

УДК 575.113.2:577.112.82

ЦЕНТРИЧНА ЖИТНЬО-ПШЕНИЧНА ХРОМОСОМНА ТРАНСЛОКАЦІЯ 1RSm.1BL: ГЕНЕТИЧНА МОДИФІКАЦІЯ ДЛЯ ВИКОРИСТАННЯ В СЕЛЕКЦІЇ НА ЯКІСТЬ БОРОШНА

О.І. РИБАЛКА¹, В.В. МОРГУН², В.М. ПОЧИНОК²

¹Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України
65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

²Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України
03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

Хромосомно-інженерна модифікація центричної житньо-пшеничної 1RSm.1BL транслокації створена на базі ярого сорту пшениці Павон. Це ускладнює використання транслокації в селекції озимої пшениці на поліпшені хлібопекарські якості борошна. Два пшеничні сайти в короткому плечі транслокації унеможливають перенесення плеча 1RSm з генотипу ярого в генотип озимого типу розвитку без рекомбінації транслокації шляхом кросинговеру. Щоб запобігти рекомбінації транслокації під час перенесення з ярого в озимий сорт як посередник використовували дителосомік по довгому плечу хромосоми 1B. Транслокація 1RSm.1BL була успішно перенесена в озимий генотип без її рекомбінації. Довге плече 1RSm.1BL транслокації рекомбіноване одним із найсильніших щодо позитивного впливу на якість борошна алелем *Glu-B1a1*. Нова транслокація 1RSm.1BL з алелем *Glu-B1a1* у довгому плечі створена для використання в селекції сортів озимої пшениці на поліпшені хлібопекарські якості борошна.

Ключові слова: *Triticum aestivum* L., хромосома, транслокація, рекомбінація, глютенін, гліадин, локус, дителосомік.

Центрична хромосомна транслокація 1RS.1BL утворена в результаті спонтанної фузії короткого плеча хромосоми 1R жита і довгого плеча хромосоми 1BL пшениці. Вперше ідентифікована у сортів пшениці за їх подібною до тритикале (*× Triticosecale* Wittm.) стійкістю до хвороб через наявність у короткому плечі 1RS ефективних генів *Pm8*, *Lr26*, *Sr31*, *Yr9* [15, 16].

Транслокація 1RS.1BL активно використовується в селекції пшениці вже понад 30 років завдяки її позитивному впливу на урожай зерна, імовірно, внаслідок гетерозисного ефекту житнього хроматину [6]. На сьогодні у світі відомо кілька сотень сортів із цією транслокацією [4]. Однак наявність транслокації 1RS.1BL у генотипах пшениці пов'язана з істотним негативним впливом на якість борошна, що несумісно з її використанням у програмах селекції сортів пшениці з високими хлібопекарськими властивостями [7, 13]. Подібна транслокація 1RS.1AL поширена також серед комерційних сортів пшениці та, як і 1RS.1BL, теж чинить позитивний вплив на урожай зерна і водночас суттєвий, хоча й дещо менший ніж 1RS.1BL, негативний вплив на якість борошна [10]. Про-

блеми з якістю борошна транслокації 1RS.1BL пов'язані, по-перше, з відсутністю важливих для якості локусів пшениці *Gli-1/Glu-3*, що розміщені в елімінованому короткому плечі пшеничної хромосоми 1B, по-друге — з наявністю легкокорозчинних у воді житніх білків секалінів, що синтезуються в ендоспермі транслокаційних сортів пшениці під контролем житнього локусу *Sec-1*, розміщеного в термінальному сегменті короткого плеча хромосоми 1R жита [14].

Протягом останніх років цитогенетики зробили кілька невдалих спроб заміни житнього локусу *Sec-1* у транслокаційному плечі 1RS на позитивний щодо якості борошна гомеологічний пшеничний локус *Gli-1*, або швидше кластер *Gli-1/Glu-3*, способом індукованої гомеологічної рекомбінації [8] та центричним поділом-фузією плечей хромосом [12]. Ці спроби виявились невдалими через надзвичайну складність хромосомно-інженерної маніпуляції, завданням якої було вилучення з транслокованого хромосомного плеча 1RS лише локусу *Sec-1*, заміни його на пшеничний кластер *Gli-1/Glu-3* і залишення всіх позитивних генетичних ефектів транслокації 1RS.1BL.

Таку роботу успішно виконав професор А. Лукашевський (Каліфорнійський університет, США), який скористався індукованою *ph1b* хромосомною рекомбінацією та каріотипуванням (диференційне С-зabarвлення) 20 234 рослин [11]. У результаті на основі ярої пшениці сорту Павон (Pavon) було отримано відмінну від оригінальної 1RS.1BL хромосомно-інженерну конструкцію (чотириточкову транслокацію, або третинний рекомбінант) цієї транслокації, яка не мала жодних структурних цитологічних відмінностей від оригінальної 1RS.1BL, містила всі гени стійкості *Pm8*, *Lr26*, *Sr31*, *Yr9* і включала два дистальні інтеркалярні хромосомні сегменти плеча 1BS пшениці розміром 1,4 та 3,2 сМ рекомбінації: один містив замість вилученого локусу *Sec-1* пшеничний кластер *Gli-1/Glu-3*, інший — сегмент плеча 1BS пшениці, що не експресується [11].

Зважаючи на те, що інженерно модифікована (позначимо її як 1RSm.1BL) транслокація створена на базі мексиканського ярого сорту Павон, її використання в селекції озимої пшениці ускладнюється як технічно, так і з міркувань можливого зниження морозостійкості селекційних ліній, похідних від схрещування озимої пшениці з ярою формою. Крім того, наявність у цій хромосомно-інженерній конструкції 1RSm.1BL двох сегментів пшениці створює передумову для її рекомбінації з плечем 1BS (при гібридизації з сортами пшениці) шляхом кросинговеру з частотою в межах 4,5 % [9]. Це означає, що інженерно модифіковану 1RSm.1BL транслокацію неможна використовувати в селекції без надійного контролю й добору в селекційних популяціях генотипів із нерекомбінантним плечем 1RSm, що звісно ж ускладнює селекційний процес і додає йому вартості.

У зв'язку з цим завданням нашої роботи було: 1) перенесення транслокації 1RSm.1BL з уникненням рекомбінації плеча 1RSm з ярого сорту Павон на генотип із озимим типом розвитку; 2) заміна у довгому плечі 1BL транслокаційної конструкції 1RSm.1BL алеля *Glu-B1i* (субодиниці Vx17+Vy18) на один із найсильніших щодо впливу на якість борошна алель *Glu-B1a1* (субодиниці Vx77+Vy8); 3) добір і оптимізація рекомбінантних ліній за агрономічними характеристиками для безпосереднього використання модифікованої транслокації 1RSm.1BL в селекційних програмах на високі хлібопекарські якості борошна.

Методика

Матеріалом у схрещуваннях були оригінальна лінія *MA1* сорту пшениці Павон (Мексика, CIMMYT) ярого типу розвитку з хромосомно-інженерною конструкцією 1RSm.1BL та дителосомік із хромосомною конституцією 20"+dt1BL" цього ж сорту, отримані нами безпосередньо від оригінатора професора А. Лукашевського. Перенесення модифікованого транслокаційного плеча 1RS на пшеницю озимого типу розвитку здійснювали в два етапи: 1) схрещування (2004 р.) ярого дителосоміка dt1BL" сорту Павон із сортом озимої пшениці Куяльник (донор алеля *Glu-B1al*) та добір в F₂ (рослини) і контрольна ідентифікація за F₃ (зерно) і F₄ (зерно) рекомбінантних дителосомних генотипів з алелем *Glu-B1al* пшениці озимого типу розвитку; 2) схрещування (2009 р.) озимого рекомбінантного (з алелем *Glu-B1al* замість *Glu-B1i*) дителосоміка dt1BL" з оригінальною лінією *MA1* ярого сорту Павон та добір в F₂ (рослини) рекомбінантних генотипів 1RSm.1BL пшениці озимого типу розвитку, що мали оригінальну (нерекомбіновану) 1RSm чотириточкову транслокацію й довге рекомбінантне плече 1BL з алелем *Glu-B1al* замість алеля *Glu-B1i*.

Для досліджу було взято 500 колосів із рослин F₂ (зерно F₃). З кожної лише гарантовано стійкої до листкової іржі рослини F₂ відбирали по одному колосу з урахуванням того, що у стійких до листкової іржі рослин є ефективний ген *Lr26*, який маркує транслокаційне плече 1RSm. Ген *Lr26* у нашому регіоні забезпечує ефективну стійкість до листкової іржі, особливо в умовах штучного інфекційного фону. Такий фон на нашій дослідній ділянці створював близько розміщений фітопатологічний посів з високим штучним інфекційним фоном листкової іржі. Для контролю стану перезимівлі дослідних рослин транслокаційну лінію *MA1* ярого типу розвитку висівали в осінньому посіві під зиму на одній ділянці разом з рослинами дослідної популяції. В усі роки проведення досліджень взимку спостерігали загибель 100 % рослин цієї типово ярої лінії.

Рекомбінантні генотипи контролювали за допомогою міні-SDS та міні-A-PAGE електрофорезу (маркерні алелі *Sec-1*, *Glu-B1al*, *Glu-B1i*, *Gli-1/Glu-3*) і цитологічно відповідно до лабораторних процедур, розроблених у Селекційно-генетичному інституті [1, 3].

Результати та обговорення

Генетичні маніпуляції з отримання цільових рекомбінантних генотипів здійснювали за схемою, наведеною на рис. 1. Маніпуляції з перенесення транслокаційного плеча 1RSm із сорту пшениці Павон ярого типу розвитку в генотип із озимим типом розвитку мали на меті два основні завдання: 1) перенести плече 1RSm, повністю запобігши його кросверної рекомбінації, через посередник — дителосомік dt1BL", в якого відсутнє коротке плече хромосоми 1B пшениці і яке при схрещуванні здатне рекомбінувати з плечем 1RSm за участю двох його пшеничних сайтів; 2) ізолювати рекомбінантні по довгому плечу 1BL генотипи з алелем *Glu-B1al* замість менш бажаного для хлібопекарської якості борошна алеля *Glu-B1i*. Алель *Glu-B1al* фактично є тандемною дуплікацією гена (генів) кластерного локусу *Glu-B1*, що кодують біосинтез субодиниці 7 високомолекулярних (HMW) глютенінів [5]. У результаті дуплікації спостерігається екстра-експресія субодиниці HMW-глютеніну 1Bx7→1Bx77

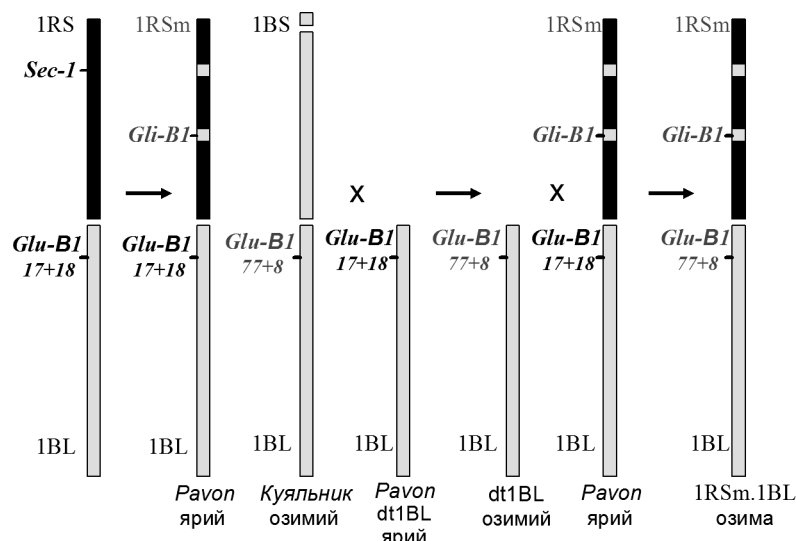


Рис. 1. Схема генетичних маніпуляцій з транслокацією 1RSm.1BL

(щонайменше вдвічі) й алель *Glu-B1al* за цією ознакою легко ідентифікується електрофоретично (рис. 2).

На електрофореграмі (див. рис. 2) наведено протеомні формули вихідних компонентів схрещування за чотирма маркерними локусами: дителосомік dt1BL" — *Glu-A1a* (субодиниця 1Ax1), *Glu-B1i* (субодиниці 1Bx17+1By18), *Glu-D1d* (субодиниці 1Dx5+1Dy10), *Gli-B1null* (ω-гліадини); сорт Куяльник — *Glu-A1b* (субодиниця 1Ax2*), *Glu-B1al* (субодиниці 1Bx77+1By8), *Glu-D1d* (субодиниці 1Dx5+1Dy10), *Gli-B1b* (ω-гліадини). Локус *Glu-B1* є маркером довгого плеча хромосоми 1В і розміщений на відстані ~10 сМ; локус *Gli-B1* є маркером короткого плеча хромосоми і знаходиться на відстані ~45 сМ від центромери. Отже, завданням цього етапу було ізолювати рекомбінантні дителосомні рослини озимого типу розвитку з алелем *Glu-B1al* замість *Glu-B1i*. Відсутність короткого плеча

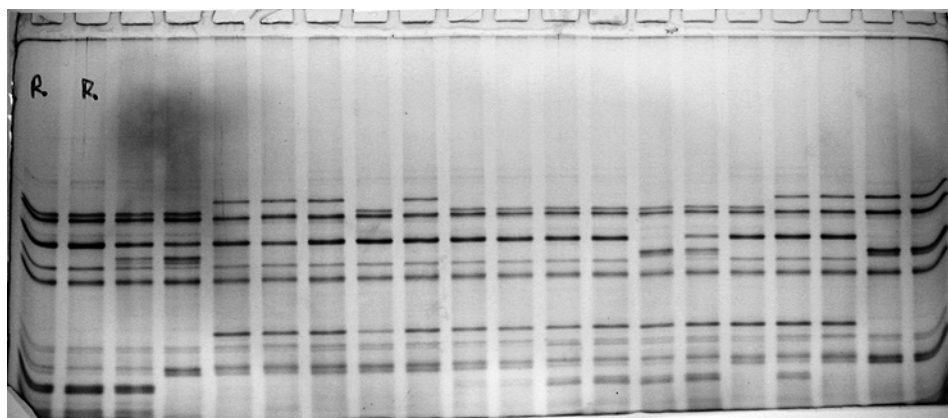


Рис. 2. Електрофореграма міні-SDS електрофорезу НМW-глютенінів та ω-гліадинів у F2 (рослини) від схрещування транслокаційної лінії MA1 × Куяльник:
1, 2, 5–13, 16–18 — гомозиготні генотипи за алелем *Glu-B1al* (1, 2 — рекомбінанти *Gli-B1null* + *Glu-B1* 77+8); 10, 11 — Куяльник; 19, 20 — дителосомік dt1BL"

1BS контролювали за допомогою хромосомного маркера *Gli-B1null* (відсутність локусу) і додатково — цитологічно. Результати цього етапу роботи опубліковані нами раніше [2].

Отримані рекомбінантні дителосоміки з алелем *Glu-B1a1* від сорту Куяльник були розмножені й перевірені на гетеро/гомогенність та озимий тип розвитку в умовах осіннього посіву (5—10 жовтня) з 2005 по 2010 рр. Протягом 5 років спостережень було зроблено добори краших за агрономічними показниками дителосомних рослин, проведено польову оцінку стану їх перезимівлі порівняно із сортом Куяльник. В умовах ділянкового посіву за типом контрольного селекційного розсадника (5 м²) рекомбінантні дителосоміки поступалися за врожаєм зерна сорту Куяльник у середньому не більше як на 5—7 %.

На наступному етапі транслокаційну лінію *MA1* було схрещено із озимим рекомбінантним дителосоміком *dt1BL*" (*Gli-B1null*+*Glu-B1a1*). Протеомна формула лінії *MA1* така ж, як у вихідного дителосоміка сорту Павон за винятком того, що її транслокаційне плече 1RSm марковане кластером пшеничних локусів *Gli-B1/Glu-B3* замість локусу *Sec-1* оригінальної житньо-пшеничної транслокації 1RS.1BL.

Із рис. 1 видно, що завданням цього етапу мав бути добір цільових рекомбінантних генотипів із хромосомою 1RSm.1BL з модифікованим транслокаційним плечем 1RSm від *MA1* і довгим плечем з алелем *Glu-B1a1* від сорту Куяльник. Така хромосомна структура може утворитися в результаті кросинговеру в довгому плечі 1BL між локусом *Glu-B1* і хромосомною центромерою. Відомо, що частота кросинговеру в нашому випадку в гетероморфному біваленті, як правило, нижча за рекомбінацію в гомоморфному біваленті. Крім того, частота кросинговеру в проксимальному прицентромерному сегменті хромосоми, як у нашому випадку, також може бути істотно нижчою порівняно з частотою перехресту в дистальному сегменті. Отже, гарантований добір цільових рекомбінантних генотипів може забезпечити якнайбільший розмір вибірки дослідних рослин F₂.

У результаті електрофоретичного аналізу 500 родин F₂ було ідентифіковано лише 11 із цільовим генотипом 1RSm (*Gli-B1/Glu-B3*)-1BL (*Glu-B1a1*). Кожна родина перевірена по зерну F₃ на гомозиготність та гомо/гетерогенність за цільовими локусами, хромосомну конституцію й потенційну агрономічну цінність. З кожної родини зроблено індивідуальні добори, які будуть висіяні під урожай 2012 р. й оцінені за всіма потрібними цитогенетичними, біохімічними і технологічними показниками. Робота з популяцією триває щодо збільшення кількості доборів рекомбінантних цільових генотипів і виявлення серед них найліпших за агрономічними показниками, які будуть рекомендовані для використання в селекційних програмах озимої пшениці на високу хлібопекарську якість борошна.

Таким чином, внаслідок багаторічної копіткої праці нами створено оригінальний генетичний матеріал озимої м'якої пшениці, що містить модифіковану 1RSm.1BL транслокаційну хромосому, яка не має характерних для відомої житньо-пшеничної транслокації 1RS.1BL генетичних ефектів негативного впливу на хлібопекарські якості борошна й містить у довгому плечі один із найсильніших щодо позитивного впливу на якість борошна алель *Glu-B1a1*. Цей генетичний матеріал можна використовувати в селекційних програмах у схрещуваннях із сортами озимої пшениці як нетранслокаційними, так і такими, що містять 1RS.1BL чи

1RS.1AL житньо-пшеничні транслокації. Однак в обох випадках необхідний контроль у селекційних популяціях транслокаційної хромосоми 1RSm.1BL за маркерними локусами *Gli-B1/Glu-B3*, *Glu-B1* (алель *Glu-B1a1*). Алель *Glu-B1a1* легко ідентифікувати за допомогою стандартного, або міні-SDS електрофорезу (див. рис. 2).

У разі схрещування 1RSm.1BL × 1RS.1BL, коли є реальна потреба в поліпшенні якості транслокаційного сорту, в селекційній популяції слід контролювати алель *Glu-B1a1* та алелі кластера локусів *Gli-B1/Glu-B3*. Генотипи з житнім локусом *Sec-1* слід вибракувати з популяції. За цього типу схрещування кластер *Gli-B1/Glu-B3* маркує транслокаційне плече 1RSm без генетичного фактора (*Sec-1*) негативного впливу на якість борошна. У разі схрещування 1RSm.1BL × 1BS.1BL ситуація дещо складніша. Виявлення у вищепенців маркерного кластера *Gli-B1/Glu-B3* у незначної кількості генотипів (унаслідок кросинговеру в межах двох пшеничних сайтів із частотою ~4,5 %) не є надійним тестом на наявність інтактного плеча 1RSm, хоча в домінуючій більшості вищепенців селекційної популяції маркер *Gli-B1/Glu-B3* надійно ідентифікує інтактне плече 1RSm. Створений генетичний матеріал особливо рекомендується для поліпшення хлібопекарської якості борошна транслокаційних сортів пшениці 1RS.1BL чи 1RS.1AL типу.

1. Рыбалка О.И. Генетичний поліморфізм клейковинних білків зерна, пов'язаних з якістю борошна пшениці: методи ідентифікації // Зб. наук. праць СГІ НЦ НС. — 2007. — Вип. 10(50). — С. 52—71.
2. Рыбалка О.И., Литвиненко М.А. Використання в селекції пшениці транслокації 1RS.1BL // Вісн. аграрної науки. — 2007. — № 12. — С. 36—40.
3. Стельмах А.Ф., Бондарь Г.П., Рыбалка А.И. К методике цитологического анализа анеуплоидов пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. — 1974. — Вып. XXV. — С. 24—31.
4. Braun H.-J., Payne P.I., Morgunov A.I. et al. The challenge: one billion tons of wheat by 2020 // Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp. (Saskatoon, Canada, 1998). — Saskatoon, 1998. — P. 33—40.
5. D'Ovidio R., Masci S., Porceddu E., Kasarda D. Duplication of the Bx7 high-molecular-weight glutenin subunit gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivar Red River 68 // Plant Breed. — 1997. — **116**. — P. 525—531.
6. Fritz A.K., Sears R.G. The effect of the Hamlet (2BS/2RL) translocation on yield components of hard red winter wheat // Agronomy abstracts, ASA, Madison, WI. — P. 94.
7. Graybosch R.A., Peterson C.J., Hansen L.E. et al. Comparative flour quality and protein characteristics of 1BL|1RS wheat-rye translocations // J. Cereal Sci. — 1993. — **17**. — P. 95—106.
8. Koebner R.M.D., Shepherd K.W. Controlled introgression to wheat of rye chromosome arm 1RS by induction of allosyndesis. 1. Isolation of recombinants // Theor. Appl. Genet. — 1986. — **73**. — P. 197—208.
9. Lukaszewski A.J. Breeding behavior of the cytogenetically engineered wheat-rye translocation chromosomes 1RS.1BL // Crop Sci. — 2001. — **41**. — P. 1062—1065.
10. Lukaszewski A.J. Frequency of the 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in the United States wheats // Ibid. — 1990. — **30**. — P. 1151—1153.
11. Lukaszewski A.J. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination // Ibid. — 2000. — **40**. — P. 216—225.
12. Lukaszewski A.J. Reconstruction of complete chromosomes 1B and 1R from the 1RS.1BL translocation of «Kavkaz» origin // Genome. — 1993. — **36**. — P. 821—824.
13. Sozinov A.A., Popereleya F.A. Genetic classification of prolamins and its use for plant breeding // Ann. Technol. Agr. — 1980. — **29**. — P. 207—212.
14. Villareal R.L., del Toro E., Rajaram S., Mujeeb-Kazi A. The effect of chromosome 1AL|1RS translocation on agronomic performance of 85 F₂-derivatives lines from three *Triticum aestivum* L. crosses // Euphytica. — 1996. — **89**. — P. 363—369.
15. Zeller F. Broadening of genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin // Proc. 6th Int. Wheat Genet. Symp. (Kyoto, Japan, 1984). — Kyoto, 1984. — P. 161—173.

16. Zeller F.J. 1B/1R wheat-rye chromosome substitutions and translocations // Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp. (Aug. 6–11, 1973, Missouri Agric. Exp. Stn., Columbia). — Missouri, 1973. — P. 209–221.

Отримано 01.09.2011

ЦЕНТРИЧЕСКАЯ РЖАНО-ПШЕНИЧНАЯ ХРОМОСОМНАЯ ТРАНСЛОКАЦИЯ
1RSm.1BL: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В
СЕЛЕКЦИИ НА КАЧЕСТВО МУКИ

А.И. Рыбалка¹, В.В. Моргун², В.М. Починок²

¹Селекционно-генетический институт — Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины

²Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины

Хромосомно-инженерная модификация центрической ржано-пшеничной 1RSm.1BL транслокации создана на базе ярового сорта пшеницы Павон. Это затрудняет использование транслокации в селекции озимой пшеницы на улучшенные хлебопекарные качества муки. Два пшеничных сайта в коротком плече транслокации не позволяют перенести плечо 1RSm из генотипа ярого в генотип озимого типа развития без рекомбинации транслокации путем кроссинговера. Чтобы избежать рекомбинации транслокации при переносе из ярового в озимый сорт в качестве посредника использовали дителосомик по длинному плечу хромосомы 1B. Транслокация 1RSm.1BL была успешно перенесена в озимый генотип без ее рекомбинации. Длинное плечо 1RSm.1BL транслокации было рекомбинировано одним из сильнейших относительно положительного влияния на качество муки аллелем *Glu-B1a1*. Новая транслокация 1RSm.1BL с аллелем *Glu-B1a1* в длинном плече создана для использования в селекции сортов озимой пшеницы на улучшенные хлебопекарные качества муки.

CENTRIC WHEAT-RYE CHROMOSOME TRANSLOCATION 1RSm.1BL: GENETIC
MODIFICATION FOR USE IN WHEAT BREEDING FOR BREAD-MAKING QUALITY

O.I. Rybalka¹, V.V. Morgun², V.M. Pochinok²

¹Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine
3 Ovidiopol'ska road, Odesa, 65036, Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasylykiv'ska St., Kyiv, 03022, Ukraine

Engineered wheat-rye centric chromosome 1RSm.1BL translocation is available for breeding use just on the base of spring wheat variety Pavon. It makes some disadvantages in use of the translocation for improvement of bread-making quality in winter wheat breeding. Two wheat chromosome sites presented in engineered arm of 1RSm doesn't allow it spring-to-winter wheat transmission without disassembling of engineered 1RSm by crossing-over in direct intervarietal crosses. In order to prevent of engineered 1RSm arm from disassembling while spring-to-winter transmission the ditelo-1BL as an intermediate parent was used. Engineered 1RSm chromosome arm was successfully transferred from spring to winter wheat with no disassembling. Long arm of the 1RSm.1BL was recombined with the strongest positive for bread-making quality allele *Glu-B1a1*. The new recombined 1RSm.1BL translocation with *Glu-B1a1* allele in the long 1BL arm was produced for use it in winter wheat breeding program for improved bread-making quality.

Key words: *Triticum aestivum* L., chromosome, translocation, recombination, glutenin, gliadin, locus, ditelosomic.