

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ КОРОТКОСТЕБЕЛЬНОСТИ *Rht2* И *Rht8* У ОБРАЗЦОВ ГЕКСАПЛОИДНОГО ТРИТИКАЛЕ С ПОМОЩЬЮ ДНК МАРКЕРОВ

К.У. Куркиев¹, Л.Г. Тырышкин², М.А. Колесова², У.К. Куркиев¹

¹ Дагестанская опытная станция ВНИИР им. Н.И. Вавилова, Дербент, Россия, e-mail: kkish@mail.ru

² Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: tyryshkinlev@rambler.ru

С помощью STS маркеров гена короткостебельности пшеницы *Rht2* и SSR маркера гена *Rht8* провели скрининг образцов гексаплоидного тритикале мировой коллекции ВНИИ растениеводства, для которых ранее классическими методами была изучена генетика высоты растений. Ни у одной формы не идентифицированы аллели гена *Rht2*. У 15 образцов обнаружены продукты амплификации при использовании праймеров микросателлитного маркера WMS 261; только у одного образца размер амплифицированного фрагмента соответствовал таковому сорта пшеницы Безостая 1 (аллель короткостебельности гена *Rht8*). Обсуждаются возможные причины редкой встречаемости генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8* у гексаплоидных тритикале.

Введение

Создание короткостебельных форм – одно из основных направлений селекции зерновых злаковых культур (Кобылянский, 1982; Пшеницы мира ..., 1987), в том числе и гексаплоидного тритикале (Сулима, Сечняк, 1984). Знание генетической природы признака «высота растения» является необходимым для выявления доноров низкорослости, укорачивающих длину стебля, не ухудшая при этом продуктивность зерна (Мережко, 1994), и значительно облегчает и ускоряет селекцию на данный признак. Кроме того, идентификация генов короткостебельности и изучение их селекционной ценности в генотипе тритикале может использоваться при подборе для скрещиваний пар сортов пшеницы и ржи как доноров низкорослости при создании тритикале.

Изучение наследования признака у 30 образцов тритикале из мировой коллекции ВИР позволило идентифицировать 15 генов короткостебельности (Куркиев и др., 2006; Куркиев, Альдеров, 2007; Куркиев, 2008а, б). Анализ генеалогии позволил предположить, что короткостебельность образца Vokolo обусловлена геном *Rht3 Triticum aestivum* L., а полудоми-

нантный ген образцов ПРАГ 199 и ПРАГ 184 привнесен в геном тритикале от ржи (Куркиев и др., 2006). Однако для рецессивных генов низкорослости, идентифицированных у 21 образца тритикале, определение их происхождения на основе генеалогии в большинстве случаев затруднительно.

Использование молекулярных ДНК маркеров, тесно сцепленных с конкретными генами, позволяет во многих случаях быстро и надежно идентифицировать образцы, несущие эти гены. В настоящее время разработаны праймеры для идентификации аллелей генов короткостебельности пшеницы *Rht1* (*Rht-B1*), *Rht2* (*Rht-D1*) (Ellis *et al.*, 2002), *Rht8* (Worland *et al.*, 1998); именно эти гены наиболее часто использовались в селекции мягкой пшеницы на укороченный стебель и обусловили резкий скачок в повышении урожайности культуры в XX в. (зеленая революция) (Hedden, 2003). Гены *Rht2* и *Rht8* локализованы в хромосомах D генома *T. aestivum*, который в целостном виде отсутствует у гексаплоидных тритикале. Однако поскольку в родословную большинства из них входит мягкая пшеница и при формировании генома тритикале часто происходят хромосомные R/D замещения, транслокации участков хромо-

сом пшеницы на хромосомы ржи (Lukaszewski, 1988), теоретически возможно присутствие этих генов у тритикале.

Цель настоящей работы – с помощью молекулярных маркеров, специфичных для аллелей генов короткостебельности *Rht2* и *Rht8*, провести скрининг образцов тритикале с генетически охарактеризованной высотой растений.

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы гексаплоидного тритикале из мировой коллекции ВИР, имеющие:

1. Только рецессивные гены короткостебельности: ПРАГ 160, ПРАГ 204, ПРАГ 46/4, СЛЗМР6, АД 206, Курская степная, Белорусский 1135, АД 1422, Presto, Yago, Stier«S», CIN-CNO/Bgl, IA-M2A×Pi 62/Bgl, Giraf«S», Guadajira × 16215, Kla 'S', Tyalla, Panda«R» – ABN, Alamos 83 (Куркиев и др., 2006; Куркиев, 2008а, б).

2. По одному полудоминантному гену короткостебельности: ПРАГ 184, ПРАГ 199 и Vokolo (Куркиев и др., 2006);

3. Имеющие несколько генов, контролирующих высоту растения, среди которых 1–2 рецессивные – АДК 1369t, и-364605, и-457401 (Куркиев, 2008а, б).

4. Без аллелей короткостебельности: ПРАГ 3, Таловский 1, 6 ТА 502, Аист харьковский (Куркиев и др., 2006).

Все эти образцы созданы с привлечением в межродовую гибридизацию мягкой пшеницы и, следовательно, теоретически могли иметь генетический материал от *T. aestivum* (по электронной базе данных мировой коллекции тритикале ВНИИР им. Н.И. Вавилова).

Кроме того, анализировали 18 короткостебельных линий, выделенных в F₆ из комбинаций от скрещивания: ПРАГ 46/4 × Presto, Аист харьковский × CinCno/Bgl, Guadajira × Presto, Аист харьковский × СЛЗМР6, и-364605 × и-457401, Курская степная × ПРАГ 199, Alamos 83 × Presto, Alamos 83 × и-364605, Presto × ПРАГ 199 и Guadajira × Presto.

Растения выращивали на вате, смоченной водой на лабораторной светоустановке (20–22 °С, постоянное освещение 2500 люкс). ДНК выделяли из листьев 2-, 3-, 10-дневных проростков микрометодом в пробирках типа Eppendorf по

методике, предложенной Edwards *et al.* (1991), в модификации Д.Б. Дорохова и Э. Клоке (1997). Концентрация ДНК в рабочем растворе составляла приблизительно 50 нг/мкл.

Для полимеразной цепной реакции использовали две пары праймеров к STS-маркерам гена *Rht2*: DF2 5'-GGC AAG CAA AAG CTT CGC G-3' и WR2 5'-GGC CAT CTC GAG CTG CAC-3' (выявляют аллель дикого типа) и DF 5'-CGC GCA ATT ATT GGC CAG AGA TAG-3' и MR2 5'-CCC CAT GGC CAT CTC GAG CTG СТА-3' (выявляют аллель короткостебельности) (Ellis *et al.*, 2002); праймеры к SSR-маркеру гена *Rht8*: WMS261-F 5'-CTC CCT GTA CGC СТА AGG C-3' и WMS261-R 5'-CTC GCG СТА СТА GCC ATT G'-3' (Korzun *et al.*, 1998).

Реакционные смеси общим объемом 25 мкл содержали:

1. 2 мкл геномной ДНК, 2,5 мкл 10X ПЦР буфера, 1,0 мкл 10 миллимолярного раствора каждого праймера, 0,1 мкл *Tag* полимеразы (5 ед/мкл), 1,5 мкл 2,5 мМ раствора дезоксинуклеотидов, 16,9 мкл H₂O – при ПЦР с праймерами DF и MR2';

2. 2 мкл геномной ДНК, 2,5 мкл 10X ПЦР буфера, 2,0 мкл 10 миллимолярного раствора каждого праймера, 0,25 мкл *Tag* полимеразы (5 ед/мкл), 1,5 мкл 2,5 мМ раствора дезоксинуклеотидов, 14,75 мкл H₂O – при реакции с праймерами DF2 и MR2';

3. 1 мкл геномной ДНК, 2,5 мкл 10X ПЦР буфера, 2,5 мкл 10 миллимолярного раствора каждого праймера, 0,2 мкл *Tag* полимеразы (5 ед/мкл), 1,5 мкл 2,5 мМ раствора дезоксинуклеотидов, 14,8 мкл H₂O – при ПЦР с праймерами WMS261-F' и WMS261-R.

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе фирмы «Perkin Elmer» по следующим протоколам: при идентификации дикого аллеля *Rht2* – 95 °С – 5 мин, 30 циклов (94 °С – 20 сек, 58 °С – 30 сек, 72 °С – 10 сек), 72 °С – 2 мин; аллеля короткостебельности этого гена – 94 °С – 5 мин, 7 циклов (94 °С – 30 сек, первый цикл 65 °С – 60 сек, снижение температуры на 1 °С в каждом последующем цикле, 72 °С – 80 сек), 30 циклов (94 °С – 15 сек, 58 °С – 15 сек, 72 °С – 50 сек), 72 °С – 2 мин; аллелей гена *Rht8* – 94 °С – 3 мин, 45 циклов (94 °С – 60 сек, 55 °С – 60 сек, 72 °С – 120 сек), 72 °С – 10 мин. Кроме того, при идентификации гена

Rht8 полимеразную цепную реакцию проводили и по протоколу, предложенному для выявления аллеля короткостебельности гена *Rht2*.

Аmplифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 3 %-м агарозном геле в 1 × TBE-буфере; гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. В качестве контроля использовали фрагменты амплификации ДНК сортов мягкой пшеницы Pitic 62 (ген *Rht2*), Norin 10 (ген *Rht2* и *Rht8*) и Безостая 1, Кавказ, Siete Cerros (*Rht8*) (McIntosh *et al.*, 2003).

Результаты

У контрольных образцов мягкой пшеницы амплифицировались фрагменты, специфические для аллелей генов короткостебельности этих форм (Worland *et al.*, 1998; Ellis *et al.*, 2002): у сортов Norin 10 и Pitic 62 при использовании праймеров DF и MR2, у сортов Безостая 1, Siete Cerros и Кавказ – праймеров DF2 и MR2, у Безостой 1, Кавказа и Siete Cerros – праймеров WMS261-F и WMS261-R (рис. 1–3). Не отмечено различий в спектре амплифицированных фрагментов при использовании праймеров к SSR-маркеру гена *Rht8* при проведении ПЦР в условиях, оптимизированных для этих праймеров (Korzun *et al.*, 1998) и условиях, разработанных для идентификации аллеля короткостебельности гена *Rht2* (не показано).

Ни у одной из изученных форм тритикале не выявлены фрагменты амплификации при использовании праймеров маркеров 2 альтер-

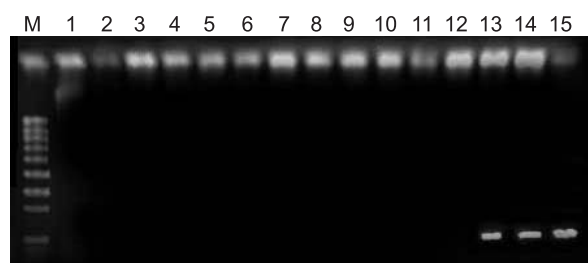


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК с использованием праймеров DF и MR2.

М – маркер молекулярного веса. Тритикале: 1 – ПРАГ 3; 2 – Таловский 1; 3 – 6ТА502; 4 – Аист харьковский; 5 – АД 206; 6 – ПРАГ 184; 7 – Guadajira; 8 – × 16215; 9 – АД 1422; 10 – K1a «S». Пшеница: 11 – Pitic 62; 12 – Norin 10; 13 – Безостая 1; 14 – Кавказ; 15 – Siete Cerros.

нативных аллелей гена *Rht2* (примеры электрофореза приведены на рис. 1, 2).

У 11 образцов тритикале АД 206, Курская степная, АД 1422, Белорусский 1135, АДК 1369t, K1a «S», Tyalla, Panda«R» – ABN, Alamos 83, и-364605, и-457401 и 4 линий идентифицированы продукты амплификации после проведения ПЦР их ДНК с праймерами SSR маркера, сцепленного с геном *Rht8*. Из этих 15 форм только у образца АДК1359t длина фрагмента амплификации не отличалась от таковой у сорта пшеницы Безостая 1 (рис. 3).

Обсуждение

Идентичность спектров амплификации ДНК образцов мягкой пшеницы с аллелем короткостебельности гена *Rht2* подтверждает сделанный ранее вывод о высокой специфичности прайме-



Рис. 2. Продукты амплификации с использованием праймеров DF и MR2.

М – маркер молекулярного веса. Тритикале: 1 – ПРАГ 160; 2 – ПРАГ 204; 3 – Stier«S»; 4 – Yago; 5 – CIN-CNO × Beagle; 6 – СЛЗМР6; 7 – ПРАГ 46/4; 8 – Alamos 83; 9 – АДК 1369t; 10 – и-364605. Пшеница: 11 – Безостая 1; 12 – Pitic 62; 13 – Siete Cerros; 14 – Кавказ; 15 – Norin 10.

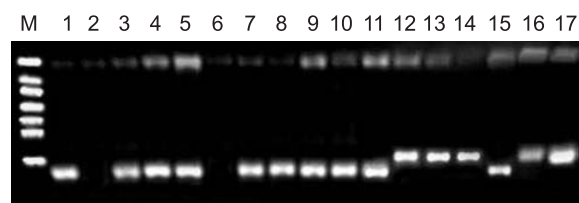


Рис. 3. Продукты амплификации с использованием праймеров WRM261.

М – маркер молекулярного веса. Тритикале: 1 – АД 206; 2 – Giraf«S»; 3 – K1a «S»; 4 – Tyalla; 5 – Panda«R» – ABN; 6 – ПРАГ 46/4; 7 – и-364605; 8 – и-457401; 9 – АД 1422; 10 – Alamos 83; 11 – Курская степная; 12 – АДК1359t. Пшеница: 13 – Безостая 1; 14 – Siete Cerros; 15 – Pitic 62; 16 – Кавказ; 17 – Norin 10.

ров маркера этого аллеля (Ellis *et al.*, 2002), что указывает на возможность их применения для идентификации образцов, имеющих данный аллель. Отсутствие продуктов амплификации маркеров обоих аллелей *Rht2* у тритикале указывает либо на специфическую делецию локуса данного гена, но, скорее всего, объясняется отсутствием у изученных форм хромосомы 4D мягкой пшеницы, в которой локализован данный ген (McIntosh *et al.*, 2003). Большинство из имеющихся у гексаплоидных тритикале R/D замещений – это 2R/2D (Lukaszewski, 1988). В научной литературе имеются данные о создании линий гексаплоидных тритикале, имеющих и другие R/D замещения (Oracka, Łapiński, 2006). Однако среди уже прошедших отбор сортообразцов они встречаются гораздо реже (по сравнению с 2R/2D), что может быть связано с их низкой селекционной значимостью и как следствие повышенной отбраковкой на ранних стадиях создания. С практической точки зрения очевидна необходимость разработки специфических методов для передачи гена *Rht2* гексаплоидным тритикале не в составе целой хромосомы 4D, а в транслокации.

При использовании праймеров SSR маркера гена *Rht8* амплифицируются фрагменты размера 165, 174, 180, 192, 198, 200 и 204 п.о., причем только фрагмент 192 п.о. специфичен для аллеля короткостебельности данного гена (Worland *et al.*, 1998). У сортов пшеницы Безостая 1, Кавказ и Siete Cerros (все имеют один аллель короткостебельности *Rht8*) амплифицировался фрагмент одинакового размера (рис. 3). Отсутствие различий в спектрах амплификации при проведении ПЦР в условиях, оптимизированных для праймеров WRM261, и в условиях, разработанных для идентификации аллеля короткостебельности гена *Rht2*, указывает на возможность одновременной идентификации 2 аллелей при использовании одной методики (состав реакционных смесей, протоколы амплификации), что значительно упрощает работу при изучении одного набора образцов.

Фрагмент ДНК, схожий по таковому сорта пшеницы Безостая 1, выявлен только у одного образца тритикале АДК1359t (рис. 3). Поскольку мы провели анализ фрагментов амплификации только в агарозном геле, который не всегда позволяет дифференцировать фрагменты, различа-

ющиеся по размеру на несколько нуклеотидов, мы не можем утверждать, что данный образец имеет данный аллель. В то же время отсутствие фрагментов амплификации ДНК у 33 форм и явное отличие длин фрагментов у 14 образцов от продуктов амплификации сорта пшеницы Безостая 1 позволяет утверждать, что короткостебельность всех изученных тритикале (за исключением АДК1359t) детерминируется генами, отличными от *Rht8*. Короткостебельность АДК1359t по результатам гибридологического анализа контролируется двумя генами – полудоминантным и рецессивным (Куркиев, 2008 б), который, возможно, и является геном *Rht8*.

В ранее проведенной работе на основе анализа всхожести семян F₁ и фертильности растений F₂ в комбинациях скрещиваний короткостебельных форм тритикале между собой было предположено, что 11 сортообразцов из 30 изученных в настоящем исследовании являются формами с R/D замещениями (Куркиев, 2007; Куркиев, 2008а, б). Это предположение косвенно подтверждалось и особенностями фенотипа растений этих образцов: относительно низкий рост, рыхлый укороченный многоцветковый колос, наличие плеча на колосовой чешуе, длинное верхнее междоузлие – до 50 % от высоты растения.

В настоящей работе выявлены наличие фрагментов амплификации после ПЦР с праймерами WMS261-F и WMS261-R у всех этих образцов и отсутствие у остальных форм, что окончательно доказывает наличие у 15 форм генетического материала хромосомы пшеницы 2D. Можно предположить, что отсутствие аллеля короткостебельности *Rht8* у форм с замещением 2R/2D связано с привлечением в гибридизацию высокорослых форм пшеницы либо с контролем низкорослости пшеничного родителя геном (генами), отличным от *Rht8*. Нельзя исключить также наличие специфических микроделений в локусе данного гена у тритикале, поскольку в родословную образцов АД 206, Курская степная и АД 1422, для которых выявлено наличие 2R/2D замещения и отсутствие аллеля короткостебельности гена *Rht8*, входит сорт Безостая 1 (Шульдин, 1970). Маркер WMS261 может быть рекомендован для быстрой и надежной идентификации форм гексаплоидного тритикале с замещением ржаной хромосомы на хромосому 2D на ранних стадиях онтогенеза растений.

Литература

- Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 443–450. (Dorokhov D.B., Klocke E. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes // Rus. J. Genet. V. 33. № 4. P. 358–365.
- Кобылянский В.Д. Рожь. Генетические основы селекций. М.: Колос, 1982. 221 с.
- Куркиев К.У. Особенности наследования высоты растения у гексаплоидных тритикале с R/D замещением // Матер. Всерос. конф., посвященной 75-летию ДГСХА. Махачкала, 2007. С. 152–154.
- Куркиев К.У. Генетический контроль высоты растений у яровых гексаплоидных тритикале с R/D замещением // Докл. РАСХН. 2008а. № 3. (В печати).
- Куркиев К.У. Генетический контроль высоты растений озимых гексаплоидных тритикале с R/D замещением // Матер. секции тритикале отд. растениеводства РАСХН. 2008б. (В печати).
- Куркиев К.У., Альдеров А.А. Аллельные взаимоотношения генов короткостебельности у гексаплоидных тритикале // Вестник РАСХН. 2007. № 5. С. 23–25.
- Куркиев К.У., Куркиев У.К., Альдеров А.А. Генетический контроль короткостебельности гексаплоидных тритикале (*Triticosecale* Wittm.) // Генетика. 2006. Т. 42. № 3. С. 369–376. K.U. Kurkiev, U.K. Kurkiev, A.A. Al'derov. Genetic control of dwarfism in hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittm.) // Rus. J. Genet. 2006. V. 42. № 3. P. 286–293.
- Мережка А.Ф. Проблема доноров в селекции растений. СПб.: ВИР, 1994. 128 с.
- Пшеницы мира: видовой состав, достижения селекций, современные проблемы и исходный материал // В.Ф. Дорофеев, М.М. Якубцинер, М.И. Руденко и др. Изд. 2-е, перераб. и доп. Л.: Агропромиздат, 1987. 559 с.
- Сулима Ю.Г., Сечняк Л.К. Тритикале. М.: Колос, 1984. 317 с.
- Шулындин А.Ф. Синтез трехвидовых пшенично-ржаных амфидиплоидов // Генетика. 1970. № 6. С. 23–35.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 6. P. 1349.
- Ellis M.H., Spielmeier W., Gale K.R. *et al.* 'Perfect' markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 1038–1042.
- Hedden P. The genes of the Green Revolution // Trends Genet. 2003. V. 19: P. 5–9.
- Korzun V., Roder M.S., Ganai M.W. *et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 96. P. 1104–1109.
- Lukaszewski A.J. Chromosome constitution of hexaploid triticale lines in the recent international yield trials // Plant Breeding. 1988. V. 100. P. 268–272.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat // MACGENE2003 (CD Version). User manual.
- Oracka T., Łapiński B. The influence of D(R) substitutions on uptake and utilization of nitrogen and phosphorus in hexaploid triticale // 6th Intern. Triticale Symposium. 3–7 September 2006. Stellenbosch, South Africa. Programme and abstracts of oral and poster presentations. 2006. P. 47.
- Worland A.J., Korzun V., Röder M.S. *et al.* Genetic analysis of the dwarfing gene *Rht8* in wheat. Part II. The distribution and adaptive significance of allelic variants at the *Rht8* locus of wheat as revealed by microsatellite screening // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 96. P. 1110–1120.

IDENTIFICATION OF *Rht2* AND *Rht8* GENES FOR SEMIDWARFNESS IN HEXAPLOID TRITICALE WITH USE OF DNA MARKERS

K.U. Kurkiev, L.G. Tyryshkin, M.A. Kolesova, U.K. Kurkiev

Vavilov All-Russian Institute of Plant Industry, S.-Petersburg, Russia, e-mail: kkish@mail.ru

Summary

One of the major directions of triticale breeding is creation of semidwarf non-lodging varieties. Fifteen genes for the trait were identified in 30 hexaploid triticale samples with use of hybridological analysis.

Genes *Rht2* and *Rht8* are widely used in wheat breeding and are localized in chromosomes of D genome, but they could be transferred to triticale as a result of translocations. The purpose of the work was to screen collection of samples with genetic characteristics for plant height with use of DNA markers specific for these genes.

Material for the work included 48 triticale collection samples and breeding lines differing in plant height with preliminary genetic characteristics. DNA was isolated from seedlings and used in PCR with primers specific for the gene *Rht2* and *Rht8*. Amplified fragments were divided in 3 % agarose gels. DNA from wheat varieties Pitic 62 (*Rht2*), Norin 10 (*Rht2* and *Rht8*) and Besostaia 1, Kavkaz and Siete Cerros (*Rht8*) were used as controls.

No fragments were synthesized in triticale samples after use of primers for two alternative alleles of the gene *Rht2* (DF2 – WR2 and и DF 5' – MR2). Absence of amplification of markers for both alleles of the gene could indicate to specific deletion of the gene locus but most probably is explained by absence of chromosome 4D (localization of *Rht2*) in all studied forms.

For 11 samples – AD 206, Kurskaia stepnaia, AD1422, Belorusskii 1135, ADK 1369t, Kla «S», Tyalla, Panda«R» – ABN, Alamos 83, i-364605, i-457401 – and 4 lines products of amplification were found after PCR with primers for SSR marker linked to gene *Rht8* (WMS261-F – WMS261-R). Among these forms only ADK 1359t has amplification product with length identical to that of fragment of wheat variety Besostaia 1. Absence of amplification for 33 forms and differences in lengths of the products from that of Besostaia 1 for 14 entries proved that semidwarfness in all but one samples under study is controlled by genes nonidentical to *Rht8*. Low plant height of ADK1359t is determined by semidominant and recessive genes (Kurkiev *et al.*, 2006); the second possibly is *Rht8*. According to specific phenotypes it was earlier proposed presence of 2R/2D substitution in 15 forms above mentioned; presence of amplification for all these samples confirms this hypothesis.

We did not found differences in amplification patterns after PCR with WRM261 under protocol optimized for these primers and that for DF 5' – MR2; it indicates to possibility of simultaneous identification of 2 genes for semidwarfness at use of the same method.