

Выводы

На влияние низкой положительной температуры растения рекомбинантно-инбредных линий озимой пшеницы реагируют, как правило, увеличением экспрессивности множественных молекулярных форм исследованных ферментов. Установлены корреляционные связи между аллельным составом локусов *Vrd1*, *Ppd-D1a*, *Rht8* и изменениями экспрессивности отдельных множественных форм ферментов. Реакция экспрессивности изоформ ферментов на влияние низкой температуры есть результат взаимодействия структурных генов ферментов с определенным аллельным составом локусов *Vrd1*, *Ppd-D1a*, *Rht8*.

Литература

1. *Sacai A., Larcher W.* Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress // Springer-Verlag. Ecological Studies – 1985 – 62.
2. *Fowler D.B. et al.* The regulatory role of vernalization in the expression of low-temperature-induced genes in wheat and rye // TAG – 1996. - V. 93. - P. 554 – 559.
3. *Chinnusamy V., Zhy J., Zhy J.-K.* Gene regulation during cold acclimation in plants // Physiol.Plant. – 2006. – V. 126. – P. 52 - 61.
4. *Pragya Sharma* The molecular biology of the low-temperature response in plants // BioAssays. – 2005. – V. 27. – P. 1048 – 1059.
5. *Файт В.И.* Генетический анализ зимо-морозостойкости пшеницы Модель и ее реализация // Тезисы III съезда ВОГиС России “Генетика в XXI веке : современное состояние и перспективы развития”. – М., 2004. – С. 296.
6. *Полтарев Е.М.* Оценка растений озимых культур на зимо- и морозостойкость методом промораживания растений в пучках // Методы определения морозо- и зимостойкости озимых культур. – М. – 1969. – С. 16.
7. *Дьяченко Л.Ф. и др.* Множинні молекулярні форми деяких оксидоредуктаз і резистентність м'якої пшениці до фузаріозу // Вісник ОНУ. – 2001. – Т. 5, № 1. – С. 59 – 66.
8. *Файт В.И., Федорова В.Р.* Ідентифікація сортів озимої м'якої пшениці за генами фотоперіодичної чутливості // Зб. наук. праць СГІ – НАЦ НАІС. – Одеса. – 2007. – Вип. 9(49). – С. 9-21.

Резюме

Досліджували електрофоретичні спектри пероксидази, супероксиддисмутази, фенолоксидази, цитохромоксидази і естераз в листках рекомбінантно-інбредних ліній F₅ Одеська 16/Безоста 1. На вплив низької позитивної температури в умовах осені рослини відповідають збільшенням експресивності значної частки форм досліджуваних ферментів. Зазначена реакція значною мірою залежить від алельного складу локусів, що вивчали.

Исследовали электрофоретические спектры пероксидазы, супероксиддисмутазы, фенолоксидазы, цитохромоксидазы и эстераз в листьях рекомбинантно-инбредных линий F₅ Одесская 16/Безостая 1. На влияние низкой температуры в условиях осени растения отвечают увеличением экспрессивности значительной части форм исследуемых ферментов. Такая реакция в значительной степени зависит от аллельного состава изучавшихся локусов.

The electrophoretic spectra of multiple molecular forms of peroxidase, superoxide desmutase, phenoloxidase, cytochromoxidase and esterase in recombanant-inbred lines F₅ Odesskay 16/Bezostay 1. During autumn vernalization in the field some isoforms of enzyme increased their expression. Such reaction of the enzymes forms depends on allelic composition of locus *Vrd*, *Ppd*, *Rht8*.

ЕГОРОВА Е.М.

Институт цитологии и генетики СО РАН

ПОЛУЧЕНИЕ И АНАЛИЗ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ, СОДЕРЖАЩИХ ЕДИНИЧНЫЕ ИНТРОГРЕССИВНЫЕ ФРАГМЕНТЫ ОТ *TRITICUM TIMOPHEEVII*.

Мягкая пшеница *T. aestivum* L. является одной из важнейших сельскохозяйственных культур во всем мире. Для получения новых сортов пшеницы традиционно использовались близкородственные скрещивания, что привело к сужению генетического потенциала существующих сортов. Поэтому задача получения новых высокоурожайных и устойчивых к биотическим и абиотическим факторам сортов остается актуальной на протяжении многих десятилетий. Одним из способов расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы является привлечение генетического потенциала ее диких сородичей. К настоящему времени ряд генов устойчивости к грибным патогенам (листовая и стеблевая ржавчина, мучнистая роса и др.) перенесен от дикорастущих и культурных сородичей в геном мягкой пшеницы, таких как *A. tauschii*, *T. dicoccoides*, *T. timopheevii*. [1].

Несмотря на успехи по созданию новых сортов методами традиционной селекции, этот процесс требует длительного времени. До последнего времени отбор генотипов с нужными свойствами проводился эмпирическим путем. Однако в настоящее время для создания сортов с заданными свойствами используются молекулярно-генетические подходы. Разработка молекулярных маркеров различного типа и создание насыщенных генетических карт важнейших сельскохозяйственных культур позволяет проводить направленный отбор нужных генотипов и маркировать нужные участки хромосомы и генетические локусы для их интеграции в сельскохозяйственную культуру. Использование молекулярных методов для направленного создания сортов с заданными свойствами и для контроля процессов на ранних этапах скрещивания называется селекцией с использованием молекулярных маркеров ("marker assisted selection"), или иными словами «молекулярной» селекцией. Такой подход дает возможность существенно сократить срок получения новых продуктивных и устойчивых сортов и гибридных линий. Работы с использованием метода «молекулярной» селекции стали развиваться только в последние годы, однако они апробированы при создании нужных генотипов, полученных при близкородственных скрещиваниях. Целью данной работы было использование методов «молекулярной» селекции для создания линий мягкой пшеницы, содержащих единичные участки генома тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii*.

Материалы и методы

Для получения интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих единичные фрагменты генома *T. timopheevii*, были использованы исходные гибридные линии 744 и 832 (*T. aestivum* × *T. timopheevii*, $2n=42$), Линии 744 и 832 были получены на основе сорта Саратовская 29 (С29), содержали 6 и 8 фрагментов интрогрессии соответственно и обладали устойчивостью к бурой ржавчине [2]. Схема получения интрогрессивных линий представлена на рисунке 1. Геномную ДНК выделяли из молодых листьев индивидуальных растений согласно модифицированной методике Плашке с соавт. [3]. Для генотипирования растений были использованы микросателлитные GWM и GDM маркеры, картированные в геноме мягкой пшеницы *T. aestivum* и тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii* [5-6; Röder, неопуб. данные]. Процедура ПЦР (полимеразной цепной реакции) при использовании праймеров, меченых флуорохромом, описана в статье Родер с соавторами [4]. При использовании меченого праймера M13 и немеченых праймеров к микросателлитным локусам применялась методика Хайдена с соавторами [5]. Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems) или на секвенаторе ALFexpress (Amersham Biosciences) в 6% денатурирующем полиакриламидном геле. Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы Peak Scanner (Applied Biosystems) или программы Fragment Analyser 1.02 (Amersham Biosciences) относительно стандартных образцов ДНК известной длины. Флуоресцентная *in situ* гибриди-



Рис. 1. Схема получения интрогрессивных линий *T. aestivum* X *T. timopheevii*

744 линии и 1A, 1BL, 2AS, 2B, 3AL, 5AL, 5BL, 6BL у линии 832 [8]. Множественный характер интрогрессий не позволял оценить влияние отдельных локусов от *T. timopheevii* на проявление различных количественных признаков мягкой пшеницы. Выбранные линии были скрещены с сортом Саратовская 29, затем двукратно им беккроссированы и 75 растений BC_2F_1 генотипированы микросателлитными маркерами. В популяции растений второго беккросса не было обнаружено гибридных растений, содержащих только один или два фрагмента генома *T. timopheevii*. На основании данных микросателлитного анализа потомства BC_2F_1 были отобраны генотипы, содержащие интрогрессивные фрагменты в различных сочетаниях. Отобранные растения были беккроссированы и самоопылены, в результате чего была получена популяция BC_3F_3 .

178 растений BC_3F_3 были генотипированы 45-ю SSR маркерами. На данном этапе мы генотипировали только те хромосомы, в которых были обнаружены интрогрессии ранее при анализе родительских гибридных линий 744 и 832 и популяции BC_2F_1 , а не весь геном. Число фрагментов интрогрессии в потомстве гибридных линий третьего беккросса существенно сократилось (до 1-4) по сравнению BC_2F_1 гибридами. Анализ гибридных растений BC_3F_3 показал присутствие фрагментов интрогрессии в хромосомах 1A, 1BL, 2A, 2B, 5BL и 6B. Большинство BC_3F_3 гибридов содержало два или три фрагмента генетического материала *T. timopheevii* – 44,4% и 21,4%, соответственно. Число растений, несущих одиночные фрагменты составляло 24,7% (таблица 1).

Поскольку в потомстве растений второго беккросса не были выявлены генотипы с одной и двумя вставками, а растения третьего беккросса содержали от одного до четырех интрогрессивных фрагментов от *T. timopheevii*, было сделано предположение, что оптимальной стадией для проведения микросателлитного анализа с целью отбора моноинсерционных растений является потомство третьего беккросса.

Из потомства BC_3F_3 нами были выбраны 42 растения, содержащие единичные фрагменты интрогрессии в хромосомах 1A, 2A, 2B, 5BL, 6B. Следует отметить, что среди гибридов, имеющих интрогрессивные фрагменты, есть как гомозиготные растения, несущие только аллели *T. timopheevii*, так и гетерозиготные, несущие аллели обоих родителей.

Таблица 1. Оценка содержания фрагментов хромосом *T. timopheevii* у растений BC_3F_3 .

Число фрагментов <i>T. timopheevii</i> в геноме	% растений со вставкой (от общего числа изученных растений)	Число растений
1	24,7%	44
2	44,4%	79
3	21,4%	38

зация проводилась в соответствии с ранее опубликованной методикой [6]. С-окрашивание проводилось в соответствии с методикой, разработанной Бадаевой с соавторами [7].

Результаты и обсуждение

Гибридные линии 744, 832 и исходные родительские формы (C29 и *T. timopheevii*) были предварительно проанализированы микросателлитными (SSR) маркерами для определения хромосомной локализации и величины фрагментов генома *T. timopheevii*. Участки интрогрессии были обнаружены в хромосомах 1A, 2A, 3BL, 5AL, 5BL, 6B у

4	6,7%	12
0	2,8%	5
		Всего=178

Ранее было показано, что анализ микросателлитными маркерами не позволяет выявлять все фрагменты хромосом, интрогрессированные в геном мягкой пшеницы. Это связано с тем, что SSR-маркеры пока не картированы на концевых участках некоторых хромосом [9]. Поэтому выбранные линии BC₃F₃ были проанализированы цитологическими методами для уточнения характера замещения. С помощью *in situ* гибридизации с использованием зондов Spelt1 и pSC119.2 могут быть выявлены перестройки на хромосомах 2A, 2B, 5BL [6]. С помощью C-окрашивания выбранных линий, которое оказалось более информативно, нам удалось выявить все перестройки генотипированные молекулярными маркерами. Дополнительных замещений выявлено не было. В процессе возвратного скрещивания были утеряны небольшие интрогрессии в хромосомах 3A, 3B и 5A, выявленные по одному-двум маркерам.

Эти 42 линии BC₃F₃ были оценены в поле на проявление хозяйственно-ценных признаков (устойчивость к листовой ржавчине, время цветения, высота растений, вес 1000 зерен, число зерен в колосе). По результатам оценки признаков в полевых условиях были отобраны две линии, обладающие устойчивостью к листовой ржавчине (балл устойчивости 2 по шкале Майнса и Джексона) [10]. Ранее нами было проведено картирование генов, контролирующих устойчивость к листовой ржавчине у интрогрессивных линий, имеющих множественные участки интрогрессий. С помощью SSR маркеров было показано, что данный признак контролируется двумя локусами *QLr.icg-5B* и *QLr.icg-2A*, расположенными на хромосомах 5B и 2A, соответственно, которые являются независимыми и суммарно определяют около 80% проявления признака [11]. По результатам C-окрашивания и молекулярного анализа две отобранные линии BC₃ несут транслокацию в длинном плече хромосомы 5 (T5BS.5BL-5GL). Поэтому, можно предположить, что перенесенный фрагмент от *T. timopheevii* несет локус *QLr.icg-5B*, который определяет около 78% проявления признака.

Анализ влияния единичных фрагментов интрогрессии на другие хозяйственно-ценные признаки пшеницы показал, что присутствие фрагментов хромосом 5G и 1A^t, в отличие от остальных замещений, в геноме мягкой пшеницы не оказывает негативного влияния на такие признаки как высота растения и вес зерна. В то время как присутствие фрагментов хромосом 2G *T. timopheevii* приводит к значительному снижению веса 1000 зерен.

Выводы

Использование молекулярных маркеров, картированных в геноме мягкой пшеницы и в геноме *T. timopheevii*, позволило создать коллекцию линий, близких к изогенным, каждая из которых содержит только один фрагмент интрогрессии от *T. timopheevii*. По результатам оценки в полевых условиях отобраны две линии, устойчивые к листовой ржавчине. Показано, что присутствие фрагментов хромосом 5G и 1A^t, в отличие от остальных замещений, в геноме мягкой пшеницы не оказывает негативного влияния на такие признаки как высота растения и вес зерна. На основании полученных результатов было показано, что использование методов «молекулярной селекции» позволило существенно сократить время получения моноинсерционных линий. Созданная коллекция линий может быть использована для изучения и картирования генов и QTL пшеницы и в селекционных программах.

Литература

1. Brown-Guedira GL, Singh S, Fritz AK., Performance and Mapping of Leaf Rust Resistance Transferred to Wheat from *Triticum timopheevii* subsp. *Armeniacum* // *Phytopathology*. 2003 Jul;93(7):784-9.

2. Леонова И.Н., Родер М.С., Будашкина Е.Б., и др. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* // Генетика. 2002. Т.38. С. 1648-1655.
3. Plaschke J., Ganai M. W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet., 1995, 91: 1001-1007.
4. Röder M. S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // Genetics, 1998, 149: 2007-2023.
5. Hayden M., Good G., Sharp P.J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs // Nucleic Acids Res. 2002. V. 30. P. 129–133.
6. Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., et al. A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids // Genome. 2006b. V. 49. P. 1023-1035.
7. Badaev NS, Badaeva ED, Maximov NG, Zelenin AV, Cytogenetic investigation of hybrids produced by crossing of hexaploid triticale with common wheats. Theor Appl Genet 70: 536-541, 1985
8. Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Салина Е.А., Будашкина Е.Б., Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* // Генетика, 2009 (в печати)
9. Салина Е.А., Егорова Е.М., Адонина И.Г., Добровольская О.Б., Будашкина Е.Б., Леонова И.Н., ДНК маркеры для генотипирования и создания интрогрессивных линий пшеницы (*Triticum aestivum* L. x *Aegilops speltoides* Tausch; *T. aestivum* x *T. timopheevii* Zhuk.). // Вестник ВОГиС: 4, 12, с. 620-628, 2008
10. Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathol. 1926. V. 16. P. 89-120.
11. Леонова И.Н., Будашкина Е.Б. Локализация генов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий мягкой пшеницы *T. aestivum* x *T. timopheevii* к листовой ржавчине // Всерос. научная конф. «Устойчивость растений к неблагоприятным факторам внешней среды». Иркутск, 2007. Стр. 151-154.

Резюме

Микросателлитные (SSR) маркеры были применены для генотипирования гибридов *T. aestivum* × *T. timopheevii* и для контроля передачи интрогрессированного материала в процессе возвратного скрещивания. Были получены линии мягкой пшеницы, содержащие единичные интрогрессированные участки хромосом 1A^t, 2A^t, 2G, 5GL, 6G тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii*.

Microsatellite (SSR) markers were used for *T. aestivum* × *T. timopheevii* hybrids genotyping and for the monitoring of transfer of an alien genetic material. The set of common wheat lines with *T. timopheevii* chromosomes 1A^t, 2A^t, 2G, 5GL, 6G single introgressive regions were obtained.

ЖАРИКОВА Н.В., КОРОБОВ В.В., АНИСИМОВА Л.Г., ЯСАКОВ Т.Р., ЖУРЕНКО Е.Ю., МАРКУШЕВА Т.В.

Институт биологии УНЦ РАН,

Россия, 450054, Уфа, ул. Проспект Октября, 61, e-mail: tvmark@anrb.ru

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ *BACILLUS CEREUS* IВRV-34Т В ОБЛАСТИ РЕМЕДИАЦИИ ПОЧВ ОТ ГЕРБИЦИДА 2,4,5-Т