

**ДНК-МАРКЕРЫ ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)
С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ
AEGILOPS SPELTOIDES TAUSCH И *TRITICUM TIMOPHEEVII* ZHUK.**

**Е.А. Салина, Е.М. Егорова, И.Г. Адонина, О.Б. Добровольская,
Е.Б. Будашкина, И.Н. Леонова**

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: salina@bionet.nsc.ru

Широкое разнообразие ДНК-маркеров требует более тщательного их подбора для решения различных генетических задач. Микросателлитные (SSR) маркеры и зонды на основе различных клонированных повторенных последовательностей ДНК (Spelt1, pAs1, pSc119.2) были применены для генотипирования гибридов *T. aestivum* × *Ae. speltoides*, *T. aestivum* × *T. timopheevii* и для контроля передачи интрогрессированного материала в процессе возвратного скрещивания. На примере анализа интрогрессивных линий *T. aestivum* с генетическим материалом *Ae. speltoides* продемонстрирована эффективность комплексного использования различных типов молекулярных маркеров для генотипирования гибридных форм мягкой пшеницы. Зонд Spelt1 рекомендован для контроля передачи в поколениях генетического материала *Ae. speltoides*. Показано, что использование SSR-маркеров значительно облегчает и ускоряет процесс выявления моноинсерционных линий (содержащих только одну вставку на геном) от скрещивания *T. aestivum* × *T. timopheevii*. Оптимальной стадией для проведения микросателлитного анализа с целью отбора моноинсерционных растений является потомство третьего беккрасса.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Aegilops speltoides*, *T. timopheevii*, SSR-анализ, *in situ* гибридизация, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, генотипирование, отбор с помощью молекулярных маркеров.

Введение

Дикорастущие сородичи мягкой пшеницы и вид *T. timopheevii* Zhuk. регулярно вовлекаются в селекционный процесс для создания новых форм пшеницы с улучшенными свойствами. Это прежде всего связано с тем, что данные виды содержат генетические локусы, контролирующие устойчивость к биотическим (например различные расы патогенных грибов) и абиотическим (например низкие и высокие температуры, избыток или недостаток влаги) факторам.

Уровень гомологии хромосом *Triticum aestivum* L. (геномная формула BBAADD), *Triticum timopheevii* Zhuk. (GGA^tA^t) и *Aegilops speltoides* Tausch (SS) различен, хотя геномы в группах B/G/S и A/A^t имеют общее происхож-

дение. Перенос генов от этих видов в геном мягкой пшеницы возможен путем гомеологичной рекомбинации по отдельным хромосомам *T. aestivum* и *T. timopheevii* или *Ae. speltoides*, имеющим высокий уровень коллинеарности (сходный порядок расположения маркеров на хромосомах) (Salina *et al.*, 2006a; Dobrovolskaya *et al.*, 2007). В случае нарушения коллинеарности хромосом в результате транслокаций, делеций и инсерций для переноса генов требуются другие подходы, а именно: радиационная обработка, использование механизма центромерного разрыва и слияния унивалентов в первой метафазе мейоза, включение в скрещивание форм мягкой пшеницы, мутантных по локусу *Ph1*, контролирующему гомологичное спаривание хромосом (Friebe *et al.*, 1996). В настоящее время в геном мягкой пшеницы успешно интегрирован ряд

генов устойчивости к болезням от *T. timopheevii* и *Ae. speltoides* (McIntosh *et al.*, 2003).

В последние десятилетия при изучении гибридных форм злаков широко используются молекулярные маркеры. В основе их применения для анализа состава гибридного генома лежат два подхода: 1) молекулярно-генетический, связанный с изучением геномной ДНК гибрида и его родительских форм; 2) молекулярно-цитологический, связанный со сравнительным анализом структуры хромосом. Для каждого подхода используется свой специфический набор маркеров.

В настоящее время насчитывается более 15 различных типов маркеров, используемых для молекулярно-генетического анализа генома растений. К наиболее популярным молекулярным маркерам можно отнести RFLP-, CAPS-, STS-, SSR-, SNP-, RAPD-, SCAR-, AFLP-, SSCP-, ISSR-маркеры (описание каждого типа маркера приведено в обзорах (de Vienne *et al.*, 2003; Хлесткина, Салина, 2006)). Для анализа гибридных форм злаков с целью характеристики замещений, транслокаций, возникших в процессе образования и стабилизации гибридов, наиболее подходящими являются маркеры индивидуальных локусов, картированные на хромосомах. В настоящий момент хромосомные карты пшеницы *T. aestivum* наиболее интенсивно насыщены SSR- (simple sequence repeats) и RFLP- (restriction fragment length polymorphism) маркерами, разработанными как на основе ядерной ДНК, так и на основе экспрессирующихся последовательностей ДНК (expressed sequence tags, EST). Использование SSR (синоним – микросателлиты) в качестве маркеров основано на полиморфизме числа повторяющихся единиц и консервативности фланкирующих последовательностей ДНК, прилегающих к микросателлиту (Morgante, Olivieri, 1993). В последние годы микросателлитные карты построены для видов *T. timopheevii* (Salina *et al.*, 2006a) и *Ae. speltoides* (Dobrovolskaya *et al.*, 2007), что значительно облегчает процесс генотипирования гибридов, полученных в результате скрещивания этих видов с мягкой пшеницей *T. aestivum*.

В основе молекулярно-цитологических методов анализа лежит гибридизация *in situ*, с помощью которой можно получить специфический рисунок хромосом. Гибридизация

in situ является, по существу, прямым методом локализации последовательностей ДНК на хромосомах. За почти 30-летнюю историю существования данного метода он претерпел значительные изменения, направленные на увеличение чувствительности в выявлении меченых зондов. В первую очередь радиоактивное мечение ДНК-зондов было заменено на более простые и эффективные системы нерадиоактивного мечения (для обзора см. Jiang, Gill, 1994). Одновременное использование в гибридизации *in situ* нескольких зондов, меченных различными флуорохромами, значительно расширило возможности картирования последовательностей ДНК на хромосомах и идентификации индивидуальных хромосом (см. Mukai, 1996). Для внутривидовой идентификации хромосом пшеницы и ее дикорастущих сородичей наиболее часто используют последовательности ДНК, входящие в состав различных семейств повторов (Salina *et al.*, 2006b). Так, например, одновременная гибридизация двух проб ДНК (pSc119.2, pAs1) позволяет идентифицировать 17 (из 21) хромосом генома мягкой пшеницы (Schneider *et al.*, 2003). Данный набор проб часто применяется и для анализа гибридных форм пшеницы. Перспективными ДНК-зондами для анализа гибридных форм также можно считать геном-специфичные повторяющиеся последовательности ДНК (Adonina *et al.*, 2004).

Целью настоящей работы является оценка эффективности различных ДНК-маркеров для генотипирования гибридов *T. aestivum* × *Ae. speltoides* и *T. aestivum* × *T. timopheevii*, а также изучение возможности их использования для контроля процессов интрогрессии.

Материалы и методы

Растительный материал. Семена интрогрессивных линий 32/98w и Л592-2 ($2n = 42$), полученных от скрещивания *T. aestivum* сорта Родина ($2n = 42$) с *Ae. speltoides* К-389 и К-1316 ($2n = 14$), а также семена родительских форм *T. aestivum* и *Ae. speltoides* были любезно предоставлены д.б.н. И.Ф. Лапочкиной (НИИ сельского хозяйства Центральные районы Нечерноземной зоны РАСХН, Московская область, пос. Немчиновка) и к.б.н. Т.А. Пшеничниковой (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Линия Л592-2

была получена путем рекомбинации гомеологичных хромосом, а линия 32/98w – с использованием γ -облучения пыльцы *Ae. speltooides* (Лапочкина, 1999).

Интрогрессивные линии мягкой пшеницы, содержащие фрагменты генома *T. timopheevii*, получали путем скрещивания мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 с гибридными линиями 744 и 832 (*T. aestivum* \times *T. timopheevii*, $2n = 42$), описанными ранее (Леонова и др., 2002). Гибриды F_1 были подвергнуты двум возвратным скрещиваниям с исходным сортом мягкой пшеницы, и 160 растений BC_2F_1 генотипированы микросателлитными маркерами. Отобранные растения BC_2F_1 были снова беккроссированы и 178 растений в потомстве от самоопыления (BC_3F_3) использованы для определения хромосомной локализации и размера фрагментов интрогрессии генома *T. timopheevii*.

Выделение ДНК и микросателлитный анализ. Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу Плашке с соавторами (Plaschke *et al.*, 1995). В работе были использованы микросателлитные маркеры *Xgwm* (Röder *et al.*, 1998), *Xgdm* (Pestsova *et al.*, 2000), *Xgpw* (Sourdille *et al.*, 2001), *Xcfe* (Zhang *et al.*, 2005) с известной локализацией на хромосомах *T. aestivum*, *T. timopheevii* и *Ae. speltooides* (Salina *et al.*, 2006a; Dobrovolskaya *et al.*, 2007). Процедуру ПЦР (полимеразной цепной реакции) в случае прямого мечения одного из праймеров флуорохромом осуществляли согласно Родер с соавторами (Röder *et al.*, 1998). При использовании меченого праймера M13 и немеченых праймеров к микросателлитным локусам применялась методика Хайдена с соавторами (Hayden *et al.*, 2002). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems) или на секвенаторе ALFexpress (Amersham Biosciences) в 6 % -м 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.

ДНК зонды. Повторяющаяся последовательность Spelt1 с длиной мономера 178 пн была выделена из *Ae. speltooides* и клонирована в плазмидный вектор pBluescript II SK + (Salina

et al., 2004). Повтор pAs1 (мономер 336 пн) был выделен из генома *Aegilops tauschii* Coss. (Rayburn, Gill, 1986) и клонирован в плазмиду pUC8. Последовательность pSc119.2 с длиной мономера 120 пн изолирована из генома *Secale cereale* L. и клонирована в плазмидный вектор pBR322 (Bedbrook *et al.*, 1980).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Проводилась в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina *et al.*, 2006b).

Результаты

Использование ДНК-маркеров для генотипирования гибридных форм злаков на примере линий *T. aestivum* с генетическим материалом *Ae. speltooides*. Две линии, 32/98w и Л592-2, различающиеся по способу получения и по морфофизиологическим характеристикам, были выбраны для оценки эффективности различных ДНК-маркеров при генотипировании гибридных форм пшеницы. Линия 32/98w в отличие от линии Л592-2 обладала устойчивостью к бурой ржавчине, а линия Л592-2 характеризовалась высокой продуктивностью и качеством зерна. У обеих линий были отмечены также такие признаки, характерные для *Ae. speltooides* и отсутствующие у выбранного для скрещивания сорта пшеницы, как наличие антоциановой пигментации и безвосковый колос (Лапочкина, 1999; Salina *et al.*, 2001).

На первом этапе линии 32/98w и Л592-2 были изучены методом флуоресцентной *in situ* гибридизации с несколькими мечеными зондами: Spelt1, pAs1, pSc119.2. Повторы Spelt1 – это специфичные для генома *Ae. speltooides* субтеломерные последовательности ДНК (Salina *et al.*, 2006b). Высокая копияность Spelt1 и локализация на большинстве хромосомных плеч *Ae. speltooides* позволяют быстро выявлять участки интрогрессии хромосом *Ae. speltooides* в гибридных линиях. Результаты гибридизации *in situ* представлены на рис. 1. Линия Л592-2, так же, как и линия 32/98w, характеризуется присутствием двух блоков повтора Spelt1 на гаплоидный геном, локализованных на разных хромосомах. У обеих линий один блок Spelt1 расположен на хромосоме 7S, а второй маркирует терминальную транслокацию в коротком

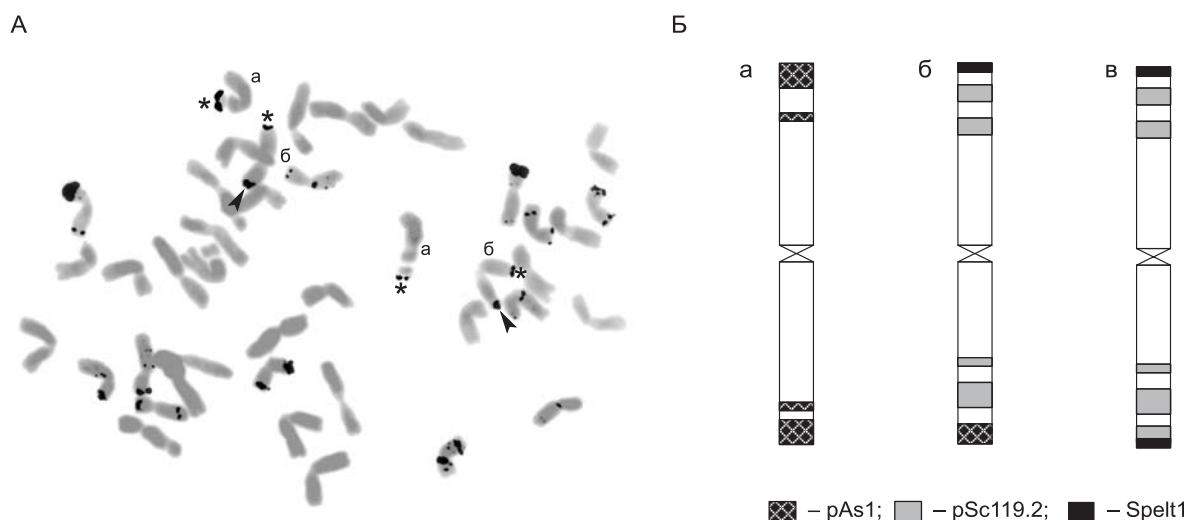


Рис. 1. Анализ линий мягкой пшеницы Л592-2 и 32/98w с генетическим материалом *Ae. speltoides* с помощью FISH.

А – результаты FISH со Spelt1 и pAs1 на препарате метафазных хромосом линии 32/98w: а – хромосома 1SS-1BS-1BL; б – хромосома 7SS-7SL-7DL. Звездочками отмечены места локализации зонда Spelt1, стрелками – сайты повтора pAs1 на транслоцированной хромосоме 7SS-7SL-7DL.

Б – идеограмма, демонстрирующая распределение проб Spelt1, pSc119.2 и pAs1: а – на хромосоме 7D *T. aestivum* сорта Родина; б – на транслоцированной хромосоме 7SS-7SL-7DL интрогрессивных линий и в – на хромосоме 7S *Ae. speltoides* K-389.

плече хромосомы 1B (рис. 1, а). Результаты гибридизации хромосом линий 32/98w и Л592-2 одновременно с двумя зондами Spelt1/pSc119.2 свидетельствовали о замещении хромосомы 7D на хромосому 7S. Однако использование в гибридизации одновременно зондов Spelt1 и pAs1 позволило сделать вывод о неполном замещении хромосомы 7D на хромосому 7S у этих линий (рис. 1, б), так как на длинном плече хромосомы 7S отсутствует блок повтора Spelt1, но присутствует повтор pAs1, маркирующий терминальный участок хромосомы 7D.

При создании линий от скрещивания *T. aestivum* × *Ae. speltoides* возможны различные транслокационные и делеционные процессы, приводящие к изменению структуры хромосомы, что может привести к ошибкам при ее идентификации. Для уточнения характера замещения по седьмой группе хромосом у линий 32/98w и Л592-2 был проведен SSR-анализ с использованием соответствующих маркеров: для хромосомы 7A: *Xgwm* – 233, 471, 681, 834, 130, 60, 573, 260, 282, 63, 332, 984, 750; для хромосомы 7B: *Xgwm* – 961, 263, 569, 573, 46, 1054, 897, 963, 274, 984, 146; для хромосомы 7D: *Xgwm* – 44, 111, 437, 428,

37; для хромосомы 7S: *Xgpw1054*. Результаты SSR-анализа для маркеров 7D/7S представлены в табл. 1. При амплификации маркеров у обеих родительских форм исчезновение ПЦР-продукта мягкой пшеницы и появление фрагментов амплификации, характерных для *Ae. speltoides*, как в случае маркеров *Xgwm428* и *Xgpw1101* (табл. 1), указывают на замещение хромосомы пшеницы или ее участка. В случае амплификации маркера только у одного из родителей отсутствие ПЦР-продукта у интрогрессивных линий указывает на делецию или замещение данного фрагмента хромосомы мягкой пшеницы. Поскольку цитологическими методами хромосомные делеции у линий 32/98w и Л592-2 не были выявлены, отсутствие амплификации маркеров хромосомы 7D, характерных для сорта Родина, указывает на замещение хромосомы 7D на хромосому *Ae. speltoides* в этих линиях (табл. 1). В связи с тем что на концевых участках хромосом *Ae. speltoides* SSR-маркеры пока не картированы (Dobrovolskaya *et al.*, 2007), выявлять транслокации в этих районах с помощью данной группы маркеров затруднительно. По этой же причине с помощью SSR-анализа не удалось

Таблица 1

SSR-анализ линии Л592-2 с помощью маркеров, локализованных на хромосомах 7D и 7S

Маркер	Локализация	Длина фрагментов амплификации (пн)		
		Родина	<i>Ae. speltoides</i> *	Л592-2
<i>Xgwm44</i>	7DS	179	0	0
<i>Xgwm111</i>	7Dcentr	209	0	0
<i>Xgwm437</i>	7DL	116	0	0
<i>Xgwm428</i>	7DL	129	106, 192	106
<i>Xgwm37</i>	7DL	159	0, 135	0
<i>Xgpw1101</i>	7SL	183, 186	181, 203	181, 188

* Длина аллелей маркеров хромосомы 7S *Ae. speltoides* выделена жирным шрифтом.

охарактеризовать все участки транслокаций, выявляемые при гибридизации зонда Spelt1 на хромосомах интрогрессивных линий 32/98w и Л592-2 (рис. 1, а).

Таким образом, для оценки характера интрогрессии у линий, полученных при отдаленной гибридизации злаков, необходимо использование различных методических подходов и разных классов молекулярных маркеров.

SSR-маркеры как инструмент отбора генотипов с заданной геномной структурой. Ранее при SSR-анализе 24 интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *T. timopheevii*, устойчивых к листовой ржавчине, нами было выявлено от 2 до 8 фрагментов хромосом *T. timopheevii* в составе гибридного генома. Участки интрогрессии были обнаружены в следующих хромосомах: 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 3B, 5A, 5B, 6B. Множественный характер интрогрессии практически не позволял изучить влияние индивидуальных локусов *T. timopheevii* на формирование различных количественных признаков мягкой пшеницы. Мы использовали набор SSR-маркеров, локализованных в областях выявленных интрогрессий, для контроля создания линий мягкой пшеницы, содержащих единичные вставки генетического материала *T. timopheevii*.

Для этой цели из коллекции интрогрессивных линий были взяты линии 744 и 832 с высоким содержанием генетического материала *T. timopheevii*. Линии созданы на основе сорта мягкой пшеницы Саратовская 29, но различаются между собой протяженностью и хромосомной локализацией фрагментов интрогрессии. Так,

линия 744 содержит транслокации и/или замещения по хромосомам 1A, 2A, 3BL, 5AL, 5BL, 6B, а линия 832 – по хромосомам 1A, 1BL, 2AS, 2B, 3AL, 5AL, 5BL, 6BL (Леонова и др., 2002). Выбранные линии были скрещены с сортом Саратовская 29, затем двукратно им беккроссированы, и 75 растений BC₂F₁ генотипированы микросателлитными маркерами. Всего было использовано 75 полиморфных *Xgwm* маркеров, картированных на хромосомах *T. aestivum* и *T. timopheevii*, вовлеченных в рекомбинационные процессы при создании исходных гибридных линий (Леонова и др., 2002). По данным SSR-анализа из потомства BC₂F₁ были отобраны растения, содержащие следующие комбинации хромосом с интрогрессиями: 1) 1A, 2A, 5B, 6B; 2) 1A, 2A, 2B; 3) 1A, 2A, 2B, 5A; 4) 1A, 1B, 2A, 2B; 5) 1A, 2A, 2B, 5B, 6B; 6) 1B, 2B, 5B, 6B, включая хромосомы 5B и 2A, несущие локусы устойчивости к листовой ржавчине *QLr.icg-5B* и *QLr.icg-2A T. timopheevii* (Леонова и др., 2008). Не было обнаружено гибридных растений, содержащих один или два фрагмента генома *T. timopheevii*, так как выделение таких генотипов уже на стадии BC₂ требует значительно более представительной выборки растений. Также в процессе возвратного скрещивания были утеряны небольшие интрогрессии в хромосомах 3A, 3B, выявленные по 1–2 маркерам.

Потомство отобранных гибридных растений было использовано для проведения третьего беккросса и последующего самоопыления. Для генотипирования 178 растений BC₃F₃ было использовано 45 микросателлитных *Xgwm* и *Xgpw* маркеров с известной хромосомной ло-

Таблица 2

Список микросателлитных маркеров (*Xgwm* и *Xgprw*), использованных для генотипирования растений BC_3F_3 популяции линий *T. aestivum* с генетическим материалом *T. timopheevii*

Хромосома	Маркеры <i>Xgwm</i>	Маркеры <i>Xgprw</i>
1A	33, 99, 164, 633, 691, 750, 752, 1104, 1097, 148, 1233	7072, 7258a
1BL	18, 153, 818	7258b
2A	95, 312, 372, 726, 526, 830, 846, 1151, 1198, 1256	7501a
2B	120, 257, 630, 785, 1027, 1048	1109, 7501b
5BL	408, 499, 814, 1054, 1257	
6B	361, 518, 626, 785, 889, 1233	

кализацией у *T. aestivum* и *T. timopheevii* – от 4 до 12 маркеров на хромосому (табл. 2). Число интрогрессий в потомстве гибридных растений третьего беккросса существенно сократилось (до 1–4 на растение) по сравнению с гибридами BC_2F_1 , при этом 5 растений из 178 потеряли генетический материал *T. timopheevii* в результате беккроссирования. Анализ гибридных растений BC_3F_3 показал присутствие вставок на хромосомах 1A, 1BL, 2A, 2B, 5BL и 6B. Не было обнаружено растений, имеющих фрагменты интрогрессии в хромосоме 5A. У растений BC_3F_3 выявлены следующие комбинации хромосом с интрогрессиями: 1) 2A; 2) 2B; 3) 5B; 4) 6B; 5) 1A, 5B; 6) 2A, 2B; 7) 2A, 5B; 8) 2B, 6B; 9) 1A, 2A, 2B; 10) 1A, 2A, 5B; 11) 1A, 2B, 5B; 12) 1B, 2A, 2B; 13) 2A, 2B, 5B; 14) 1A, 2A, 2B, 5B. Всего было выявлено моноинсерционных растений, т. е. содержащих только одну вставку на геном: по хромосоме 1A – 11, по 2A – 2, по 2B – 13, по 2BL – 6, по 5BL – 7, по 6B – 3. Следует отметить, что гомеологичные хромосомы 1A/1A^t, 2A/2A^t, 2B/2G, 5B/5G, 6B/6G в процессе эволюции не подвергались существенным перестройкам (Salina *et al.*, 2006a). В связи с этим следует ожидать нормального прохождения рекомбинационных процессов между ними и как следствие – различия по длине интрогрессивных фрагментов внутри одной серии (по одной хромосоме) моноинсерционных растений.

Большинство BC_3F_3 гибридов содержит 2 или 3 фрагмента генетического материала *T. timopheevii* – 44,4 и 21,4 % соответственно (табл. 3). Достаточно высок процент растений, несущих одиночные вставки – 24,7 %.

Учитывая, что при анализе потомств BC_2 растений с 1 и 2 вставками выявлено не было, а растения BC_3 содержали от 1 до 4 интрогрессий от *T. timopheevii*, следует считать, что оптимальной стадией для проведения микросателлитного анализа с целью отбора моноинсерционных растений из потомства гибридов *T. aestivum* и *T. timopheevii* с множественными фрагментами интрогрессии является потомство третьего беккросса.

Обсуждение

Фенотипическая оценка гибридов мягкой пшеницы позволяет выявлять линии, в которых присутствует генетический материал от родителя-донора. Так, в потомстве от скрещивания *T. aestivum* × *T. timopheevii* были отобраны линии с морфологическими и физиологическими признаками, характерными для *T. timopheevii*,

Таблица 3

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

Число фрагментов <i>T. timopheevii</i> в геноме	Растения со вставкой (от общего числа изученных растений), %	Число растений
1	24,7	44
2	44,4	79
3	21,4	38
4	6,7	12
0	2,8	5
		Всего: 178

при этом основной акцент был сделан на устойчивость к бурой ржавчине (Budashkina, 1988). Признаки, характерные для *Ae. speltooides*, были отмечены при анализе линий, полученных от скрещивания *T. aestivum* × *Ae. speltooides*. Некоторые из них обладали устойчивостью к бурой ржавчине, например линия 32/98w, или мучнистой росе, или к обоим патогенам одновременно. Часто у интрогрессивных линий, в том числе у линий 32/98w и Л592-2, выявлялась антоциановая окраска пыльников и стебля, характерная для *Ae. speltooides*, родителя-донора (Лапочкина, 1999; Salina *et al.*, 2001).

Для картирования и изучения влияния генов, интрогрессированных от донора, на формирование количественных хозяйственно ценных признаков у мягкой пшеницы необходимо провести оценку локализации и протяженности интрогрессированных фрагментов. Ранее неоднократно было показано, что SSR-маркеры являются удобным инструментом для оценки характера интрогрессии у гибридных форм пшеницы (Леонова и др., 2002). Однако использование данного класса маркеров при анализе линий 32/98w и Л592-2 показало, что выявляются не все фрагменты хромосом *Ae. speltooides*, интрогрессированные в геном мягкой пшеницы. Так, в обеих линиях при гибридизации субтеломерного зонда Spelt1, специфичного для *Ae. speltooides*, выявляются два участка интрогрессии на гаплоидный геном. Причем в случае хромосом седьмой группы с помощью комбинации различных зондов показана транслокация 7SS·7SL-7DL. SSR-маркерами был выявлен только один участок интрогрессии, который детектируется как замещение 7S/7D. Транслокация 7SS·7SL-7DL не была обнаружена в связи с тем что SSR-маркеры не картированы в концевых районах изучаемых хромосом. По этой же причине SSR-анализ не выявил терминальную транслокацию 1SS-1BS-1BL, обнаруженную в обеих линиях в результате *in situ* гибридизации. Несмотря на вышеуказанные недостатки, следует отметить, что молекулярно-генетический подход с использованием SSR-маркеров является базовым инструментом анализа гибридов в сочетании с методами цитологического анализа.

Обращает на себя внимание тот факт, что используемые молекулярно-цитологические и молекулярно-генетические подходы не выявили

различий по геномному составу между линиями Л592-2 и 32/98w. В обеих линиях обнаружены транслокации 7SS·7SL-7DL и 1SS-1BS-1BL. С транслокацией 7SS·7SL-7DL связано появление у обеих линий антоциановой пигментации пыльников и стебля, так как показано, что гены, контролирующие проявление данных признаков, расположены в коротком плече седьмой гомеологической группы хромосом (см. обзор Khlestkina *et al.*, 2008). Предполагают, что на хромосоме 7S расположен ген-ингибитор воскового налета (Пухальский и др., 1999), что может объяснить его отсутствие на колосе у линий Л592-2 и 32/98w. Пока не ясно, как можно объяснить выявляемые различия между линиями по ряду признаков, а именно: по устойчивости к бурой ржавчине, показателям продуктивности и качеству зерна. Возможно, это связано с различной протяженностью участков хромосомы 1S *Ae. speltooides*, транслоцированных в хромосому 1B у этих линий.

В последние годы все больше внимания уделяется использованию ДНК-маркеров в селекционных процессах для быстрого и эффективного отбора нужных генотипов растений. На преимущества использования молекулярных маркеров в селекции (marker assisted selection – MAS) указывалось давно (Tanksley *et al.*, 1989). Однако работы по этой теме стали появляться только в последние годы, причем в основном направленные на отбор нужных генотипов, полученных от внутривидового скрещивания (Kuchel *et al.*, 2007; Rae *et al.*, 2007). Особенностью проводимого нами исследования было применение MAS для отбора целевых генотипов из линий, полученных от межвидового скрещивания, а именно от скрещивания *T. aestivum* с *T. timopheevii*. Взятые в анализ линии 744 и 832 отличались множественным характером интрогрессии. Необходимо было создать на их основе коллекцию стабильных моноинсерционных линий для изучения влияния гомеологических локусов на формирование количественных признаков пшеницы, на устойчивость к биотическим и абиотическим факторам внешней среды. В настоящий момент нет единой схемы, рекомендованной для MAS. В нашем случае по результатам оценки числа фрагментов интрогрессии у растений второго и третьего беккрасса (табл. 3) можно сказать,

что оптимальной стадией SSR-анализа и отбора моноинсерционных линий из гибридных линий со множественными вставками является потомство третьего беккрасса. Хотя в случае направленности отбора на уменьшение размера встроенного фрагмента применение SSR-маркеров желательнее для растений BC₁ (Salina *et al.*, 2003). Также следует учесть и тот факт, что для создания моноинсерционных линий по субтеломерным транслокациям необходимо подключать в анализ зонды, маркирующие данную область. Например, зонд Spelt1 является перспективным при проведении MAS с целью отбора подобных линий от скрещивания *T. aestivum* с *Ae. speltoides*.

Использование молекулярных маркеров для отбора растений позволяет значительно сократить время получения моноинсерционных линий. Кроме того, применение маркеров позволяет получать линии по локусам, не проявляющимся фенотипически в гибридном геноме. Создание и изучение моноинсерционных линий по различным участкам генома может являться важной ступенью в понимании процессов взаимодействия гомеоаллельных генов и эволюции аллополиплоидного ядра.

Благодарности

Авторы статьи признательны И.Ф. Лапочкиной за предоставление интрогрессивных линий мягкой пшеницы 32/98w и Л592-2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексного интеграционного проекта СО РАН №5.8, Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 08-04-12064) и Федеральной целевой программы РФ (Госконтракт 02.512.11.2256).

Литература

Лапочкина И.Ф. Реконструкция генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) при отдаленной гибридизации (с использованием *Aegilops* L. и других видов): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Немчиновка: НИИСХ ЦРНЗ, 1999. 50 с.

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* // Гене-

тика. 2002. Т. 38. С. 1648–1655.

Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н.П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующей устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине // Генетика. 2008. Т. 44. № 12. С. 1652–1659.

Пухальский В.А., Иорданская И.В., Бадаева Е.Д. и др. Генетический анализ признака «отсутствие воскового налета на колосе» у линии мягкой пшеницы // Генетика. 1999. Т. 35. С. 1223–1227.

Хлесткина Е.К., Салина Е.А. SNP-маркеры: методы анализа, способы разработки и сравнительная характеристика на примере мягкой пшеницы // Генетика. 2006. Т. 42. С. 725–736.

Adonina I.G., Salina E.A., Efremova T.T. *et al.* The study of introgressive lines of *Triticum aestivum* × *Aegilops speltoides* by *in situ* and SSR analyses // Plant Breeding. 2004. V. 123. P. 220–224.

Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M. *et al.* A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale species* // Cell. 1980. V. 19. P. 545–560.

Budashkina E.B. Cytogenetic study of introgressive disease resistant common wheat lines // Tag Ber. Acad. Landwirtsch.-Wiss. DDR, 1988. 206. P. 209–221.

de Vienne D. Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology. Enfield, NH, USA: Sci. Publ. Inc., 2003. 239 p.

Dobrovolskaya O., Salina E., Bernard M. *et al.* Map-based comparative analysis of the S, G, and B genomes of Triticeae species // Abstract Book of the 6th Plant Genomics European Meeting. Puerto de la Cruz, Tenerife, 3–6 October 2007. Puerto de la Cruz: P03. 2.

Friebe B., Yiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.

Jiang J., Gill B.S. Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: the first 10 years // Genome. 1994. V. 37. № 5. P. 717–725.

Hayden M., Good G., Sharp P.J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. P. 129–133.

Khlestkina E.K., Roder M.S., Pshenichnikova T.A. *et al.* Genes for anthocyanin pigmentation in wheat: review and microsatellite-based mapping // Chromosome Mapping Research Developments / Eds J.F. Verrity, L.E. Abbingdon. N.Y.: NOVA Science Publ., Inc, USA, 2008. P. 155–175.

Kuchel H., Fox R., Reinheimer J. *et al.* The successful application of a marker-assisted wheat breeding strategy // Mol. Breeding. 2007. V. 20. P. 295–308.

McIntosh R.A., Yamazak Y., Devos K.M. *et al.*

- Catalogue of gene symbols for wheat. www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/. 2003.
- Morgante M., Olivieri A.M. PCR – amplified microsatellites as markers in plant genetics // *Plant J.* 1993. V. 3. № 1. P. 175–182.
- Mukai Y. Multicolor fluorescence *in situ* hybridization: a new strategy for plants: their merits and pitfalls // *Methods in Genome Analysis in Plants*. Boca Raton: CRC Press, 1996. P. 181–194.
- Pestsova E., Ganal M.W., Roeder M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat // *Genome*. 2000. V. 43. P. 689–697.
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 91. P. 1001–1007.
- Rae S.J., Macaulay M., Ramsay L. *et al.* Molecular barley breeding // *Euphytica*. 2007. V. 158. P. 295–303.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa* // *Plant. Mol. Biol. Rep.* 1986. V. 4. P. 102–109.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K. *et al.* A Microsatellite map of wheat // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 2007–2023.
- Salina E.A., Adonina I.G., Efremova T.T. *et al.* The genome-specific subtelomeric repeats for study of introgressive lines *T. aestivum* × *Ae. speltoides* // *EWAC Newslett.* 2001. P. 161–164.
- Salina E.A., Dobrovolskaya O.B., Efremova T.T. *et al.* Microsatellite monitoring of recombination around of *Vrn-B1* locus of wheat during early backcross breeding // *Plant Breeding*. 2003. V. 122. P. 116–110.
- Salina E., Adonina I., Vatolina T. *et al.* A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch and related species // *Genetica*. 2004. V. 122. P. 227–237.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T. *et al.* Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization // *Funct. Integr. Genomics*. 2006a. V. 6. P. 71–80.
- 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.
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat // *Plant Breeding*. 2003. V. 122. P. 396–400.
- Sourdille P., Guyomarc'h H., Baron C. *et al.* Improvement of the genetic maps of wheat using new microsatellite markers // *Plant and animal genome IX, final abstracts guide*. 2001. Foster City, Calif: Applied Biosystems Press, 2001. P. 167.
- Tanksley S.D., Young N.D., Paterson A.H. *et al.* RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science // *Biotechnology*. 1989. V. 7. P. 257–264.
- Zhang L.Y., Bernard M., Leroy P. *et al.* High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 677–687.

**DNA-MARKERS FOR GENOTYPING OF COMMON WHEAT
(*TRITICUM AESTIVUM* L.) LINES WITH TRANSLOCATIONS
FROM *AEGILOPS SPELTOIDES* TAUSCH
AND *TRITICUM TIMOPHEEVII* ZHUK.**

E.A. Salina, E.M. Egorova, I.G. Adonina, O.B. Dobrovolskaya, E.B. Budashkina, I.N. Leonova

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: salina@bionet.nsc.ru

For decision of different genetic tasks more careful choice of DNA-markers is required. Microsatellite (SSR) markers and Spelt1, pAs1, pSc119.2 were used for genotyping of *T. aestivum* × *Ae. speltoides* and *T. aestivum* × *T. timopheevii* hybrids and for the monitoring of transfer of an alien genetic material. The efficiency of complex use of various types of molecular markers was demonstrated for the analysis of *T. aestivum* × *Ae. speltoides* hybrids, as an example. Probe Spelt1 is recommended for the control of introgressions of *Ae. speltoides* genetic material in the progeny. It has been shown that application of SSR-markers significantly reduces time of development of *T. aestivum* × *T. timopheevii* monoinserted lines (containing only one introgression on a genome). The progeny of the third backcross is a more optimal stage for selection of monoinserted lines by means of SSR-markers.