

УДК 575.222.73

Н. И. ДУБОВЕЦ, Е. А. СЫЧЕВА, А. Ю. НОСОВА, Е. Б. БОНДАРЕВИЧ,
Л. А. СОЛОВЕЙ, Т. И. ШТЫК, О. И. ЗАЙЦЕВА

АНАЛИЗ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ У ГЕКСАПЛОИДНЫХ ТРИТИКАЛЕ (× *TRITICOSECALE WITTMACK*)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: N. Dubovets@igc.bas-net.by

(Поступила в редакцию 02.05.2013)

Введение. Согласно существующим прогнозам, для удовлетворения потребностей растущего населения Земного шара в продовольствии к 2020 г. необходимо будет увеличить объем его производства более чем в два раза. В решении этой проблемы возможны два подхода: значительное увеличение урожайности главных пищевых (в основном зерновых) культур, либо внедрение новых высокопродуктивных культур, способных занимать специфические сельскохозяйственные ниши.

Из культур второй категории наиболее обещающей является созданная человеком зерновая культура тритикале, совмещающая в себе многие лучшие качества пшеницы и ржи. Популярность этой культуры неуклонно растет как вследствие увеличения урожайности и качества зерна, так и признания ее преимуществ перед другими зерновыми культурами при выращивании в стрессовых условиях. К последним можно отнести способность тритикале расти на бедных, подтопляемых и кислых почвах, хорошо переносить неблагоприятные условия перезимовки и резкие похолодания в весенне-летний период. Тритикале менее чувствительны к наиболее распространенным грибным заболеваниям и лучше других зерновых культур подходят для малозатратных, ресурсосберегающих технологий (из-за способности усваивать больше питательных веществ из почвы и существенно меньшей потребности в химической защите).

Вместе с тем в селекции тритикале имеется целый ряд нерешенных проблем, к наиболее существенным из которых относится недостаточная устойчивость сортов к полеганию. Полегание посевов считается одной из основных причин недобора урожая, оно приводит к нарушению фотосинтетической деятельности растений, ухудшает налив зерновок и существенно затрудняет уборку [1, 2]. Приоритетным направлением устранения склонности к полеганию является селекция на создание короткостебельных сортов.

Известно, что формирование короткостебельности у тритикале определяется как генами от рода *Triticum* L., так и генами от рода *Secale* L. На настоящий момент идентифицировано более 20 генов короткостебельности пшеницы [3–5] и показано наличие как минимум 5 генетических систем, детерминирующих снижение высоты растений у ржи [6–8]. Сложный генетический контроль признака значительно затрудняет селекцию по этому направлению с использованием классических подходов. Существенно ограничивает возможности повышения устойчивости к полеганию и тот факт, что многие селекционно-значимые гены короткостебельности локализованы в хромосомах D-генома пшеницы, который у гексаплоидных тритикале отсутствует. Решение проблемы лежит в использовании при создании короткостебельных сортов тритикале таких современных методов селекции, как хромосомная инженерия и ДНК-маркирование [9,10].

Целью настоящей работы являлся скрининг генофонда сортов, сортообразцов и рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале из коллекций ряда научных учреждений Беларуси и Казахстана по аллельному составу трех генов короткостебельности (*Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8*), наиболее часто используемых в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к полеганию, для выявления перспективного селекционного материала.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили сорта, сортообразцы и рекомбинантные формы гексаплоидных тритикале:

6 сортов и 2 сортообразца озимых гексаплоидных тритикале из коллекции РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию»: Макар, Трибун-2, Легион, Динаро, Бальтико, Беллак, DED 650/01, DED 6232/01;

10 сортообразцов яровых тритикале селекции НПЦ НАН Беларуси по земледелию: Бого-1622, ДЕД 650/01-2555, КП 1/11, КП 51/11, КП 97/11, КП 125/11, КП 255/11, КП 249/11, КП 301/11, КП 305/11;

8 сортообразцов озимых тритикале селекции ТОО «КазНИИ земледелия и растениеводства»: Т-399-1, Т-409-1, Т-4959, Т-989-1, Т-409-3, Т-447-1, Т-457-2 и Т-4351;

8 рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале селекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси, содержащих в своих кариотипах 2D(2A)-, 2D(2B)- и 4D(4B)-замещения хромосом (таблица).

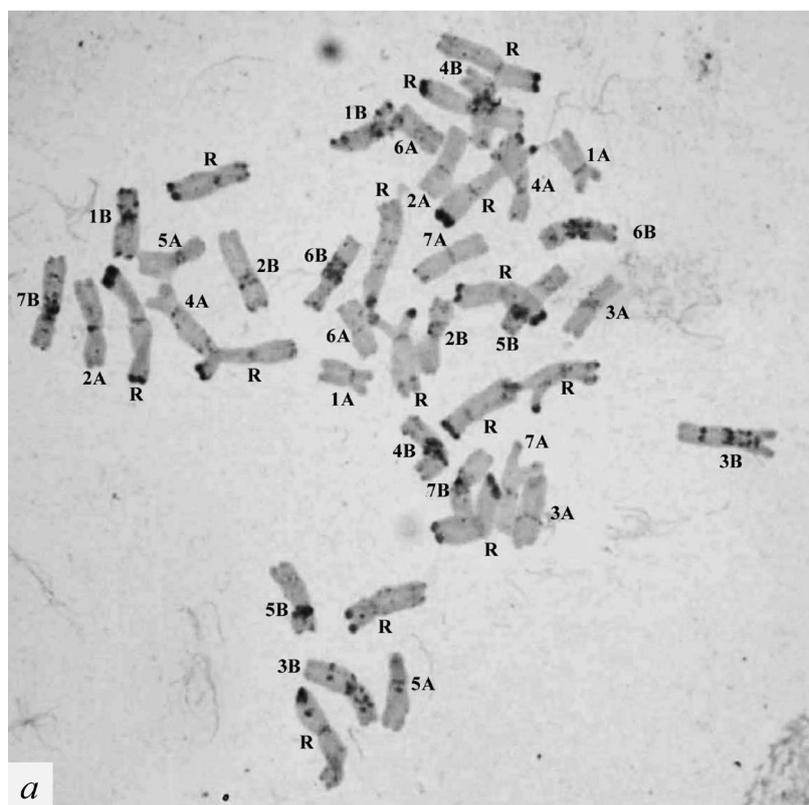
Типы межгеномных замещений хромосом у рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале селекции Института генетики и цитологии НАН Беларуси

Рекомбинантная форма гексаплоидных тритикале	Тип межгеномного замещения хромосом
ПРАГЗ-1	1D(1A)
ПРАГЗ-2	1D(1A), 2D(2B)
ПРАГЗ-4	1D(1A), 2D(2B), 6D(6B)
ПРАГЗ-5	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A)
ПРАГЗ-7	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6A)
ПРАГЗ-8	1D(1A), 2D(2B), 3D(3A), 6D(6B)
ПРАГЗ-4(2/1)	1D(1A), 2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)
ПРАГЗ-4(2/2)	2D(2A), 4D(4B), 7D(7A)

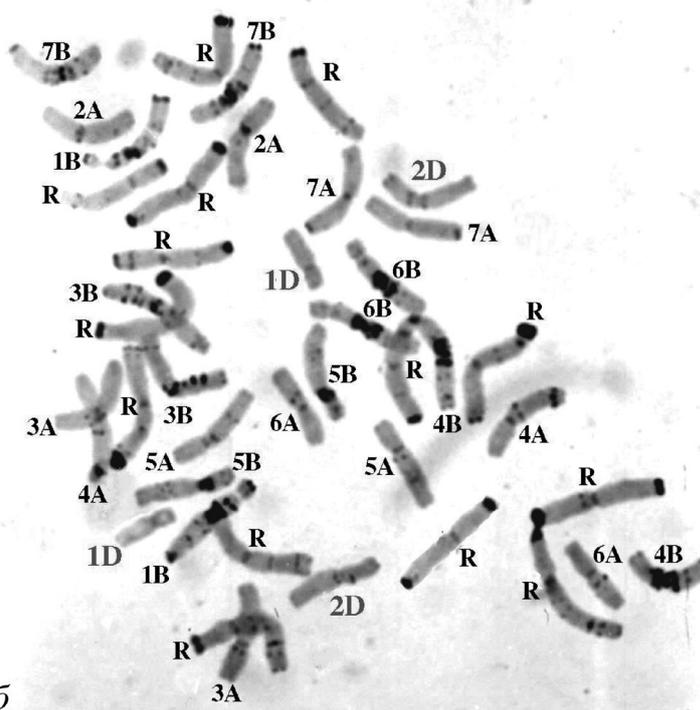
Для анализа геномной структуры экспериментального материала был использован вариант метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза (С-бэндинг) [11]. Идентификация индивидуальных хромосом А-, В-, D- и R-геномов проводилась согласно обобщенной видовой идиограмме дифференциально окрашенных хромосом [12].

Выделение и очистку ДНК осуществляли с помощью готовых наборов реактивов Genomic DNA Purification Kit K0512 (Fermentas, Литва). Для выявления аллельного состава генов короткостебельности *Rht-B1b*, *Rht-D1* и *Rht8* использовались праймеры в модификации X. Zhang et al. [13]. Продукты ПЦР фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в 1×TAE буфере в течение 45 мин при напряжении в 100 В. Результат документировался в системе гель-документации QUANTUM ST4-1100. Для точного определения размера амплифицированных фрагментов с SSR-маркерами был проведен фрагментный анализ продуктов ПЦР. Данные анализировались в программной среде, поставляемой с прибором AppliedBiosystems 3500 Genetic Analyzer.

Результаты и их обсуждение. Анализ геномной структуры экспериментального материала. С целью выработки правильной стратегии подбора праймеров для идентификации аллелей генов короткостебельности включенные в эксперимент формы гексаплоидных тритикале были кариотипированы с использованием метода дифференциального окрашивания хромосом по Гимза. Точная информация о геномной структуре экспериментального материала необходима, в первую очередь, при изучении рекомбинантных форм пшенично-ржаных амфидиплоидов с различного типа межгеномными замещениями хромосом, однако анализ хромосомного состава желательно проводить и у сортов тритикале, которые в норме характеризуются наличием полнокомплектных А- и В-геномов пшеницы и R-генома ржи. Это вызвано тем обстоятельством, что значительный прогресс в селекции данной культуры был достигнут после получения вторичных форм, являющихся результатом гибридизации первичных гексаплоидных тритикале с мягкой пшеницей или октоплоидными формами. Как следствие этого, у некоторых вторичных тритикале были отмечены случаи замещения ряда хромосом ржи соответствующими гомеологами D-генома пшеницы.



a



б

Рис. 1. Метафазные пластинки дифференциально окрашенных хромосом: *a* – сорта Макар, *б* – линии ПРАГ3-2 с 1D(1A)- и 2D(2B)-замещениями хромосом

Геномный анализ включенных в исследование форм показал, что сорта Динаро, Бальтико, Макар, Трибун-2, Беллак, Легион, а также сортообразцы из коллекции НПЦ НАН Беларуси по земледелию имеют полные наборы хромосом А- и В-геномов пшеницы и полный набор хромосом ржи (рис. 1, *a*). Случаев замещений хромосом выявлено не было.

Отличительной особенностью казахского материала является присутствие в кариотипе 6D(6A)-замещения хромосом, что свидетельствует о вторичной гибридогенной природе данных пшенично-ржаных амфидиплоидов.

Анализ структуры генома рекомбинантных форм подтвердил первичные данные о групповой принадлежности интродуцированных в геном гексаплоидных тритикале хромосом D-генома пшеницы (таблица, рис. 1, б).

Полученные данные о геномной структуре включенных в рабочую коллекцию форм тритикале дают возможность целенаправленно подбирать праймеры для идентификации аллелей генов короткостебельности, что существенно уменьшает объем дорогостоящего молекулярно-генетического анализа.

Анализ аллельного состава гена Rht-B1. Из трех включенных в анализ генов короткостебельности *Rht-B1* является единственным геном, локализованным в В-геноме и, следовательно, присутствующим у незамещенных форм гексаплоидных тритикале. При этом интерес для селекции представляет мутантный аллель этого гена *Rht-B1b*, гомозиготность по которому обеспечивает снижение высоты растений пшеницы по имеющимся данным на 41–42 %.

Анализ рабочей коллекции по аллельному составу гена *Rht-B1* показал, что мутантный аллель *Rht-B1b* содержат сортообразцы DEO 650/01 и DEO 6232/01, сорта Беллак, Динаро и Бальтико, все сортообразцы селекции КазНИИ земледелия и растениеводства (сортообразец Т-399-1 является гетерозиготным по аллелям гена *Rht-B1*) и все сортообразцы селекции НПЦ НАН Беларуси по земледелию (рис. 2).

Среди последних восемь сортообразцов являются гомозиготными по данному аллелю, а у двух ген *Rht-B1* представлен как диким, так и мутантным аллелем. Рекомбинантные формы гексаплоидных тритикале, за исключением линии ПРАГЗ-2, характеризуются наличием дикого аллеля гена *Rht-B1*.

Анализ аллельного состава гена Rht-D1. Поскольку ген короткостебельности *Rht-D1* локализован в коротком плече хромосомы 4D, из включенных в рабочую коллекцию пшенично-ржаных гибридов соответствующий геномный состав имеют только две рекомбинантные линии – ПРАГЗ-4(2/1) и ПРАГЗ-4(2/2) с 4D(4В)-замещением хромосом. Молекулярно-генетический анализ показал, что у обеих рекомбинантных форм присутствует дикый аллель гена *Rht-D1* (*Rht-D1a*).

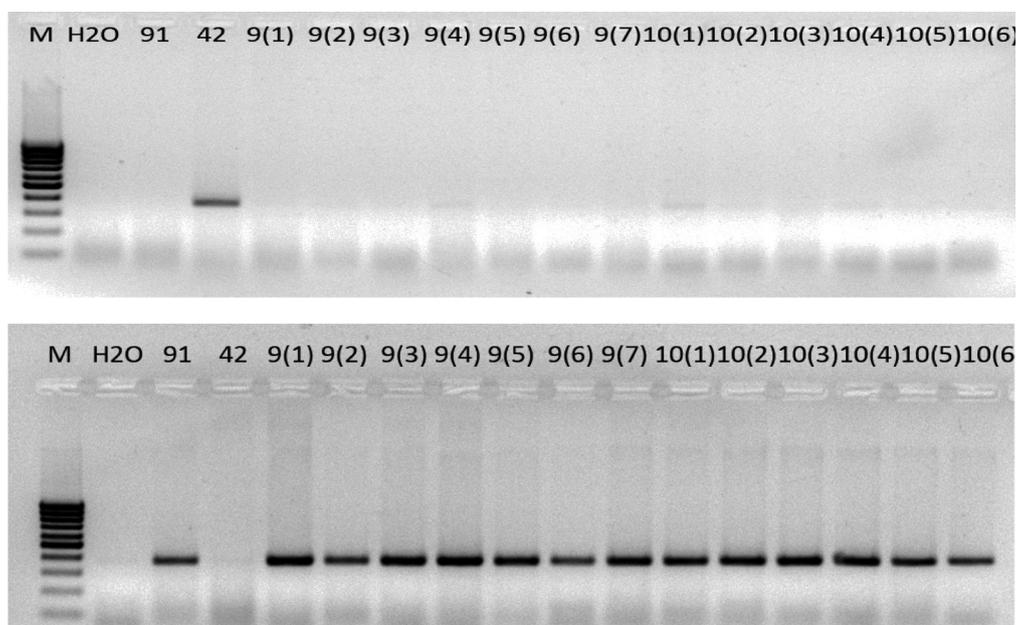


Рис. 2. Электрофореграмма детекции аллелей *Rht-B1a* (верхняя) и *Rht-B1b* (нижняя) у сортообразцов КП 301/11 и КП 305/11: М – маркер молекулярного веса Праймтех™, М100 бп, 91 – DEO6232/01 (положительный контроль на *Rht-B1b*), 42 – ПРАГЗ-5 – положительный контроль на *Rht-B1a*, 9(1–7) образцы КП 301/11, 10(1–6) КП 305/11

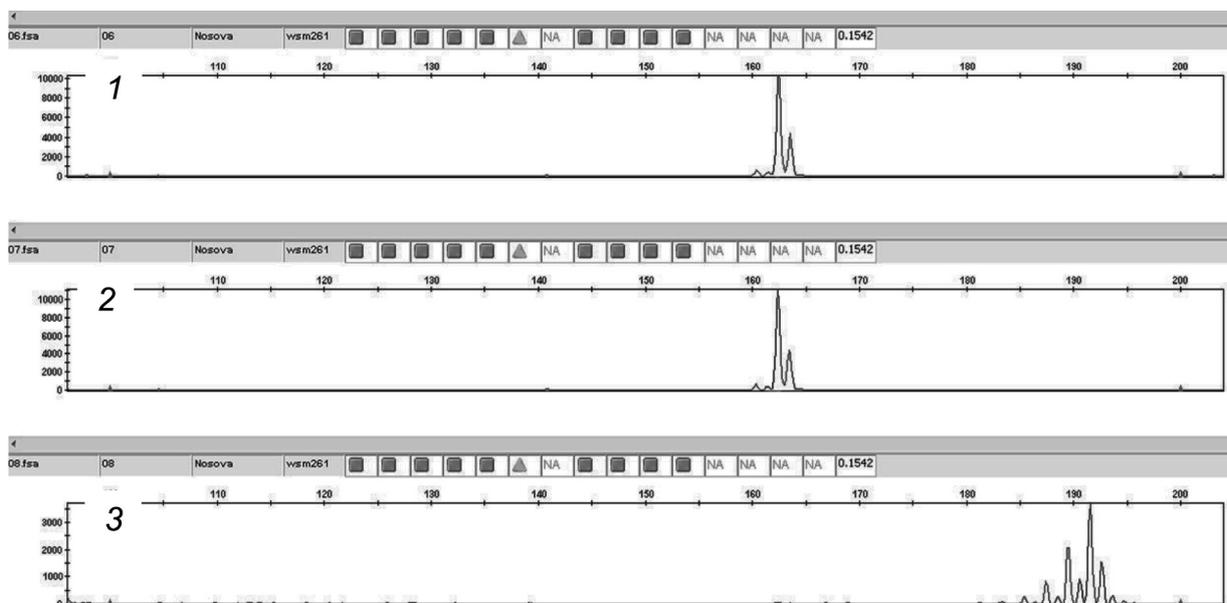


Рис. 3. Данные фрагментного анализа образцов: 1 – ПРАГЗ-4(2/1), 2 – ПРАГЗ-4(2/2), 3 – Безостая в среде программы GeneMapper 4.1

Анализ аллельного состава гена Rht8. Ген *Rht8* локализован в коротком плече хромосомы 2D. Согласно данным кариотипирования, хромосома 2D присутствует в геноме семи рекомбинантных линий, включенных в рабочую коллекцию (таблица). При использовании молекулярного маркера *Xgwm261* к гену *Rht8* амплифицируются фрагменты размером 165, 174, 180, 192, 200, 204 п. н., однако только фрагмент 192 п. н. специфичен для коммерческого аллеля данного гена *Rht8c*. В ходе фрагментного анализа полученных продуктов ПЦР было установлено, что у всех исследованных замещенных форм гексаплоидных тритикале присутствует аллель дикого типа *Rht8a* (165 п. н.) (рис. 3).

Заключение. Проведенный анализ показал эффективность использования ДНК-маркеров к генам короткостебельности *Rht-B1*, *Rht-D1* и *Rht8* пшеницы для тестирования пшенично-ржаных гибридов с целью отбора перспективного селекционного материала для использования в селекции тритикале на устойчивость к полеганию. Предварительный (до скрининга на ПЦР-маркеры) анализ геномной структуры форм тритикале с помощью дифференциального окрашивания хромосом по Гимза дает возможность целенаправленно использовать упомянутые праймеры для идентификации аллелей генов короткостебельности и существенно оптимизировать дорогостоящий молекулярно-генетический анализ.

Литература

1. Дорофеев В. Ф., Куркиев У. К. // Селекция и семеноводство. 1985. № 5. С. 25–27.
2. Альдеров А. А. Генетические основы низкорослости тетраплоидных пшениц и стратегия создания нового исходного материала для селекции: Автореф. дис. д-ра биол. наук. Л., 1991.
3. McIntosh, R. A., Hart, G. E., Devos, K. M. et al. // Catalogue of gene symbols for wheat: Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp., Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 2–7 August 1998. Saskatoon : University Extension Press. 1998. Vol. 5. P. 1–235.
4. McIntosh R. A., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J. Catalogue of gene symbols for wheat: 1999 Supplement // Wheat Inf. Serv. 1999. № 89. P. 37–85.
5. McIntosh R. A., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J. Catalogue of gene symbols for wheat: 2000 Supplement // Wheat Inf. Serv. 2000. № 91. P. 33–70.
6. Кобылянский В. Д. Рожь. Генетические основы селекций. М., 1982.
7. Смирнов В. Г., Соснихина С. П. Генетика ржи. Л., 1984.
8. Попов Г. И., Васько В. Г. Селекция и семеноводство озимой ржи. Л., 1979.
9. Куркиев К. У., Куркиев У. К., Альдеров А. А. // Генетика. 2006. Т. 42, № 3. С. 369–376.

10. Куркиев К. У., Тырышкин Л. Г., Колесова М. А., Куркиев У. К. // Информ. вестн. ВОГиС. 2008. Т. 12, № 3. С. 372–376.
11. Бадаева Е. Д. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале: Дис. ... канд. биол. наук. М., 1984.
12. Badaeva E. D., Sozinova L. F., Badaev N. S. et al. // Cereal Res. Commun. 1990. Vol. 18, № 4. P. 273–281.
13. Zhang X., Yang S., Zhou Y. et al. // Euphytica. 2006. Vol. 152, № 1. P. 109–116.

*N. I. DUBOVETS, Y. A. SYCHEVA, A. Y. NOSOVA, Y. B. BONDAREVICH,
L. A. SOLOVEY, T. I. SHTYK, O. I. ZAYTSEVA*

**ALLELIC COMPOSITION ANALYSIS OF DWARFING GENES IN HEXAPLOID TRITICALE
(× *TRITICOSECALE* WITTMACK)**

Summary

The article presents the results of molecular-cytogenetic analysis of genomic structure and molecular analysis of allelic composition of dwarfing genes *Rht-B1*, *Rht-D1* and *Rht8* in 6 varieties and 20 selection forms of hexaploid triticale from Scientific and Practical Center for Arable Farming (The National Academy of Sciences of Belarus) and KazSRI for Arable Farming and Plant Growing (Kazakhstan) collections, and 8 recombinant forms of hexaploid triticale created in Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus.