

УДК 633.111:577.21

МОЛЕКУЛЯРНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЛОКАЛІЗАЦІЇ ЖИТНІХ ТРАНСЛОКАЦІЙ У СОРТАХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ТА ЇХ ЦИТОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА

Б.В. МОРГУН^{1,2}, А.І. СТЕПАНЕНКО², Т.В. ЧУГУНКОВА¹, І.І. ЛЯЛЬКО¹,
О.В. СТЕПАНЕНКО², Л.Г. ВЕЛИКОЖОН¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: bmorgun@gmail.com

²Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук
України
03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

Методом ДНК-маркерів досліджено поширені сорти м'якої пшениці української селекції. Оптимізувавши умови реакції мультиплексної ампліфікації, ми визначили хромосомну локалізацію пшенично-житніх 1AL.1RS та 1BL.1RS транслокацій. Виявлено цитологічні порушення у мейозі, які дають змогу ідентифікувати сорти — носії пшенично-житніх транслокацій.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., ДНК-маркери, пшенично-житні транслокації, мейоз.

Важливим і складним завданням як класичної, так і молекулярної генетики є аналіз та добір генотипів із генами, які контролюють господарсько-цінні ознаки. Перевіреною джерелом для передачі у геном пшениці (*Triticum aestivum* L.) корисних ознак є хромосома 1R жита (*Secale cereale* L.). Сорти та лінії з пшенично-житніми транслокаціями й заміщеннями хромосом широко використовуються у багатьох програмах схрещувань. Показано, що експресія привнесених генів стійкості, вмісту білка і продуктивності ліній пшениці з транслокаціями залежить як від походження хроматину жита, так і від генотипного середовища пшениці [2, 12, 14]. Ідентифікувати чужорідний генетичний матеріал можливо за допомогою надійних систем молекулярного ДНК-маркування. Маркер-допоміжна селекція (Marker Assisted Selection) активно втілюється в селекційний процес багатьох культур [5, 6]. На одне з перших місць вона виходить і в селекції пшениці, зокрема, для моніторингу й ідентифікації 1AL.1RS та 1BL.1RS пшенично-житніх транслокацій [7]. Сьогодні вважають, що ефективність ДНК-маркерів достатньо висока. Такий підхід дає змогу значно скоротити селекційний процес.

Однією зі складових вивчення генетичних ресурсів рослин, зокрема отриманих у результаті інтрогресивної гібридизації, може бути цитогенетичний аналіз мейозу. Дослідження особливостей поведінки хромосом уможливує виявлення чужорідного матеріалу в геномах пшениці. Відхилення від нормального ходу редукційного поділу виявляються в утворенні унівалентів, неодноразовому й нерівномірному розходженні хро-

мосом, формуванні діад і тетрад з аномаліями. Порушення правильного перебігу мейозу трапляються у більшості гібридних форм злаків [1, 9]. Відомі дані про підвищену стерильність пилку в сортів із житньою транслокацією або із заміщенням 1В хромосоми пшениці на 1R хромосому жита. Разом з тим виявлено, що ціла хромосома жита 1R або її коротке плече, додані до геному м'якої пшениці, не впливають на фертильність рослин [10].

Метою нашої роботи була ідентифікація пшенично-житніх транслокацій за використання різних маркерних систем та дослідження особливостей мейозу в сортів м'якої пшениці.

Методика

Досліджено 28 сортів пшениці української селекції. Загальну ДНК виділяли модифікованим СТАВ-методом із зеленої маси та зернівок [17]. Для мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції з метою визначення хромосомної локалізації транслокацій використовували праймери SCM9F і SCM9R до мікросателітного локусу *SCM9* жита (1RS плече) [16] та праймери до референтного гена пшениці *TaTM20* [13]. Режим ампліфікації: первинна денатурація — 94 °С, 3 хв та 34 цикли: денатурація — 94 °С, 30 с, реасоціація — 60 °С, 30 с, елонгація — 72 °С, 1 хв, кінцева елонгація — 72 °С, 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм. За наявності 1AL.1RS очікували амплікон 226 пн, 1BL.1RS — 206 пн, за відсутності транслокації — сигналу не спостерігали.

Мультиплексну полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили з використанням пари цільових праймерів PAWS5, PAWS6 [15] і праймера до референтного гена пшениці *act* [11]. Режим ампліфікації: первинна денатурація — 94 °С, 3 хв та 34 цикли: денатурація — 94 °С, 30 с, реасоціація — 61 °С, 30 с, елонгація — 72 °С, 24 с, кінцева елонгація — 72 °С, 5 хв. Продукти ампліфікації візуалізували в ультрафіолетовому світлі після їх електрофоретичного розділення у 1,2 %-му агарозному гелі з бромистим етидієм. За наявності транслокації 1AL.1RS очікували амплікони 233 та 338 пн, у випадку 1BL.1RS та за відсутності транслокації — сигналу не спостерігали.

Для дослідження мейозу відбирали колоси з рослин, що знаходились у фазі виходу в трубку, фіксували у суміші льодяної оцтової кислоти та 96° спирту (1 : 3), фарбували у 2 %-му оцтокарміні та готували тимчасові давлені препарати за загальноприйнятою методикою [4]. Відбирали по 10—15 колосів одного сорту й досліджували 12—20 пиляків в одному колосі. Препарати аналізували за допомогою мікроскопа Amplival зі збільшенням 15×40 і 15×100.

Результати та обговорення

Добір праймерів і розробка умов використання молекулярних маркерів — важливий і необхідний етап MAS-селекції. Для визначення локалізації пшенично-житньої транслокації за допомогою пари праймерів SCM9F, SCM9R та референтного гена пшениці *TaTM20* було оптимізовано умови проведення мультиплексної ПЛР шляхом градієнтної реакції за різних температур відпалу праймерів (58, 60, 62 °С). Кількість праймерів

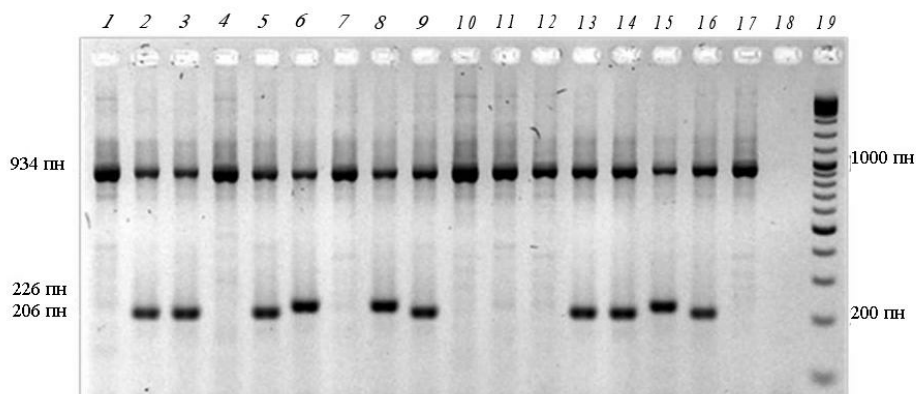


Рис. 1. Электрофореграма мультиплексної ПЛР з праймерами SCM9F і SCM9R сортів пшениці:

1 – Наталка; 2 – Пивна; 3 – Київська остиста; 4 – Ласуня; 5 – Крижинка; 6 – Веснянка; 7 – Богдана; 8 – Миронівська 808; 9 – Миронівська 30; 10 – Білява; 11 – Панна; 12 – Federer; 13, 14 – Соломія; 15 – Колумбія (1AL.1RS); 16 – Фаворитка (1BL.1RS); 17 – Ятрань 60 (без транслокації); 18 – негативний контроль (TE буфер); 19 – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)

на референтний ген була вдвічі меншою, ніж на цільові гени. Виявлено, що оптимальною є температура 60 °С, за якої спостерігали найменшу кількість мінорних фрагментів, тому саме її було обрано для проведення подальших досліджень.

Із використанням дібраних умов проведення реакції ампліфікації вивчено сорти озимої м'якої пшениці на наявність у їхніх геномах мікросателітного локусу *SCM9*. Це дало змогу ідентифікувати сорти з транслокаціями 1AL.1RS (226 пн) та 1BL.1RS (206 пн) (рис. 1).

Для підтвердження кодомінантності цієї маркерної системи створено модель гетерозиготи шляхом об'єднання (в однакових кількостях) загальної ДНК сортів Колумбія (1AL.1RS) та Фаворитка (1BL.1RS). Результати проведеної реакції наведено на рис. 2.

Відомо [19], що коли донором транслокації була пшениця Salmon, у сортів з 1BL.1RS за використання праймерів SCM9F/R спостерігався нехарактерний амплікон 226 пн. Для підтвердження адекватності попередньо отриманих результатів з цими праймерами використано іншу маркерну систему, основою якої є праймери PAWS5, PAWS6, що визначають житоспецифічні повтори ДНК родини генів *R173*. Відомо, що ця родина

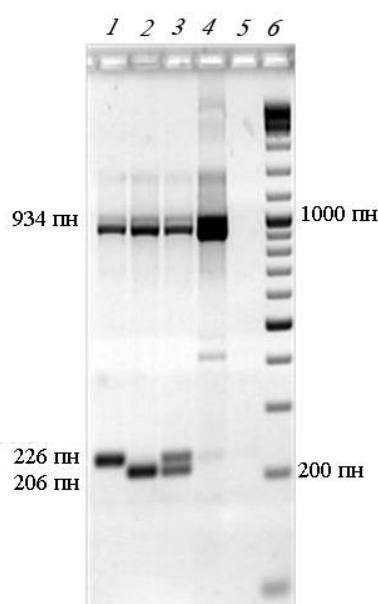


Рис. 2. Электрофореграма мультиплексної ПЛР з праймерами SCM9F і SCM9R з модельною гетерозиготою:

1 – Колумбія (1AL.1RS); 2 – Фаворитка (1BL.1RS); 3 – Колумбія (1AL.1RS) + Фаворитка (1BL.1RS); 4 – Ятрань 60 (без транслокації); 5 – негативний контроль (TE буфер); 6 – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)

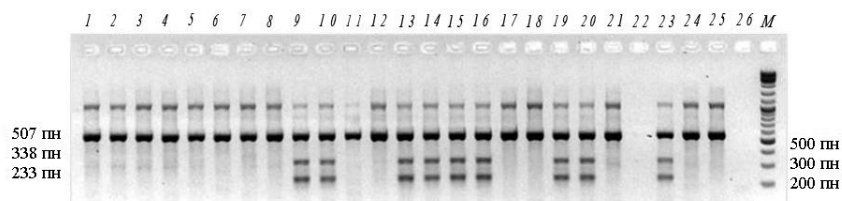


Рис. 3. Електрофореграма мультиплексної ПЛР з праймерами PAWS5 і PAWS6 сортів пшениці:

1, 2 – Миронівська 61; 3, 4 – Новокиївська; 5, 6 – Трипільська; 7, 8 – Миронівська 65; 9, 10 – Золото України; 11, 12 – Здобуток; 13, 14 – Грездівлиця; 15, 16 – Доброслава; 17, 18 – Лідер; 19, 20 – Новосмуглянка; 21, 22 – Соломія; 23 – Колумбія; 24 – Фаворитка (1BL.1RS); 25 – Ятрань 60 (без транслокації); 26 – негативний контроль (TE буфер); M – маркер молекулярної маси Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (Thermo Scientific)

поліморфна, складається з 15 000 копій на диплоїдний геном жита і в разі її походження із сорту жита *Petcus* розміщена між центромерою і локусом *Sec-1* короткого плеча хромосоми 1R [15]. Такий підхід уможливує проведення аналізу сортів з урахуванням множинних джерел пшенично-житніх транслокацій [18]. Типову електрофореграму мультиплексної ПЛР за використання цільових праймерів PAWS5/S6 наведено на рис. 3.

Аналіз отриманих результатів засвідчує, що використання праймерів до родини *R173* житоспецифічних повторів ДНК виявляє в частини сортів пшениці існування ампліконів завдовжки 233 та 338 пн, що підтверджує існування в їх геномі транслокації 1AL.1RS [19]. У даному випадку це сорти Золото України, Грездівлиця, Доброслава, Новосмуглянка та використаний як контроль на транслокацію 1AL.1RS сорт Колумбія. Перелік сортів із транслокаціями наведено в таблиці.

Молекулярно-генетичні дослідження показали, що комплексне використання двох пар цільових праймерів SCM9 і PAWS5/S6 до генів, які

Сорти м'якої пшениці з транслокаціями 1AL.1RS та 1BL.1RS

Сорт	Тип транслокації	Сорт	Тип транслокації
Веснянка	1AL.1RS	Новокиївська	1BL.1RS
Гілея	1AL.1RS	Новосмуглянка	1AL.1RS
Грездівлиця	1AL.1RS	Пивна	1BL.1RS
Доброслава	1AL.1RS	Полянка	1AL.1RS
Золото України	1AL.1RS	Пошана	1AL.1RS
Золотоколоса	1AL.1RS	Славна	1AL.1RS
Київська остиста	1BL.1RS	Смуглянка	1AL.1RS
Княгиня Ольга	1AL.1RS	Соломія	1BL.1RS
Колумбія	1AL.1RS	Солоха	1AL.1RS
Крижинка	1BL.1RS	Сотниця	1AL.1RS
Ластівка	1AL.1RS	Спасівка	1AL.1RS
Миронівська 30	1BL.1RS	Трипільська	1BL.1RS-*
Миронівська 61	1BL.1RS	Фаворитка	1BL.1RS
Миронівська 65	1BL.1RS	Чорнява	1AL.1RS

*Негомогенні сорти, генотипи як з транслокацією, так і без неї.

розміщені в короткому плечі хромосоми 1R жита, уможливило ідентифікацію пшенично-житньої транслокації й підтвердження точності отриманих результатів незалежно від походження транслокації.

Вивчення сортів пшениці на цитогенетичному рівні шляхом аналізу мікроспорогенезу показало, що в сортів без пшенично-житньої транслокації (Донська напівкарликова, Одеська 267, Ятрань 60) хромосомні асоціації на стадії профазі—метафазі першого поділу мейозу представлені в основному закритими бівалентами — 21^{p_3} , порушення на інших стадіях мейозу не перевищували 1,0 %, що характерно для сортів, які не містять інтрогресивного матеріалу.

У сортів Золотоколоса, Полянка із транслокацією 1AL.1RS та Миронівська 61, Миронівська 65, Новокиївська, Фаворитка із транслокацією 1BL.1RS вищі асоціації хромосом представлені як закритими, так і відкритими бівалентами (21^{p_3} , $20^{p_3} + 1^{p_B}$, $19^{p_3} + 2^{p_B}$, іноді $18^{p_3} + 3^{p_3}$). У перелічених сортів поряд із відкритими бівалентами траплялися клітини з унівалентами, частота яких не перевищувала 2 %, що характерно для сортів, у каріотипі яких є пшенично-житня транслокація [3].

У мікроспорогенезі сортів Смуглянка, Чорнява, Сотниця, Спасівка з пшенично-житньою транслокацією 1AL.1RS крім вищих бівалентних асоціацій із частотою 12—14 % траплялися клітини з 2—3 унівалентами. На стадії тетрад виявляли мікроядра та інші порушення (близько 20 %). Відомо [1, 8], що порушення кон'югації хромосом в M1 (>10 %), підвищена частота клітин з 2—4 унівалентами, затримка унівалентів на екваторі в A1, утворення в тетрадах мікроядер, як правило, трапляються у цитологічно нестабільних інтрогресивних форм.

Отже, використання двох взаємодоповнювальних маркерних систем та їх адаптація для проведення мультиплексних ПЛР підтвердили можливість їх залучення для аналізу українського сортового матеріалу на хромосомну локалізацію пшенично-житніх транслокацій. 28 сортів було схарактеризовано на локалізацію і тип наявної житньої транслокації. Цитологічно показано, що за характером кон'югації хромосом у метафазі першого поділу мейозу та за наявністю мікроядер у тетрадах можна ідентифікувати сорти — носії пшенично-житніх транслокацій.

1. Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П. и др. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетика. — 2009. — 45, № 12. — С. 1616—1626.
2. Красилова Н.М., Адонина И.Г., Силкова О.Г., Шумный В.К. Особенности передачи хромосомы ржи 2R при беккроссировании пшенично-ржаных замещенных линий 2R (2D) различными сортами мягкой пшеницы // Вавилов. журн. генетики и селекции. — 2011. — 15, № 3. — С. 554—562.
3. Моцный И.И., Чеботарь С.В., Сударчук Л.В. и др. Идентификация замещения (1B)1R и транслокации 1BL.1RS у интрогрессивных линий озимой пшеницы цитологическим и молекулярно-генетическим методами // Там же. — 2012. — 16, № 1. — С. 212—222.
4. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. — М.: Колос, 1980. — 304 с.
5. Сиволап Ю.М., Волкодав В.В., Бальвінська М.С. та ін. Ідентифікація і рестрація генотипів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.), ячменю (*Hordeum vulgare* L.), кукурудзи (*Zea mays* L.), соняшника (*Helianthus annuus* L.) за допомогою аналізу мікросателітних локусів: Метод. рекомендації. — Одеса, 2004. — 14 с.
6. Сиволап Ю.М. Молекулярные маркеры и селекция // Цитология и генетика. — 2013. — 47, № 3. — С. 71—80.
7. Сиволап Ю.М., Чеботарь 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: Метод. рекомендації. — Одеса, 2011. — 13 с.
8. Силкова О.Г., Перемышлова 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.

9. Силкова О.Г., Шапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // Там же. — 2011. — 47, № 4. — С. 437—448.
10. Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. et al. Characterization of wheat-alien translocations conferring to diseases and pests: current status // Euphytica. — 1996. — 91. — P. 59—87.
11. Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for Tamyb10 related to R-1, red grain color gene in wheat // Theor. Appl. Genet. — 2011. — 122. — P. 1561—1576.
12. Kim W., Johnson P.S., Baenziger P.S. et al. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources // Crop Sci. — 2004. — 44. — P. 1254—1258.
13. Kim Y.Y., Kim D.Y., Shim D. Expression of the novel wheat gene *Tm20* confers enhanced cadmium tolerance to bakers' yeast // J. Biol. Chem. — 2008. — 283, N 23. — P. 15893—15902.
14. Mater Y., Baenziger S., Gill K. et al. Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from «Amigo» and «Kavkaz» wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL // Genome. — 2004. — 47. — P. 292—298.
15. Rogowsky P.M., Shepherd K.W., Langridge P. Polymerase chain reaction based mapping of rye involving repeated DNA sequences // Ibid. — 1992. — 35. — P. 621—626.
16. Saal D., Wricke G. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.) // Ibid. — 1999. — 42. — P. 964—972.
17. Stewart C.N., Via L.E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications // Bio Techniques. — 1993. — 14, N 5. — P. 748—749.
18. Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background // Plant Breed. — 2007. — 126. — P. 482—486.
19. Yediy F.E., Baloch F.S., Hakan K.B. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces // Genet. Res. Crop Evol. — 2010. — 57. — P. 119—129.

Отримано 24.03.14

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛОКАЛИЗАЦИИ РЖАНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ В СОРТАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И ИХ ЦИТОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Б.В. Моргун^{1, 2}, А.И. Степаненко², Т.В. Чугункова¹, И.И. Лялько¹, Е.В. Степаненко², Л.Г. Великожон¹

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев
²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Методом ДНК-маркеров исследованы распространенные сорта мягкой пшеницы украинской селекции. Оптимизировав условия реакции мультиплексной амплификации, мы определили хромосомную локализацию пшенично-ржаных 1AL.1RS и 1BL.1RS транслокаций. Выявлены цитологические нарушения в мейозе, которые позволяют идентифицировать сорта — носители пшенично-ржаных транслокаций.

MOLECULAR IDENTIFICATION OF RYE TRANSLOCATIONS IN COMMON WHEAT VARIETIES AND THEIR CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS

B.V. Morgun^{1, 2}, A.I. Stepanenko², T.V. Chugunkova¹, I.I. Lyalko¹, E.V. Stepanenko², L.G. Velykozhon¹

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

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

Ukrainian cultivars of common wheat were studied by DNA-markers method. Conditions of multiplex amplification for detection of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations were optimized. It has been shown the possibility to identify wheat cultivars with wheat-rye translocations using cytological approach.

Key words: *Triticum aestivum* L., DNA-markers, wheat-rye translocations, meiosis.