

АНТОНЮК М.З., БОДИЛЬОВА М.В., ТЕРНОВСЬКА Т.К.

Національний університет "Києво-Могилянська Академія" МОН України,
Україна, 04070, Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

УМОВИ ВИКОРИСТАННЯ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ ЯК МАРКЕРІВ ПРИ ІНТРОГРЕСІЇ ГЕНІВ *Pm* ДО М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Використання молекулярно-генетичних маркерів для оптимізації процесу перенесення чужинних генів, зокрема, генів стійкості до захворювань, справедливо вважається сучасним та вкрай бажаним прийомом у генетиці [1]. Такий погляд на роль маркерних генів у прикладних генетичних розробках вимагає від генетиків супроводжувати кожен чужинний ген, який увійшов до складу геному певної інтрогресивної лінії пшениці у складі якогось обсягу чужинного хроматину, молекулярним маркером. За цим маркером буде вестися добір у популяціях, що розщеплюються, при використанні інтрогресивної лінії у якості джерела чужинного корисного гена при його перенесенні до генотипу сучасного високопродуктивного комерційного сорту м'якої пшениці. Борошниста роса м'якої пшениці є однією з найбільш суттєвих хвороб пшениці у Європі. Хоча на сьогодні ідентифіковано вже 43 вертикальних генів стійкості до цього захворювання [2], більшість з них швидко втрачають стійкість до збудника через виникнення нових рас патогена. Серед генів *Pm* пшениці чужинного походження найбільш ефективними та тривалими за терміном збереження стійкості до патогену є гени егілопсів секції *Sitopsis*. Тому питання перенесення нових генів *Pm* від цих видів до м'якої пшениці не втрачає своєї актуальності. Наше дослідження спрямовано на порівняльну характеристику інтрогресивних ліній *Triticum aestivum*/*Aegilops sharonensis* та їх праатьківських генотипів, сорту Аврора та геномно-заміщеної форми Аврозис щодо поліморфізму за низькою мікросателітних локусів хромоми 3D пшениці.

Матеріал та методи

Рослинний матеріал: сорт *Triticum aestivum* L. (A^aA^aBBDD) Аврора, геномно-заміщена форма Аврозис (A^aA^aBBS'S¹), 25 інтрогресивних ліній — похідних Аврозису. Для екстракції ДНК застосовували стандартну СТАВ методику виділення ДНК із паростків. Полімеразну ланцюгову реакцію проводили згідно умов, вказаних оригінаторами праймерів до мікросателітних локусів. Електрофорез продуктів ампліфікацій проводили у вертикальному 6% поліакриламідному гелі у денатуруючих умовах. Виявляли фрагменти у гелях за допомогою нітрату срібла.

Результати та обговорення

Сорт м'якої пшениці Аврора, на генетичній основі якого було створено інтрогресивні лінії, уражається борошнистою росою на рівні 3-х балів. Геномно-заміщена форма Аврозис характеризується повною резистентністю до борошнистої роси, 9 балів. Стійкість до борошнистої роси інтрогресивних

ліній м'якої пшениці — похідних Аврозису пояснюється включенням до геному генотипу Аврора хромосоми 3S¹ виду *Aegilops sharonensis*, повний геном якого входить до складу геномно-заміщеної форми Аврозис, чи якоїсь її частини. В першому випадку електрофоретичний спектр стійкої лінії буде характеризуватися наявністю продукту ампліфікації, характерного для генотипу Аврозис за всіма мікросателітними маркерами, які досліджувались та за якими генотип Аврозису дає спектр продуктів ампліфікації, який відрізняється від спектру Аврори. Якщо стійка лінія не є чужинно-заміщеною, ген стійкості входить до складу чужинної транслокації на хромосому пшениці. В цьому випадку лінія за певним мікросателітним локусом може бути схожою як з генотипом Аврозису, якщо до складу геному Аврора ген стійкості увійшов разом з мікросателітним локусом, так і з генотипом Аврори, якщо зчеплення між вказаними локусами під час транслокації було розірвано. Отже, для пошуку інтрогресивних ліній, придатних для схрещування з сортом Аврора чи з іншими сортами м'якої пшениці для створення популяції, що розщеплюється, придатною для роботи з нею методом BSA, потрібно для кожного мікросателітного локусу порівняти спектри компонентів ампліфікації інтрогресивної лінії, генотипу Аврора як рекурентного при створенні інтрогресивних ліній та геномно-заміщеної форми Аврозис, джерело чужинних інтрогресій у лініях. На рисунках 1–4 представлено кілька прикладів електрофоретичних спектрів продуктів ампліфікації з праймерами до вказаного у підпису до рисунку мікросателітного локусу.

За мікросателітним локусом *Xcfd55* (рис. 1, табл.) від спектру Аврори не відрізняються спектри продуктів ампліфікації 11 інтрогресивних ліній — похідних Аврозису. Спектр Аврозису та деяких ліній характеризується наявністю більш повільного компонента. Три інтрогресивні лінії характеризуються 0-алелем.

За мікросателітом *Xcfd64* (рис. 2, табл.) спектр Аврори не відрізняється від спектрів 19-ті інтрогресивних ліній, але відрізняється від спектру Аврозису.

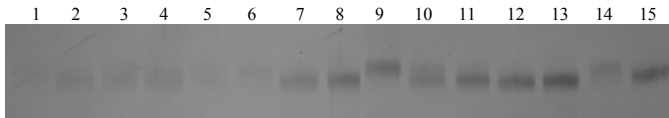


Рис. 1. Локус *Xcfd55*: 1 — res131, 2 — res130, 3 — res129, 4 — res128, 5 — res127, 6, 14 — Аврозис, 7 — Аврора, 8 — res126, 9 — res122, 10 — res121, 11 — res118, 12 — res117, 13 — res115

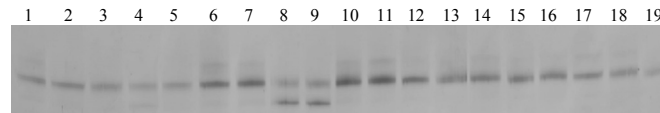


Рис. 2. Локус *Xcfd64*: 1 — res137, 2 — res135, 3 — res134, 4 — res132, 5 — res131, 6 — res130, 7 — res129, 8, 9 — Аврозис, 10 — Аврора, 11 — res128, 12 — res127, 13 — res126, 14 — res122, 15 — res121, 16 — res118, 17 — res117, 18 — res115, 19 — res121

Результати порівняння спектрів продуктів ампліфікації інтрогресивних ліній — похідних Аврозису зі спектрами генотипів Аврора та Аврозис

Генотип	Мікросателітні локуси					
	<i>Xcfd55</i>	<i>Xcfd64</i>	<i>Xcfd141</i>	<i>Xcfd152</i>	<i>Xcfd211</i>	<i>Xcfd223</i>
res115	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res117	Авр	Авр	Авр	інший	Авр	sis
res118	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res121	Sis/Авр	Авр ²	0	Авр	Авр	Авр
res122	Sis	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res126	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res127	Sis/Авр	Авр ²	0	Авр	Авр	Авр
res128	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res129	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res130	Sis/Авр	Авр	Авр	sis	Авр	sis
res131	Sis	Авр	0	Авр	Авр	Авр
res132	Sis	Авр ² sis ²	0	Авр	Авр	Авр
res134	Sis/Авр	Авр ²	Авр	Авр	Авр	Авр
res135	Авр	Авр ²	Авр	Авр	Авр	sis
res137	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	sis
res138	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res139	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res140	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res141	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res142	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res143	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res144	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res145	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res146	Sis/Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр
res148	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр	Авр

Примітки: Авр — рухливість продукта ампліфікації така, яка у продукта ампліфікації генотипу Аврора, Авр² — з двох притаманних генотипу Аврора продуктів ампліфікації у наявності тільки нижній, інший — рухливість продукту ампліфікації відрізняється від рухливості продукта ампліфікації генотипів Аврора та Аврозис, sis — рухливість продукта ампліфікації така, яка продукта ампліфікації генотипу Аврозис, sis/Авр — продуктів ампліфікації два, один за рухливість співпадає з продуктом ампліфікації генотипу Аврора, другий — Аврозис.

За мікросателітним локусом *Xcfd141* спектр генотипу Аврора та всіх інших прогресивних ліній характеризується поодиноким розмитим продуктом ампліфікації. Інший спектр, без жодного продукту ампліфікації має тільки Аврозис (табл.). За мікросателітним локусом *Xcfd152* (рис. 3, табл.) спектр генотипу Аврора характеризується поодиноким продуктом ампліфі-

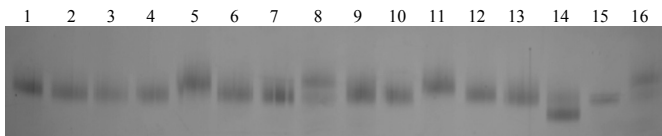


Рис. 3. Локус *Xcfd152*: 1 — res135, 2 — res134, 3 — res132, 4 — res131, 5 — res130, 6 — res129, 7 — res128, 8, 16— Аврозис, 9 — Аврора, 10 — res127, 11 — res122, 12 — res121, 13 — res118, 14 — res117, 15 — res115

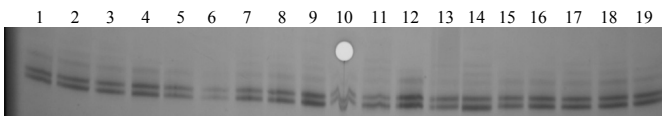


Рис. 4. Локус *Xcfd223*: 1 — res138, 2 — res137, 3 — res135, 4 — res134, 5 — res132, 6 — res131, 7 — res130, 8 — res129, 9 — res128, 10 — res127, 11 — Аврозис, 12 — Аврора, 13 — res126, 14 — res122, 15 — res121, 16, 118 — res118, 17 — res117, 18 — res115

кації, від якого не відрізняються продукти ампліфікації 22 інтрогресивні лінії. Спектр Аврозиса представлений двома продуктами ампліфікації, які повторюються у спектрах трьох ліній.

За мікросателітним локусом *Xcfd211* (табл.) від спектру генотипу Аврора не відрізняється спектр жодної з 25 досліджених інтрогресивних ліній. Іншими за рухомістю компонентами спектру характеризуються генотип Аврозису. За мікросателітним локусом *Xcfd223* (рис. 4, табл.) від спектру генотипу Аврора відрізняються відсутністю мінорних компонентів спектри десяти інтрогресивних ліній. Спектр Аврозису відрізняється від спектру Аврори наявністю ще одного, більш повільного, мінорного компоненту. Зі спектром генотипу Аврозис співпадають спектри 10-ти інтрогресивних ліній. Нуль-алелів за цим локусом не спостерігали.

Локусами, за якими електрофоретичний спектр стійкої лінії характеризувався наявністю продукту ампліфікації, характерного для генотипу Аврозис за всіма мікросателітними маркерами, які досліджувались, а генотип Аврозису дає спектр продуктів ампліфікації, який відрізняється від спектру Аврори, є *Xcfd55*, *Xcfd64*, *Xcfd141*, *Xcfd152* та *Xcfd223*. Жодна із досліджених ліній цим не характеризувалась, отже жодна з них не є чужинно-заміщеною за 3D/3S¹, що підтверджує результати, отримані раніше із застосуванням біохімічних маркерів [3]. Якщо стійка лінія не є чужинно-заміщеною, ген стійкості входить до складу чужинної транслокації на хромосому пшениці. В цьому випадку лінія за певним мікросателітним локусом може бути схожою як з Аврозисом, якщо до складу геному Аврора ген стійкості увійшов разом з мікросателітним локусом, так і з Авророю, якщо зчеплення між вказаними локусами під час транслокації було розірвано. До першого типу ліній відносяться лінії: res122 за локусами *Xcfd55* та *Xcfd223*; res130 за локусами *Xcfd152* та *Xcfd223*; res115, res117, res126, res128, res137 за локусом *Xcfd223*;

res118, res129, res130 за локусом *Xcfd223*, а за локусом *Xcfd55* рослини лінії є гетерозиготами; res127 за локусами *Xcfd152*, *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res121 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*; res131, res132 за локусом *Xcfd141* та гетерозигота за локусом *Xcfd55*, res132 відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res134 є стійкою гетерозиготою за локусом *Xcfd55* та відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res135 відрізняється від генотипу Аврора за локусом *Xcfd64*; res138, res139, res140, res146 є стійкими гетерозиготами за локусом *Xcfd55*.

До ліній другого типу, електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації в яких не відрізняється від спектру Аврора за всіма мікросателітними локусами, відносяться лінії res141, res142, res143, res144, res145, res148.

Якщо стійка лінія має певний мікросателітний локус за спектром ампліфікації, характерним для генотипу Аврора, а не генотипу Аврозис, вона може використовуватися у якості донора гена стійкості при схрещуванні з такими генотипами м'якої пшениці, які за спектром ампліконів того самого мікросателітного локусу відрізняються від генотипу Аврора. У попередньому дослідженні нами було виявлено низку генотипів сучасних сортів м'якої пшениці, які можуть слугувати реципієнтами при схрещуванні з дослідженими інтрогресивними лініями при створенні популяцій для роботи із ними методом BSA.

Література

1. *Randhawal H.S. et al.* Rapid and targeted introgression of genes into popular wheat cultivars using marker-assisted background selection // PLoS ONE. www.plosone.org. 1 June 2009.— V.4, Issue 6.— e5752.
2. *McIntosh R.A. et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
3. *Vdovychenko Zh.V., Antonyuk M.Z., Ternovskaya T.K.* Genetic analysis of the *T. aestivum* / *Ae. sharonensis* introgressive lines of common wheat for resistance to powdery mildew // Cytology and Genetics, 2005, 39, p. 21–30.

Резюме

Оцінено поліморфізм за мікросателітними локусами, локалізованими на хромосомі 3D м'якої пшениці, у інтрогресивних ліній *T. aestivum/Ae. sharonensis* у порівнянні з генотипами Аврора, Аврозис та 11 сучасних сортів м'якої пшениці. Виявлено лінії, які можна використовувати як джерело гену *Pm* у комбінаціях схрещування з певними генотипами при застосуванні методу BSA.

Оценен полиморфизм по микросателлитным локусам, локализованным на хромосоме 3D пшеницы, у интрогрессивных линий *T. aestivum/Ae. sharonensis* по сравнению с генотипами Аврора, Аврозис и 11 современных сортов мягкой пшеницы. Виявлены линии, которые могут служить источником гена *Pm* в комбинациях скрещивания с определенными генотипами при использовании метода BSA.

The polymorphism between *T. aestivum/Ae. sharonensis* introgression lines and Aurora, Aurosis and 11 modern common wheat cultivars in microsatellite loci, located on 3D chromosome of common wheat, has been estimated. The lines that could be used as *Pm* gene donors in crossing combinations with some genotypes are revealed.