СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ, 2017, том 52, № 3, с. 535-543

УДК 633.11:631.527:577.21:577.088 doi: 10.15389/agrobiology.2017.3.535rus

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ PLUG-МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЧУЖЕРОДНОГО ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА РАЗНЫХ ЭТАПАХ СЕЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*Triticum aestivum* L.)*

П.А. СОКОЛОВ[1, 2], А.В. ПОЛХОВСКИЙ[1, 2], П.Ю. КРУПИН[1, 2], В.С. РУБЕЦ[2], В.В. ПЫЛЬНЕВ[2], Т.И. ХУПАЦАРИЯ[2], Г.И. КАРЛОВ[1, 3], М.Г. ДИВАШУК[1, 2]

Молекулярные маркеры позволяют контролировать направленный перенос чужеродного генетического материала в геном пшеницы. Среди разнообразных молекулярных маркеров максимальным преимуществом для анализа отдаленных гибридов обладают PLUG (PCR-based landmark unique gene) благодаря способности амплифицироваться при анализе близкородственных видов и возможности за одну реакцию детектировать одновременно три генома в пределах одной гомеологичной группы. В качестве объекта нашего исследования использовалась коллекция из 41 образца, которые находятся на разных этапах селекционного процесса (РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева). Образцы получены в результате скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и пшеницы Тимофеева (*T. timopheevii* Zhuk.) и продемонстрировали на естественном фоне устойчивость к бурой ржавчине и мучнистой росе. При анализе этой коллекции отдаленных гибридов нами впервые продемонстрированы возможности PLUG-маркеров для идентификации чужеродных интрогрессий в геном мягкой пшеницы со стороны *T. timopheevii*. Для того чтобы увеличить степень полиморфизма между образцами, продукты амплификации PLUG-маркеров дополнительно обрабатывали часторежущими эндонуклеазами рестрикции TaqI и HaeIII. Были обнаружены формы как с единичными, так и с множественными интрогрессиями, из последних особый интерес представляют образцы с интрогрессиями более чем в одной гомеологичной группе. Показана гетерогенность не только поздних поколений селекционных образцов, но также образцов из питомника предварительного сортоиспытания, что может быть связано со вторичной хазмогамией. В результате проведенных исследований отобрано 14 PLUG-маркеров для длинного и короткого плеча хромосом каждой гомеологичной группы, которые могут быть рекомендованы для детекции генетического материала *T. timopheevii* в отдаленных гибридах *T. timopheevii* × *T. aestivum*. Обсуждаются преимущества PLUG-маркеров как инструмента мониторинга переноса чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, пшеницы Тимофеева, *Triticum aestivum*, *Triticum timopheevii*, отдаленная гибридизация, чужеродный генетический материал, молекулярные маркеры, PLUG, ПЦР.

Преобладание мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., A^uBD) над остальными видами пшеницы обусловлено экологической пластичностью — устойчивостью к низким и высоким температурам, избытку и недостатку влаги, болезням и вредителям. В настоящее время это основная продовольственная культура примерно для трети населения Земли (1, 2). Однако в связи с обеднением генетических ресурсов мягкой пшеницы, эволюцией патогенов, потерей эффективности у имеющихся генов устойчивости к болезням и вредителям актуализируется проблема поиска новых генов устойчивости для переноса в геном *T. aestivum* при отдаленной гибридизации.

В качестве одного из источников таких генов служат сородичи мягкой пшеницы, в частности тетраплоидная пшеница Тимофеева (*T. timopheevii* Zhuk., A^bG). У этого вида обнаружено множество ценных генов устойчивости, часть из которых перенесены в мягкую пшеницу: два гена устойчивости к листовой ржавчине (*Lr18* и *Lr50*), три гена устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr36*, *Sr37*, *Sr40*), три гена устойчивости к мучнистой росе (*Pm6*, *Pm27*, *Pm37*) (3). Также сообщается о перенесенном гене *LrTt2*, который может быть новым аллелем гена *Lr18* (4).

Пшеницу Тимофеева, которая обладает устойчивостью к бурой и

* Исследование выполнено за счет гранта РНФ (проект № 16-16-00097 от 27 января 2016 года).

твердой ржавчинам, пыльной и твердой головне (5, 6), к шведской и гессенской мухе (7, 8), можно использовать для дальнейшего обогащения генотипа мягкой пшеницы. Кроме этого, *T. timopheevii* имеет повышенную холодостойкость, высокую засухоустойчивость, устойчивость к избыточному увлажнению, высокие хлебопекарные качества: содержание белка в зерне составляет 19-30 %, что значительно выше, чем у мягкой пшеницы (9-11). Таким образом, отдаленные гибриды, полученные с участием *T. timopheevii*, — перспективный исходный материал для селекционной работы с мягкой пшеницей.

Из гибридных комбинаций *T. aestivum* × *T. timopheevii*, полученных в 1994 году В.Ф. Козловской и М.М. Старостенковой (Алтайский НИИ сельского хозяйства — Алтайский НИИСХ), на селекционной станции им. П.И. Лисицына (РГАУ-МСХА им. К.А. Тимирязева) создана коллекция селекционных образцов с привлечением генетического материала *T. timopheevii*. Эти образцы (популяции, семьи, линии) находятся на разных этапах селекционного процесса (12). Отбор проводился по продуктивности и устойчивости к мучнистой росе и бурой ржавчине на естественном фоне.

Для идентификации интрогрессивного генетического материала, о наличии которого в потомстве отдаленных гибридов трудно судить по фенотипическим признакам, широко применяются молекулярные маркеры. Существуют разные типы маркеров (expressed sequence tag–simple sequence repeats — EST-SSR, expressed sequence tag–sequence-tagged sites — EST-STS, SSR, random amplification of polymorphic DNA — RAPD и т.д.), которые позволяют детектировать чужеродный генетический материал с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и направленно выявлять растения с помощью маркер-опосредованного отбора (marker-assisted selection — MAS). Для работы с таким полиплоидным видом, как гексаплоидная мягкая пшеница, наиболее удобны PLUG (PCR-based landmark unique gene)-ПЦР-маркеры. Они разработаны G. Ishikawa с соавт. (13) на основе консерватизма ортологичных генов. Праймеры для PLUG-маркеров подобраны на участки экзонов, фланкирующих интрон. Так как экзоны у злаков характеризуются высоким консерватизмом, то PLUG-маркеры, разработанные для мягкой пшеницы, благодаря высокой гомологии могут амплифицироваться и на ДНК близкородственных видов. В то же время внутренние участки ампликона — это интроны, по которым наблюдается большая видовая вариабельность (инсерции/делеции, замены нуклеотидов). Таким образом, продукты амплификации у разных видов будут неодинаковы по размеру либо по нуклеотидному составу. Детектировать такие различия можно с помощью электрофоретического разделения полученных ПЦР-продуктов (во втором случае — после предварительной обработки эндонуклеазами рестрикции). Главное преимущество этого типа маркеров заключается в возможности одновременно идентифицировать в отдаленных гибридах мягкой пшеницы как все три ее собственных субгенома, так и чужеродные интрогрессии в пределах одной гомеологичной группы (14).

Применение PLUG-маркеров позволило идентифицировать у отдаленных гибридов мягкой пшеницы чужеродную хромосому от других родов: *Thinopyrum elongatum* (15), *Th. intermedium* (16), *Leymus mollis* (17), *Th. ponticum* (18). Однако при этом нет ни одного сообщения об использовании PLUG-маркеров при изучении отдаленных гибридов, полученных в результате скрещивания между собой представителей рода *Triticum*.

Мы впервые осуществили исследование гибридов двух видов пшеницы из рабочей коллекции селекционных образов с использованием молекулярных маркеров PLUG и обнаружили формы как с единичными, так

и с множественными интрогрессиями (из последних особый интерес представляют образцы с интрогрессиями более чем в одной гомеологичной группе). Показана гетерогенность не только поздних поколений селекционных линий, но даже линии из питомника предварительного сортоиспытания, что может быть связано со вторичной хазмогамией.

Целью настоящей работы было выявление генетического материала *Triticum timopheevii* в селекционных образцах отдаленных гибридов на разных этапах селекции с помощью системы PLUG-маркеров.

Методика. Коллекция поздних поколений (F_7-F_{10}) отдаленных гибридов (Селекционная станция им. П.И. Лисицына РГАУ-МСХА) на основе материала В.Ф. Козловской и М.М. Старостенковой (Алтайский НИИСХ) включала селекционные линии, отобранные из комбинации Л-6 [♀(Жница × *T. timopheevii* K-47793) × ♂Жница], — Л-6-1, Л-6-2, Л-6-3, Л-6-4, Л-6-5, Л-6-6, Л-6-7, Л-6-8, Л-6-9, Л-6-10, Л-6-11, Л-6-12, Л-6-13, Л-6-14, Л-6-15, Л-6-16, Л-6-17, Л-6-18, Л-6-19, а также селекционные линии из комбинации Л-25 [♀(Новосибирская 67 × *T. timopheevii* K-47793) × ♂Новосибирская 67] — Л-25-11, Л-25-12, Л-25-13, Л-25-14, Л-25-15, Л-25-16, Л-25-17, Л-25-18, Л-25-19, Л-25-20, Л-25-21, Л-25-22, Л-25-23, Л-25-24, Л-25-25, Л-25-26, Л-25-27, Л-25-28, Л-25-29, Л-25-30. Отбор из Л-6 и Л-25 велся по продуктивности и устойчивости к мучнистой росе и листовой ржавчине на естественном инфекционном фоне. Селекционные линии Л-6-6, Л-6-7 и Л-6-10 были использованы для получения образцов, находящихся на разных этапах селекционного процесса. Контролем служили родительские формы изучаемых отдаленных гибридов — сорта мягкой пшеницы Жница и Новосибирская 67, образец *T. timopheevii* K-47793.

Геномную ДНК выделяли CTAB-методом из этиолированных проростков по J.J. Doyle и J.L. Doyle (19).

На основании данных литературы для выполнения ПЦР-анализа отобрали 52 молекулярных PLUG маркера (10, 12). Состав ПЦР-смеси (25 мкл): геномная ДНК — 0,5 мкл (500-1300 нг/мкл), dNTP («Thermo Fisher Scientific», США) — 2,5 мкл, Taq-буфер, содержащий 25 мМ $MgCl_2$ («Silex», г. Москва), — 2,5 мкл, прямой и обратный праймеры (ЗАО «Синтол», г. Москва) — 1 мкл суммарно, Taq-полимераза colored (2,5 ед/мкл, 5000 е.а., «Silex», г. Москва) — 0,5 мкл. Условия амплификации: первоначальная денатурация — 94 °С, 5 мин; 35 циклов — 94 °С, 45 с; 55 °С, 45 с; 72 °С, 2 мин; конечная элонгация — 72 °С, 10 мин (амплификатор DNA engine Tetrad 2, «Bio-Rad», США). ПЦР-продукт обрабатывали с эндонуклеазами рестрикции TaqI и HaeIII в течение 12 ч соответственно при 65 и 37 °С согласно рекомендациям производителя (ООО «СибЭнзим-М», Россия). Ампликоны и их рестрикты разделяли в 2 % агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 В/см. В качестве маркера молекулярных масс использовали 100 bp Ladder («Fermentas», Литва).

Результаты. В проанализированной коллекции образцов популяции ♀Омская 36 × ♂Л-6-7, ♀Тризо × ♂Л-6-7, ♀Эстер × ♂Л-6-10 находятся в питомнике гибридизации, популяции ♀Эстер × ♂Л-6-10, ♀Л-6-6 × ♂Тризо, ♀Л-6-6 × ♂Иволга — в питомнике отбора, линии ♀Л-6-6 × ♂Тризо, ♀Л-6-10 × ♂Тризо, ♀Иволга × ♂Л-6-7, ♀Л-6-7 × ♂Тризо — на этапе предварительного сортоиспытания, линия ♀[(Жница × *T. timopheevii* K-47793) × Жница] × ♂Тризо — в конкурсном сортоиспытании.

Необходимое условие для успешного использования молекулярных маркеров в селекционной работе с отдаленными гибридами — полиморфизм между родительскими формами. Использованные нами PLUG-маркеры были подобраны таким образом, чтобы для каждого плеча хромосо-

мы каждой гомеологичной группы амплифицировались три фрагмента, характерные для каждого субгенома мягкой пшеницы: TNAC 1009 (1S), TNAC 1010 (1S), TNAC 1026 (1L), TNAC 1102 (2S), TNAC 1178 (2S), TNAC 1233 (2S), TNAC 1021 (2L), TNAC 1118 (2L), TNAC 1204 (2L), TNAC 1248 (3S), TNAC 1300 (3S), TNAC 1263 (3L), TNAC 1383 (3L), TNAC 1408 (4AS 4BDL), TNAC 1421 (4AS 4BDL), TNAC 1428 (4AS 4BDL), TNAC 1457 (4AL 4BDS), TNAC 1464 (4AL 4BDS), TNAC 1510 (4AL 4BDS), TNAC 1663 (4AL 4BDS), TNAC 1485 (5S), TNAC 1497 (5S), TNAC 1588 (5S), TNAC 1496 (5B), TNAC 1528 (5L), TNAC 1535 (5L), TNAC 1540 (5L), TNAC 1541 (5L), TNAC 1545 (5L), TNAC 1554 (5L), TNAC 1559 (5L), TNAC 1562 (5L), TNAC 1567 (5L), TNAC 1577 (5L), TNAC 1605 (5L), TNAC 1610 (5L), TNAC 1613 (5L), TNAC 1614 (5L), TNAC 1616 (5L), TNAC 1618 (5L), TNAC 1864 (5L), TNAC 1674 (6S), TNAC 1683 (6S), TNAC 1685 (6S), TNAC 1702 (6L), TNAC 1752 (6L), TNAC 1763 (6L), TNAC 1805 (7S), TNAC 1806 (7S), TNAC 1926 (7S), TNAC 1867 (7L), TNAC 1903 (7L), TNAC 1957 (7L).

Из них после ПЦР с ДНК родительских форм (сорта мягкой пшеницы Жница и Новосибирская 67, образец *T. timopheevii* K-47793) и электрофоретического разделения продуктов были отобраны только те маркеры, с которыми амплифицируются три фрагмента с каждого субгенома *T. aestivum*, причем *T. timopheevii* и *T. aestivum* различаются по набору таких фрагментов (профилю) (рис. 1).

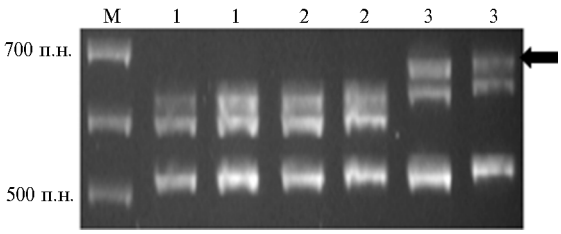

Рис. 1. Пример амплификации целевого фрагмента (680 п.н.)**, характерного для *Triticum timopheevii*, при использовании TNAC 1867 (маркер для длинного плеча хромосом 7-й гомеологичной группы мягкой пшеницы):** 1 — сорт Новосибирская 67, 2 — сорт Жница, 3 — образец *T. timopheevii* K-47793; M — маркер молекулярных масс 100 bp Laddder («Fermentas», Литва).

Обработка эндонуклеазами рестрикции TaqI и HaeIII, которая осуществлялась для обнаружения дополнительного полиморфизма между *T. timopheevii* и *T. aestivum*, выявила 14 маркеров: TNAC 1026 (1L), TNAC 1010 (1S), TNAC 1021 (2L), TNAC 1178 (2S), TNAC 1383 (3L), TNAC 1248 (3S), TNAC 1464 (4AL-4BDS), TNAC 1421 (4AS-4BDL), TNAC 1535 (5L), TNAC 1485 (5S), TNAC 1752 (6L), TNAC 1674 (6S), TNAC 1867 (7L), TNAC 1806 (7S). Эти маркеры могут быть использованы для изучения форм, полученных в результате гибридизации *T. timopheevii* и *T. aestivum*, так как позволяют за одну реакцию детектировать отсутствие фрагментов, характерных для субгеномов мягкой пшеницы, и присутствие фрагментов, специфичных для пшеницы Тимофеева, что дает возможность судить о наличии перестроек в анализируемых образцах.

К такого рода формам относятся селекционные линии, отобранные из комбинаций Л-6 и Л-25 (получены в результате скрещивания пшеницы Тимофеева K-47793 и мягкой пшеницы соответственно сорта Жница и сорта Новосибирская 67). С помощью отобранных 14 PLUG-маркеров мы проанализировали 19 селекционных линий из комбинации Л-6 и 11 селекционных линий из комбинации Л-25. При анализе этих линий с помощью PLUG-маркеров в изучаемых формах выявилось отсутствие фрагментов, характерных для мягкой пшеницы, наличие дополнительных фрагментов или гетерогенность образцов. В результате было показано, что дополнительные фрагменты, специфичные для *T. timopheevii*, имеются у образцов Л-6-7, Л-6-8, Л-6-15, Л-6-18, Л-6-20 (маркер TNAC 1421_TaqI),

Л-6-10, Л-6-16, Л-6-17 (TNAC 1867), Л-6-2 (TNAC 1806), Л-6-9, Л-6-11 (TNAC 1806_TaqI), а линия Л-6-2 не только содержит дополнительный фрагмент *T. timopheevii*, но и отличается от остальных отсутствием фрагмента, характерного для пшеницы (TNAC 1867) (рис. 2). Эти результаты свидетельствуют о наличии интрогрессий от *T. timopheevii* в геноме указанных образцов.

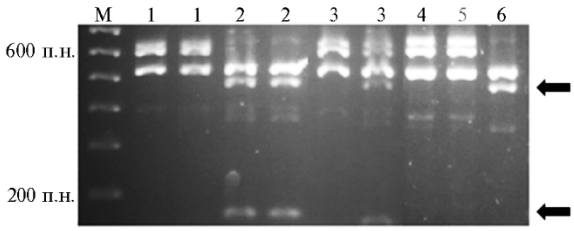

Рис. 2. Амплификация целевого фрагмента (590 п.н.)**, характерного для *Triticum timopheevii*, отсутствие двух фрагментов, специфичных для мягкой пшеницы, и наличие дополнительного фрагмента** (150 п.н.)**, не свойственного *T. timopheevii* и мягкой пшенице, у линии Л-6-2, а также гетерогенность линии Л-6-10 по содержанию хроматина *T. timopheevii*, выявленные с помощью маркера TNAC 1867 (с TaqI) для длинного плеча хромосомы 7-й гомеологичной группы мягкой пшеницы:** 1 — Л-6-1, 2 — Л-6-2, 3 — Л-6-10, 4 — сорт Омская 36, 5 — сорт Эстер, 6 — *T. timopheevii* K-47793; M — маркер молекулярных масс 100 bp Laddder («Fermentas», Литва).

Также было показано, что у образцов Л-6-6, Л-6-7, Л-25-26 (TNAC 1026_HaeIII); Л-25-20 (TNAC 1178), Л-25-21 (TNAC 1178_ TaqI); Л-6-5, Л-6-6, Л-6-11, Л-6-14, Л-25-28 (TNAC 1248), Л-6-3, Л-25-20, Л-25-21 (TNAC 1248_TaqI, TNAC 1248_HaeIII), Л-25-22 (TNAC 1248_TaqI), Л-25-27 (TNAC 1248_HaeIII) отсутствует фрагмент, характерный для мягкой пшеницы. У Л-6-16 (TNAC 1752) имелся дополнительный фрагмент, отличный от таковых у мягкой пшеницы, но не характерный и для *T. timopheevii*, а у Л-6-2, Л-6-11, Л-6-12, Л-6-13, Л-6-14, Л-6-17 (TNAC 1752) отсутствовал фрагмент, свойственный мягкой пшенице, но появлялся дополнительный фрагмент, не характерный для *T. timopheevii*. Отсутствие фрагмента пшеничного типа может свидетельствовать о наличии в соответствующем локусе интрогрессии чужеродного генетического материала (отсутствие дополнительного фрагмента, который бы амплифицировался с этой интрогресии, возможно, объясняется совпадением его длины с размерами имеющихся фрагментов пшеничного типа). Присутствие дополнительных фрагментов, не характерных для *T. timopheevii*, вероятно, обусловлено аллельным полиморфизмом образцов *T. timopheevii*. Среди изучаемых линий гетерогенность проявилась у Л-6-2, Л-6-6, Л-6-7, Л-6-8, Л-6-10, Л-6-11, Л-6-12, Л-6-14, Л-6-16, Л-6-17, Л-6-18, Л-6-20, Л-25-20, Л-25-21, Л-25-22, Л-25-27 и Л-25-28, что может быть связано со вторичной хазмогамией.

Селекционные линии Л-6-6, Л-6-7 и Л-6-10 были использованы для получения 11 селекционных образцов, находящихся на разных этапах селекционного процесса. Мы применили для их анализа 4 PLUG-маркера: TNAC 1026_HaeIII (1L), TNAC 1248_TaqI (3S), TNAC 1421_TaqI (4AS-4BDL), TNAC 1867 (7L). Основанием для их выбора послужил тот факт, что, по результатам нашего анализа, профили образцов Л-6-6, Л-6-7, Л-6-10 отличались от профиля мягкой пшеницы либо отсутствием бэндов, специфичных для мягкой пшеницы, либо наличием дополнительных бэндов.

При использовании маркера TNAC 1421 TaqI дополнительный фрагмент типа *T. timopheevii* был обнаружен в популяциях из питомника гибридизации ♀Омская 36 × ♂Л-6-7 и ♀Тризо × ♂Л-6-7, в популяции из питомника отбора ♀Л-6-6 × ♂Тризо, у линии из питомника предварительного сортоиспытания ♀Иволга × ♂Л-6-7, а также у линии из конкурсного сортоиспытания ♀[(Жница × *T. timopheevii* K-47793) × Жница] × ♂Тризо,

что свидетельствует о наличии в этих образцах интрогрессии от *T. timopheevii* (рис. 3, табл.). При использовании маркера TNAC 1248_TaqI фрагмент, характерный для мягкой пшеницы, не выявлялся у популяций из питомника гибридизации ♀Омская 36 × ♂Л-6-7 и ♀Тризо × ♂Л-6-7 и линий из питомника предварительного сортоиспытания ♀Л-6-6 × ♂Тризо и ♀Иволга × ♂Л-6-7, чем также может подтверждаться наличие генетического материала от *T. timopheevii* у перечисленных образцов (см. табл.).

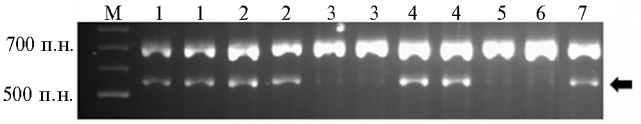

Рис. 3. Пример амплификации целевого фрагмента (550 п.н.), **характерного для *Triticum timopheevii*, при использовании маркера TNAC 1421 (с TaqI) для длинного плеча хромосомы 4-й гомеологичной группы субгенома A и длинного плеча хромосом 4-й гомеологичной группы субгеномов B и D мягкой пшеницы:** 1 — ♀[(Жница × *T. timopheevii* K-47793) × Жница] × ♂Тризо, 2 — ♀Омская 36 × ♂Л-6-7, 3 — ♀Эстер × ♂Л-6-10, 4 — ♀Л-6-6 × ♂Тризо, 5 — Омская 36, 6 — Эстер, 6 — *T. timopheevii* K-47793; M — маркер молекулярных масс 100 bp Ladder («Fermentas», Литва).

Результаты исследования потомств отдаленных гибридов *Triticum aestivum* и *T. timopheevii* на разных этапах селекционного процесса с использованием двух PLUG маркеров

Селекционный образец	Селекционный этап	Характеристика профиля ПЦР-амплификации
	Маркер TNAC 1248 (3S)_TaqI	
♀Омская 36 × ♂Л-6-7	Питомник гибридизации	Отсутствие фрагмента, характерного для мягкой пшеницы
♀Тризо × ♂Л-6-7	Питомник гибридизации	Отсутствие фрагмента, характерного для мягкой пшеницы
♀Л-6-6 × ♂Тризо	Питомник отбора	Отсутствие фрагмента, характерного для мягкой пшеницы
♀Иволга × ♂Л-6-7	Предварительное сортоиспытание	Отсутствие фрагмента, характерного для мягкой пшеницы
	Маркер TNAC 1421 (4AS-4BDL)_TaqI	
♀Омская 36 × ♂Л-6-7	Питомник гибридизации	Дополнительный фрагмент, характерный для *T. timopheevii*
♀Тризо × ♂Л-6-7	Питомник гибридизации	Дополнительный фрагмент, характерный для *T. timopheevii*
♀Л-6-6 × ♂Тризо	Питомник отбора	Дополнительный фрагмент, характерный для *T. timopheevii*
♀Иволга × ♂Л-6-7	Предварительное сортоиспытание	Дополнительный фрагмент, характерный для *T. timopheevii*
♀[(Жница × *T. timopheevii* K-47793) × Жница] × ♂Тризо	Конкурсное сортоиспытание	Дополнительный фрагмент, характерный для *T. timopheevii*

Молекулярное PLUG-маркирование — наиболее удобный метод диагностики образцов при селекции растений. PLUG-маркеры позволяют за одну реакцию идентифицировать наличие или отсутствие привнесенного генетического материала в нескольких субгеномах в пределах одной гомеологичной группы у полиплоидных видов. Применив систему PLUG-маркеров для изучения отдаленных гибридов мягкой пшеницы и *T. timopheevii* на разных этапах селекционного процесса, мы получили данные о наличии чужеродного генетического материала в ряде исследуемых форм, а также о гетерогенности части селекционных образцов.

Специально отобранные PLUG-маркеры позволили нам получить три типа профилей ПЦР-продуктов. Первый тип совпадал с таковым у мягкой пшеницы, что свидетельствовало об отсутствии интрогрессий. Второй тип характеризовался отсутствием продукта, характерного для пшеницы. Это может указывать на утрату определенного участка хромосомы мягкой пшеницы в результате замещения на чужеродный фрагмент, который визуально не выявлялся, что, например, возможно при совпадении по размеру с пшеничным фрагментом. Для третьего типа было характерно

отсутствие пшеничного фрагмента и наличие дополнительного фрагмента, амплифицируемого с чужеродной интрогрессии.

В ранее опубликованных работах PLUG-маркеры применялись на пшенице для идентификации хроматина от генетических удаленных видов — *Thinopyrum elongatum* (15), *Th. intermedium* (16), *Leymus mollis* (17), *Th. ponticum* (18). Нами же впервые показана возможность получать различимые профили у таких генетически близких видов, как пшеница мягкая и пшеница Тимофеева.

Обнаруженные у изучаемых селекционных образцов дополнительные амплифицированные фрагменты, не совпадающие с имеющимися в профилях у мягкой пшеницы, могут быть ассоциированы с устойчивостью к бурой ржавчине и мучнистой росе. Отобранные нами PLUG-маркеры, позволяющие амплифицировать специфичные фрагменты, могут использоваться для оценки расщепляющихся популяций с целью поиска чужеродной интрогрессии, связанной с устойчивостью. Ранее мы продемонстрировали эффективность такого подхода, применив PLUG-маркеры при исследовании замещения 6Ai#2(6D), обусловливающего устойчивость к листовой ржавчине у сорта мягкой пшеницы Тулайковская 10 (16).

Нами были выявлены формы как с единичными, так и с несколькими интрогрессиями. Особый интерес представляют образцы с множественными интрогрессиями в пределах нескольких гомеологичных групп. Так, у Л-6-6 имеются интрогрессии в 1-й и 3-й, у Л-6-7 — в 1-й и 4-й, у Л-25-20 и Л-25-21 — во 2-й и 3-й, у Л-6-11 — в 3-й, 6-й и 7-й, у Л-6-14 — в 3-й и 6-й, у Л-6-2, Л-6-16 и Л-6-17 — в 6-й и 7-й гомеологичных группах. Отобранные нами маркеры при использовании коллекции нулитетрасомиков в качестве контроля позволяют более точно локализовать единичные и множественные интрогрессии. Учитывая высокую степень консервативности PLUG-маркеров, можно при этом ожидать, что в случае дополнительных фрагментов в профиле чужеродный генетический материал был перенесен именно из той гомеологичной группы пшеницы Тимофеева, на которую разработан соответствующий PLUG-маркер.

Кроме того, с помощью PLUG-маркеров выявляется гетерогенность изучаемого селекционного материала и возможен отбор наиболее стабильных линий, не расщепляющихся по маркерам. В частности, нами показана гетерогенность не только поздних поколений селекционных линий, отобранных из комбинаций Л-6 и Л-25, но даже линии из питомника предварительного сортоиспытания ♀Л-6-6 × ♂Тризо, что может быть связано со вторичной хазмогамией (20).

Итак, PLUG-маркирование позволяет осуществлять мониторинг и проводить направленный перенос чужеродного генетического материала в генотип мягкой пшеницы, что особенно важно при работе с таким ценным, но сложным в селекционном отношении объектом, как *Triticum timopheevii*. В целом преимущество PLUG-маркеров при работе с отдаленными гибридами состоит в том, что они способны выявлять чужеродные интрогресии даже при отсутствии информации об исходном виде-доноре, так как позволяют сделать вывод о наличии перестроек при сопоставлении профилей ПЦР-продуктов у гибридной формы и мягкой пшеницы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Н.П., Кондратенко Е.Я. Происхождение, доместикация и эволюция пшениц. Вестник ВОГиС, 2008, 12(1/2): 159-179.
2. Зерновые культуры (выращивание, уборка, доработка и использование) /Под ред. Д. Шпа-

ара. М., 2016.
3. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Apples R., Devos K.M. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Proc. 12th Int. Wheat Genetics Symposium (8-13 September 2013, Yokohama, Japan). Режим доступа: https://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2013/GeneCatalogueIntroduction.pdf. Без даты.
4. Leonova I.N., Budashkina E.B., Flath K., Weidner A., Börner A., Röder M.S. Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat from *Triticum timopheevii*. Cereal Res. Commun., 2010, 38: 212-220 (doi: 10.1556/CRC.38.2010.2.7).
5. Маркелова Т.С. Основные направления селекции пшеницы на устойчивость к болезням. Защита и карантин растений, 2011, 1: 21-23.
6. Жуковский П.М. Избранные труды /Под ред. В.Ф. Дорофеева. Л., 1985.
7. Дорофеев В.Ф. Пшеницы мира. Л., 1987.
8. Brown-Guedira G.L., Gill B.S., Bockus W.W., Cox T.S., Hatchett J.H., Leath S., Peterson C.J., Thomas J.B., Zwer P.K. Evaluation of a collection of wild Timopheevii wheat for resistance to disease and arthropod pests. Plant Dis., 1996, 80: 928-933.
9. Тимонова Е.М., Леонова И.Н., Белан И.А., Россеева Л.П., Салина Е.А. Влияние отдельных участков хромосом *Triticum timopheevii* на формирование устойчивости к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012, 16: 142-159.
10. Частная селекция полевых культур /Под ред. В.В. Пыльнева. СПб, 2016.
11. Обухова Л.В., Будашнкина Е.Б., Ермакова М.Ф., Калинина Н.П., Шумный В.К. Качество зерна и муки у интрогрессированных линий яровой мягкой пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum timopheevii* Zhuk. Сельскохозяйственная биология, 2008, 5: 38-42.
12. Рубец В.С. Биологические особенности тритикале как основа совершенствования селекционного процесса. Докт. дис. М., 2016.
13. Ishikawa G., Yonemaru J., Saito M., Nakamura T. PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. BMC Genomics, 2007, 8(1): 135 (doi: 10.1186/1471-2164-8-135).
14. Ishikawa G., Nakamura T., Ashida T., Saito M., Nasuda S., Endo T.R., Wu J., Matsumoto T. Localization of anchor loci representing five hundred annotated rice genes to wheat chromosomes using PLUG markers. Theor. Appl. Genet., 2009, 118(3): 499-514 (doi: 10.1007/s00122-008-0916-y).
15. Hu L.-J., Liu C., Zeng Z.-X., Li G.-R., Song X.-J., Yang Z.-J. Genomic rearrangement between wheat and *Thinopyrum elongatum* revealed by mapped functional molecular markers. Genes Genom., 2012, 34(1): 67-75 (doi: 10.1007/s13258-011-0153-7).
16. Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. Euphytica, 2015, 204: 91-101 (doi: 10.1007/s10681-014-1344-5).
17. Yang X., Wang C., Li X., Chen C., Tian Z., Wang Y., Ji W. Development and molecular cytogenetic identification of a novel wheat—*Leymus mollis* Lm#7Ns (7D) disomic substitution line with stripe rust resistance. PLoS ONE, 2015, 10(10): e0140227 (doi: 10.1371/journal.pone.0140227).
18. Li X.J., Hu X.G., Hu T.Z., Li G., Ru Z.G., Zhang L.L., Lang Y.M. Identification of a novel wheat-*Thinopyrum ponticum* addition line revealed with cytology, SSR, EST-SSR, EST-STS and PLUG markers. Cereal Res. Commun., 2015, 43(4): 544-553 (doi: 10.1556/0806.43.2015.021).
19. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 1987, 19: 11-15.
20. Рубец В.С., Пыльнев В.В., Ялтонская М.В., Дивашук М.Г., Коротаева А.А. Проблема вторичной хазмогамии в отдаленной гибридизации пшеницы (*Triticum* L.). Известия ТСХА, 2012, 6: 62-69.

[1]Центр молекулярной биотехнологии
ФГБОУ ВО РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: divashuk@gmail.com;
[2]ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49,
e-mail: genetics@timacad.ru, selection@timacad.ru, pav2395147@yandex.ru;
[3]ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии,
127550 Россия, г. Москва, ул. Тимирязевская, 42,
e-mail: karlovg@gmail.com

Поступила в редакцию
11 октября 2016 года

PLUG MARKERS TO DETECT ALIEN GENETIC MATERIAL IN BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.) HYBRIDS DURING BREEDING

P.A. Sokolov[1, 2], A.V. Polkhovsky[1, 2], P.Yu. Kroupin[1, 2], V.S. Rubets[2], V.V. Pylnev[2], T.I. Khupatsariya[2], G.I. Karlov[1, 3], M.G. Divashuk[1, 2]

[1]*K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, Center for Molecular Biotechnology*, 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail divashuk@gmail.com (corresponding author);
[2]*K.A. Timiryazev Russian State Agrarian University—Moscow Agrarian Academy, Department of Genetics, Biotechnology, Plant Breeding & Seed Science,* 49, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail genetics@timacad.ru, selection@timacad.ru, pav2395147@yandex.ru;
[3]*All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology,* Federal Agency of Scientific Organizations, 42, ul. Timiryazevskaya, Moscow, 127550 Russia, e-mail karlovg@gmail.com
ORCID:
Sokolov P.A. orcid.org/0000-0002-9301-8175
Polkhovsky A.V. orcid.org/0000-0003-0746-1902
Kroupin P.Yu. orcid.org/0000-0001-6858-3941
Rubets V.S. orcid.org/0000-0003-1233-8837
Pylnev V.V. orcid.org/0000-0003-0400-0609
Karlov G.I. orcid.org/0000-0002-9016-103X
Divashuk M.G. orcid.org/0000-0001-6221-3659
The authors declare no conflict of interests
Acknowledgements:
Supported by the grant from Russian Science Foundation, project № 16-16-00097 of January 27, 2016
Received October 11, 2016 doi: 10.15389/agrobiology.2017.3.535eng

Abstract

Molecular markers make it possible to monitor the directional introgression of alien genetic material to the genome of wheat. Among the diverse molecular markers, the PLUG (PCR-based landmark unique gene) markers have the greatest advantage for analyzing distant hybrids due to the ability to amplify polymorphism fragments on closely related species and to detect simultaneously three genomes within one homoeological group in one PCR. A collection of 41 entries of different breeding stages developed in Russian State Agrarian University as a result of crossing of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and wheat *T. timopheevii* Zhuk. was studied. All hybrids were resistant to leaf rust and powedery mildew natural infection. Using this collection of distant hybrids, we demonstrated for the first time the possibilities of PLUG markers for identifying alien introgressions in the genome of bread wheat from *T. timopheevii.* In order to increase the degree of polymorphism between the entries, we additionally processed the products of amplification of PLUG markers with high-frequency restriction endonucleases TaqI and HaeIII. The entries were found to carry both single and multiple introgressions. The latter entries with introgressions in more than one homeological group are of particular interest. The heterogeneity of not only the late generations of entries, but also the entries from the nursery of the preliminary cultivar estimation, which may be associated with secondary chasmogamy, is shown. As a result of the studies, 14 PLUG markers for the long and short chromosome arm of each homeological group have been selected, which can be recommended for the detection of the genetic material of *T. timopheevii* in distant hybrids of *T. timopheevii* × *T. aestivum*. The advantages of PLUG markers as a tool for monitoring the transfer of alien hereditary material into the genome of bread wheat are discussed.

Keywords: common wheat, *Triticum aestivum*, *Triticum timopheevii*, wide hybridization, molecular markers, PLUG, PCR.

Адрес сайта журнала в Интернете — www.agrobiology.ru
Статьи, события, информация — 10500 просмотров за месяц