

УДК 633.111: 577.21

МОРГУН Б.В.^{1, 2}, ЧУГУНКОВА Т.В.¹, ЛЯЛЬКО І.І.¹, ВЕЛИКОЖОН Л.Г.¹, СТЕПАНЕНКО А.І.²

¹ Інститут фізіології рослин і генетики НАН України,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 31/17, e-mail: bmorgun@gmail.com

² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,

Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ЦИТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СОРТІВ ОЗИМОЇ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ З ПШЕНИЧНО-ЖИТНЬОЮ ТРАНСЛОКАЦІЄЮ

В Україні озима пшениця є провідною зерновою культурою, тому підвищення її стійкості до біотичних та абіотичних чинників, збільшення продуктивності рослин становить одну із важливих проблем. Як відомо, пшениця має один із найбільш складних геномів, розшифровка якого триває і досі [1]. Геном гексаплоїдної м'якої пшениці представлений одразу трьома схожими, але не ідентичними комплексами генів і фактично є комбінацією трьох незалежних геномів (A, B, D), кожен із яких походить від одного з диких предків сучасної пшениці. Слід зазначити, що різноманіття власного комплексу генів м'якої пшениці є недостатнім для вирішення означених проблем, тому її залучають до віддаленої гібридизації. Серед сортів, ліній та іншого селекційного матеріалу м'якої пшениці, що містить гени, одержані в результаті інтрогресивної гібридизації, особливе місце займають форми з пшенично-житніми транслокаціями. Жито ($2n = 2x = 14 RR$) є одним із донорів генів стійкості до різних патогенів (*Lr 26*, *Vr 9*, *Vr 10*, *Sr 27*, *Sr 31*, *Pm 8*, *Pm 17*, *Gb 2*, *Gb 6*). Рослини пшениці з житньою транслокацією можуть бути більш посухостійкими, з підвищеною адаптаційною здатністю, у них збільшується врожайність, вміст білка в зерні [2, 3]. У пшениці [4] описано понад 68 різноманітних транслокацій, які несуть гени стійкості до хвороб та шкідників. Серед них особливе господарське значення мають лише п'ять, у тому числі й пшенично-житня транслокація. Поширення одержали сорти м'якої пшениці, що містять пшенично-житню транслокацію 1BL.1RS, у меншій мірі – транслокацію 1AL.1RS. Для ефективного дослідження генофонду пшениці, а також споріднених видів і родів рослин при інтрогресивній гібридизації достатньо широко використовують молекулярне ДНК-маркування геномів [5, 6]. Для характеристики рослинного матеріалу з пшенично-житніми транслокаціями впроваджують також класичні методи

цитогенетичного аналізу. Дослідження поведінки хромосом в мейозі дозволяє визначати наявність чужорідного матеріалу в геномах інтрогресивних сортів пшениці, а також рівень їх цитологічної стабільності. Вважається, що для стабільних сортів нормою у профазі першого мейотичного поділу є наявність 21 бівалента, тетради – без порушень. Стабільність генома інтрогресивних форм обумовлена компенсаторною здатністю хромосом, що залучені до рекомбінаційних процесів [7]. Метою нашої роботи була розробка методів молекулярно-генетичного маркування геномів та дослідження мейозу у сортів пшениці для визначення пшенично-житньої транслокації.

Матеріали і методи

Досліджували сорти озимої м'якої пшениці Альбатрос одеський, Зимоярка, Фаворитка, Крижинка, Золотоколоса та Смуглянка. Виділення ДНК із рослинного матеріалу проводили СТАБ-методом та використовуючи набір реагентів «ДНК-сорб-С» («AmpliSens», Росія) згідно стандартного протоколу. Наявність пшенично-житньої транслокації визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції, використовуючи маркери до локусів *Xrems 1303* та *Sec 1* [8]. Для визначення хромосомної локалізації пшенично-житньої транслокації (1AL.1RS або 1BL.1RS) у сортів пшениці використовували специфічні пари праймерів до мікросателітного локуса SCM 9 жита та праймери до референтного гену пшениці *TaTm20*. Продукти ампліфікації розділяли електрофоретично у 2,0 % агарозному гелі з візуалізацією в ультрафіолетовому світлі за допомогою етидій броміду як фарбувального реагента. Для дослідження мейозу у сортах пшениці відбирали колоси, що знаходились у трубці, фіксували у оцтовому алкоголі (1 : 3), фарбували у 2 % оцетокарміні та готували тимчасові давлені препарати за загальноприйнятою методикою. У кожному варіанті досліджували по 10–15 колосів, 12–20

пиляків в одному колосі. Наявність чужорідного генетичного матеріалу встановлювали за асоціаціями хромосом в М1мейоза та на стадії Т2. Для кожного сорту вивчали в середньому по 15–25 чітких метафазних пластинок. Дослідження тетрад мікроспор проводили на 150–200 клітинах одного колоса.

Результати та обговорення

Для ідентифікації пшенично-житніх транслокацій за допомогою молекулярно-генетичного маркування геномів було проаналізовано 5 сортів озимої м'якої пшениці селекції ІФРГ НАН України. Сорт Альбатрос одеський (без транслокації) використовували в якості контролю. Першим етапом роботи було молекулярно-генетичне дослідження сортів пшениці на наявність транслокованого короткого плеча хромосоми жита 1RS. Для цього проводили мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію з використанням праймерів

до референтного гену пшениці *TaTm20* (934 п.н.) та локусів *Xrems 1303* (290 п.н.) і *Sec 1* (400 п.н.), які є маркерами до короткого плеча першої хромосоми жита (рис. 1, 2).

Наявність амплікону довжиною 290 п.н. вказує на присутність житньої транслокації у геномі пшениці, а амплікон довжиною 400 п.н. визначає локус *Sec 1*, що відповідає за синтез житніх білків – ω-секалінів (рис. 2).

Аналіз електрофореграм свідчить про відсутність пшенично-житньої транслокації у сортів Альбатрос одеський та Зимоярка і її наявність у інших чотирьох досліджених сортів. За допомогою молекулярно-генетичного маркування локусу *SCM9* жита визначали хромосомну локалізацію транслокованого плеча 1RS. На рис. 3 показано розділення сортів пшениці за наявністю у них 1AL.1RS (226 п.н.) або 1BL.1RS (206 п.н.) транслокації.

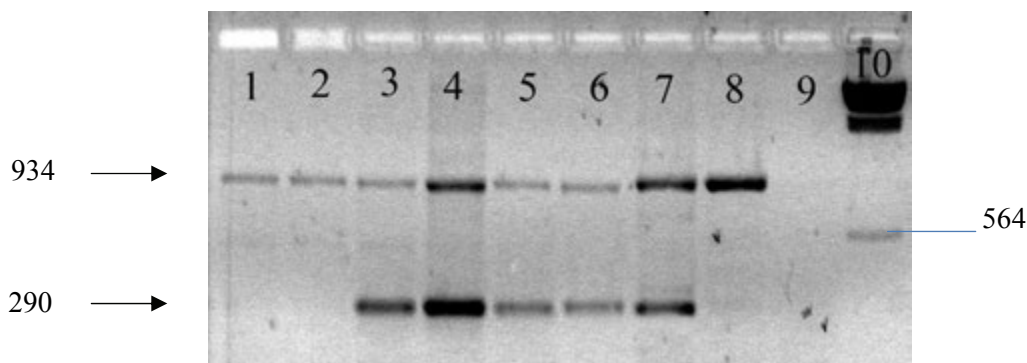


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК сортів м'якої пшениці із праймерами до гену *TaTm20* та локусу *Xrems 1303*: 1 – Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Фаворитка; 4 – Крижинка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією; 8 – контроль без транслокації; 9 – контроль – ТЕ-буфер; 10 – маркер ДНК л/*Hind III*

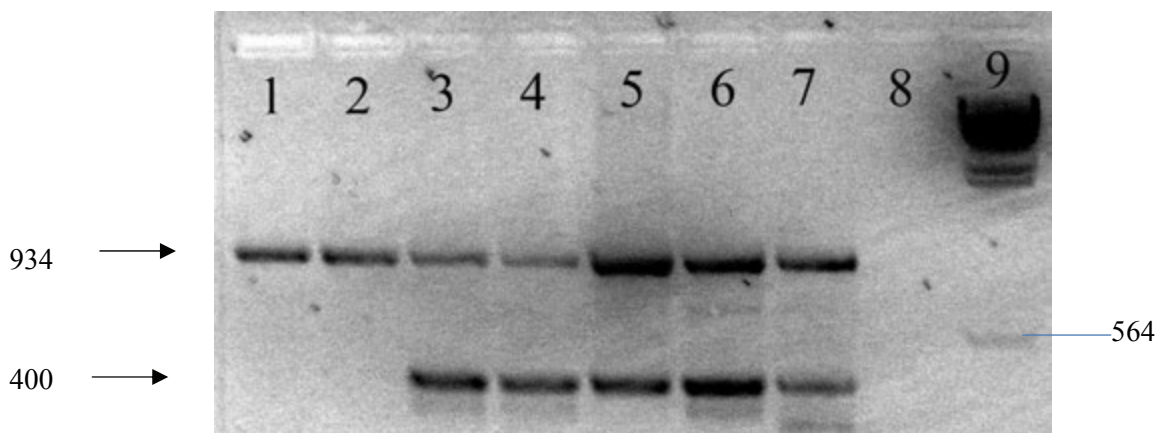


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК сортів м'якої пшениці із праймерами до гену *TaTm20* та локусу *Sec 1*: 1 – Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Фаворитка; 4 – Крижинка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією; 8 – контроль – ТЕ-буфер; 9 – маркер ДНК л/*Hind III*

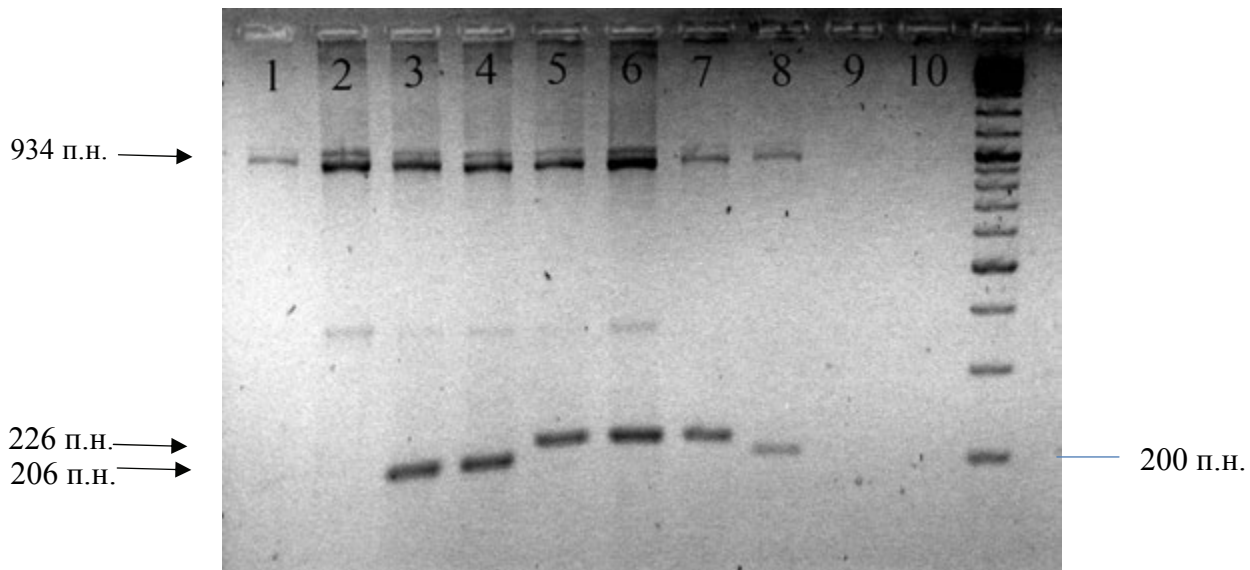


Рис. 3. Електрофореграма продуктів ампліфікації загальної ДНК пшениці на визначення хромосомної локалізації 1AL- та 1BL-транслокацій: 1– Альбатрос одеський; 2 – Зимоярка; 3 – Крижинка; 4 – Фаворитка; 5 – Золотоколоса; 6 – Смуглянка; 7 – контроль з транслокацією 1AL.1RS; 8 – контроль з транслокацією 1BL. 1RS; 9 – контроль без транслокацій; 10 – контроль – TE-буфер; 11 – маркер ДНК LadderMix

За результатами аналізу електрофореграми (рис. 3) сорти Крижинка і Фаворитка, що містять амплікони у 206 п.н., є носіями пшенично-житньої транслокації у першій хромосомі пшениці геному В (1BL.1RS), а сорти Золотоколоса і Смуглянка, у яких виявлено амплікон 226 п.н. – транслокації у першій хромосомі пшениці геному А (1AL. 1RS).

Вивчення характеру кон'югації хромосом у метафазі I мейозу сортів Золотоколоса, Колумбія, Смуглянка, Фаворитка засвідчив присутність в їх геномах чужорідного генетичного матеріалу, який може бути представлений як транслокаціями, так і заміщеннями [9, 10]. У всіх зазначених сортів в мейозі на стадії M1 спостерігали відкриті і закриті бівалентні асоціації, наявність одного-трьох унівалентів. Крім того, на стадіях анафази першого та другого ділень мейозу спостерігали клітини з мостами, фрагментами, затримку у розходженні до полюсів унівалентних

хромосом. У сортів Золотоколоса, Фаворитка та Колумбія вищі асоціації хромосом, головним чином, були представлені закритими та відкритими бівалентами – 21^{II}_{3} , $20^{\text{II}}_{3}+1^{\text{II}}_{\text{B}}$, $19^{\text{II}}_{3}+2^{\text{II}}_{\text{B}}$ іноді $18^{\text{II}}_{3}+3^{\text{II}}_{\text{B}}$, зустрічалися клітини з унівалентами, частота яких була на рівні 0,5–1,7 %. Це значно нижче норми, яка характерна для стабільних інтрогресивних сортів.

Висновки

Таким чином, застосування методу полімеразної ланцюгової реакції дозволило ідентифікувати пшенично-житню транслокацію у сортах пшениці, що свідчить про можливість використання ДНК-технологій у селекційно-генетичних програмах. Виходячи з даних, отриманих за використання цитологічного аналізу, можна зробити висновки про те, що сорти Золотоколоса, Фаворитка, Колумбія, відносяться до цитологічно стабільних інтрогресивних сортів, які несуть пшенично-житні транслокації.

Література

1. Brenchley R., Spannagl N., Pfeifer M. et al. Analysis of the bread wheat genome using whole – genome shotgun sequencing // *Nature*. – 2012. – 491. – P. 705–710.
2. Boros D., Lukaszewski A.J., Aniol A., Ochodzki P. Chromosome location of genes controlling the content of dietary fibre and arabinoxylans in rye // *Euphytica*. – 2002. – 128. – P. 1–8.
3. Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, steam and stripe rust and secalins on the short arm of rye chromosome 1R // *Theor. Appl. Genet.* – 1990. – 80. – P. 609–616.
4. Friebe B., Raupp W.J., Gill B.S. Alien genes in wheat improvement. – *Wheat in Global Environment I // Proc. 6-th Intern. Wheat Conference, 5–9 June, Budapest, Hungary.* – 2001. – P. 709–720.

5. Степаненко А.И., Моргун Б.В., Чугункова Т.В., Адаменко Н.И., 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. 311–3186.
6. Моргун Б.В., Степаненко А.И., Чугункова Т.В. Молекулярно-генетический анализ сортообразцов озимой пшеницы, выращенных в различных экологических зонах Украины // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2013. – 15, № 3 (4). – С. 1390–1393.
7. Бадаева Е.Д., Прокофьева З.Д., Билинская Е.Н. и др. Цитогенетический анализ устойчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе гибридов, полученных от скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., AABBDD) с пшеницами группы *Timopheevii* (A¹A¹GG) // Генетика. – 2000. – 36, № 12. – С.1663–1673.
8. Сиволап Ю.М., Чеботар С.В., Сударчук Л.В. Детекція 1R_S.1A_L, 1R_S.1B_L та модифікованої транслокації за 1R_S хромосомою у селекційних форм м'якої пшениці. Методичні рекомендації. – Одеса. – 2011. – 13 с.
9. 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.
10. Мощный И.И., Чеботарь С.В., Сударчук Л.В., Галаев А.В., Сиволап Ю.М. Идентификация замещения (1B)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.

MORGUN B.V.^{1, 2}, **CHUGUNKOVA T.V.**¹, **LYALCO I.I.**¹, **VELYKOZHON L.G.**¹, **STEPANENKO A.I.**²

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

² *Institute of Cell Biology and Genetic Engineering National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 148*

THE MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION AND CYTOLOGY PECULIARITIES OF VARIETIES OF WINTER WHEAT WITH WHEAT-RYE TRANSLOCATION

Aims. To reveal the presence of wheat-rye translocations in the genome of varieties of soft winter wheat by PCR-analysis using primers to locus Xrems 1303 and ω-secalin located in the short arm of chromosome 1R of rye and cytological methods. **Methods.** DNA analysis by polymerase chain reaction and electrophoretic determination of amplification products. The methods of meiosis analysis. **Results.** Varieties of soft winter wheat with wheat-rye translocation were discovered. **Conclusions.** Specific primers to locus located in chromosome arm 1RS of rye can be used to analyze the presence in wheat wheat-rye translocation. The presence of wheat-rye translocation are confirmed by cytological analysis.

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

УДК 633.854.54:631.527.823

ПОЛЯКОВ В.А.¹, **ЛЯХ В.А.**²

¹ *Институт масличных культур НААН,*

Украина, 70417, Запорожский район, Запорожская область, пос. Солнечный, ул. Институтская, 1, e-mail: eradan_90@mail.ru

² *Запорожский национальный университет,*

Украина, 69600, г. Запорожье, ул. Жуковского, 66

НАСЛЕДОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ КОРОБОЧКИ МЕЖВИДОВЫМИ ГИБРИДАМИ F₁ ЛЬНА

Род *Linum* включает в себя не менее ста видов с разным количеством хромосом от $n = 6$ до $n = 30$ [1, 2]. Они различаются по морфологическим, физиологическим и биохимическим признакам. Масличный лен *Linum humile* Mill. входит в группу $n = 15$. В эту же группу входят и дикие виды *L. angustifolium*

Huds., *L. bienne* Mill., *L. hispanicum* Mill. и *L. crepitans* (Boenn.) Dumort. Согласно большинству исследований, именно эти виды являются ближайшими родственниками культурного льна [2–4]. Многие ученые полагают, что вследствие более примитивного типа организации хромосом вид *L. angustifolium*