confirmed feasibility and expediency of combined application of cytological and molecular methods.

Keywords: *Triticum aestivum* L., cytological methods, DNA markers, PCR-analysis, rye-wheat translocation.