

Создание короткостебельных линий с вавилоидным типом колоса и их цитогенетическая характеристика

А.Дж. Алиева¹, С.П. Мехтиева¹, Р.К. Керимова²

¹ Институт генетических ресурсов Национальной академии наук Азербайджана, Баку, Азербайджан; ² Бакинский государственный медицинский университет, Баку, Азербайджан

Гибридизация между гексаплоидными видами пшеницы (*Triticum* L.) и тритикале (*x Triticosecale* Wittm.) широко используется в фундаментальных исследованиях по генетике и селекции для изучения взаимной интрогрессии генетической информации в исходные виды. Исходя из того, что гексаплоидное тритикале, полученное в Институте генетических ресурсов (ИГР НАН Азербайджана), обладает широким формообразовательным потенциалом, мы задались целью использовать его в скрещиваниях с мягкой пшеницей. В процессе формообразования в гибридных популяциях второго и третьего поколений, полученных от скрещивания гексаплоидного тритикале с различными сортами (Опал и Чайниз Спринг) и разновидностью мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* var. *velutinum*), выщеплялись растения с пшеничным, ржаным, промежуточным и тритикальным типом колоса. Начиная с третьего поколения среди гибридных растений были выделены константные формы короткостебельных растений с ветвистыми колосьями вавилоидного типа. Несмотря на нестабильность и наличие множества нарушений мейоза у растений первого поколения, в последующих поколениях у гибридных растений, в том числе и у ветвистых морфотипов, наблюдалась как мейотическая, так и морфологическая стабильность. Молекулярно-цитогенетическими методами FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и GISH (genome *in situ* hybridization) охарактеризован хромосомный состав одной из этих линий (378/3SD), и она идентифицирована как замещенная линия. Хромосомная паспортизация таких линий позволит использовать их в качестве моделей для генетических исследований, в том числе для изучения признака вавилоидности колоса, а также обеспечит им дальнейшее применение в генетических исследованиях по заданным свойствам.

Ключевые слова: *Triticum aestivum* L., гексаплоидное тритикале, формообразование, вавилоидный тип колоса, мейоз, FISH, GISH, замещенная линия.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Алиева А.Дж., Мехтиева С.П., Керимова Р.К. Создание короткостебельных линий с вавилоидным типом колоса и их цитогенетическая характеристика. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015; 19(1):91-96.

HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Aliyeva A.J., Mehdiyeva S.P., Kerimova R.K. Raise of short-stemmed vaviloid branched spike lines and their cytogenetics. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(1):91-96.

УДК 633.11:631.527

Поступила в редакцию 24.10.2014 г.

Принята к публикации 29.01.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

 e-mail: arzu2007@mail.ru

Raise of short-stemmed vaviloid branched spike lines and their cytogenetics

A.J. Aliyeva¹, S.P. Mehdiyeva¹, R.K. Kerimova²

¹ Genetic Resources Institute of ANAS, Baku, Azerbaijan;

² Baku State Medical University, Baku, Azerbaijan

Hybridization between hexaploid species of wheat (*Triticum* L.) and triticale (*x Triticosecale* Wittm.) is used widely in genetic research and breeding when studying mutual introgressions of genetic material to original species. As far as the hexaploid triticale obtained in our Institute possessed a strong potential of morphogenesis, we decided to use it in crosses with bread wheat. During the process of morphogenesis in hybrid population of the second and third generations derived from the crosses between hexaploid triticale with different bread wheat cultivars (Opal and Chinese Spring) and variety (*Triticum aestivum* var. *velutinum*), plants with wheat, rye, intermediate, and triticale-like spike types were noted. Starting from the third generation, constant short-stemmed vaviloid branched spike plants were isolated among populations under study. Despite instability and numerous meiotic aberrations observed in the first generation of plants, including branched-spike ones, the subsequent progeny demonstrated meiotic and morphological stability. The chromosome composition of one of the lines (378/3SD) was characterized by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and genome *in situ* hybridization (GISH), and it was identified as a substitution line. Chromosomal identification of such lines will allow their use in genetic studies concerning specified traits, in particular, the vaviloid branched spike.

Key words: *Triticum aestivum* L., hexaploid triticale, morphogenesis, vaviloid type of spike, meiosis, FISH, GISH, substitution line.

Многими исследователями при отдаленной гибридизации отмечены случаи появления ветвистоколосых растений пшеницы (Mac Key, 1966; Филатенко, 1968; Цицин, 1981; Алиева, 2009; Алиева, Аминов, 2013). Появление таких «вавилоидов» наблюдалось также при воздействии мутагенами на мягкую (*T. aestivum* L.) и твердую пшеницы (*T. durum* Desf.) и на *T. persicum* Vav. ex Zhuk.

Некоторые исследователи (Фляксбергер, 1935; Ту-манян, 1935) высказывали мнение о происхождении *T. vavilovii* Jakubz. в результате естественной мутации от спельтоидной формы мягкой пшеницы или мутации, произошедшей после спонтанной гибридизации тетраплоидной пшеницы (предположительно, *T. dicoccum* Schuebl.) с мягкой пшеницей (Дорофеев, 1968). Таким образом, было неслучайным появление среди гибридных комбинаций *T. durum* × *T. aestivum* легко обмолачиваемых константных «вавилоидов», описанных как *T. durum* subsp. *unicum* (Лукьяненко, Костин, 1979). Позднее формы, полученные от спонтанной гибридизации твердой пшеницы с мягкой и подвергшиеся мутациям, были отнесены к разновидностям *T. vavilovii* Jakubz.

В нашем эксперименте короткостебельные (карликовые) растения с вавилоидным типом колосьев выщеплялись почти во всех гибридных популяциях, полученных при гибридизации гексаплоидного тритикале (× *Triticosecale* Wittm., AABBRR) с мягкой пшеницей (*Triticum aestivum* L., AABBDD), и на их основе выделены линии VAV-1, VAV-2 и 378/3SD.

Поскольку в литературе нет данных о молекулярно-цитогенетических особенностях таких вавилоидных форм, было интересно изучить их именно с этой точки зрения. Поэтому данная работа посвящена созданию константных короткостебельных вавилоидных растений и молекулярно-цитогенетическому анализу линии 378/3SD с указанной морфологией колоса.

Материалы и методы

Работа выполнена на экспериментально-опытном участке Института генетических ресурсов НАН Азербайджана. Материалом для исследования послужили гибридные популяции, полученные от скрещивания гексаплоидного тритикале – *Triticale* (6x) с сортами мягкой пшеницы Opal (Германия) и Chinese Spring (Китай), а также разновидностью мягкой пшеницы – *Triticum aestivum* L. var. *velutinum*.

В проведении исследования наряду с гибридологическим методом (Горин и др., 1968) были использованы классический мейотический анализ и современные молекулярно-цитогенетические – FISH (fluorescence *in situ* hybridization) и GISH (genomic *in situ* hybridization) анализы. Конъюгацию хромосом в мейозе у короткостебельных вавилоидных линий изучали по общепринятой методике (Паушева, 1988) с некоторыми модификациями. Анализ мейоза проводили на временных ацето-

карминовых давленных препаратах, цитогенетические наблюдения проводили с помощью микроскопа «Leitz Orthoplan» (Германия).

Молекулярно-цитогенетический анализ проводили на давленных препаратах клеток апикальной меристемы кончика корешков, приготовленных в соответствии с методикой (Jiang et al., 1994). FISH-анализ проводился согласно методике (Linc et al., 1999) с использованием зондов pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980), Afa-семейства (Nagaki et al., 1995) и pTa71 (Gerlach, Bedbrook, 1979). pSc119.2, Afa-семейства и pTa71 метили биотином – 16-dUTP, дигоксигенином – 11-dUTP и смесью (1 : 1) этих двух антител соответственно. Для детекции проб pSc119.2 и Afa-семейства использовали флюорохромы стрептовидин-FITC и родамин соответственно. GISH проводили согласно методике (Reader et al., 1994) с незначительными модификациями по Molnár-Láng с соавт. (2000). Геномную ДНК *S. cereale* L. метили с помощью метода ник-трансляции. Препараты анализировали с использованием фильтров № 10 для FITC, № 15 для родамина, № 01 для DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) и с помощью программного обеспечения ImagePro Plus 4.0 Software (Media Cybernetics Silver Spring, MA, USA) на эпифлюоресцентном микроскопе «Zeiss Axioskop-2». Изображения регистрировались Spot CCD-камерой (Diagnostic Instruments, Sterling Heights).

Результаты и обсуждение

Использованное в работе *Triticale* (6x) было получено путем скрещивания амфидиплоида *T. durum* Desf. × *Ae. tauschii* Coss (AABBDD, $2n = 6x = 42$) с рожью *S. cereale* subsp. *segetale* Zhuk. (RR, $2n = 2x = 14$). В F₁ были получены амфигаплоидные гибриды с геномной формулой ABDR ($n = 4x = 28$). В F₂ исследование мейоза показало, что одно из растений является амфидиплоидом ($2n = 8x = 56$) и имеет геномную структуру AABBDDRR. Из этого амфидиплоида было получено только 3 растения. Два из них погибли, а третье имело 42 хромосомы, поэтому гибрид был назван неполным амфидиплоидом (НАД). В дальнейшем геномный состав НАД претерпел изменения. Проведенные анализы с использованием GISH показали, что хромосомы генома D полностью элиминировали, и этот образец в настоящее время является гексаплоидным тритикале с геномной формулой AABBRR (рис. 1).

Для передачи ржаного хроматина мягкой пшенице была проведена гибридизация между *Triticale* (6x) и сортами мягкой пшеницы Opal и Chinese Spring, а также разновидностью мягкой пшеницы var. *velutinum*, результаты скрещивания которых показаны в табл. 1.

Степень завязываемости семян в гибридных комбинациях между *Triticale* (6x) и тремя образцами мягкой пшеницы была низкой и варьировала между 20 и 29 %. Большинство гибридных зерен были морщинистыми и щуплыми. Гибридные растения F₁ морфологически

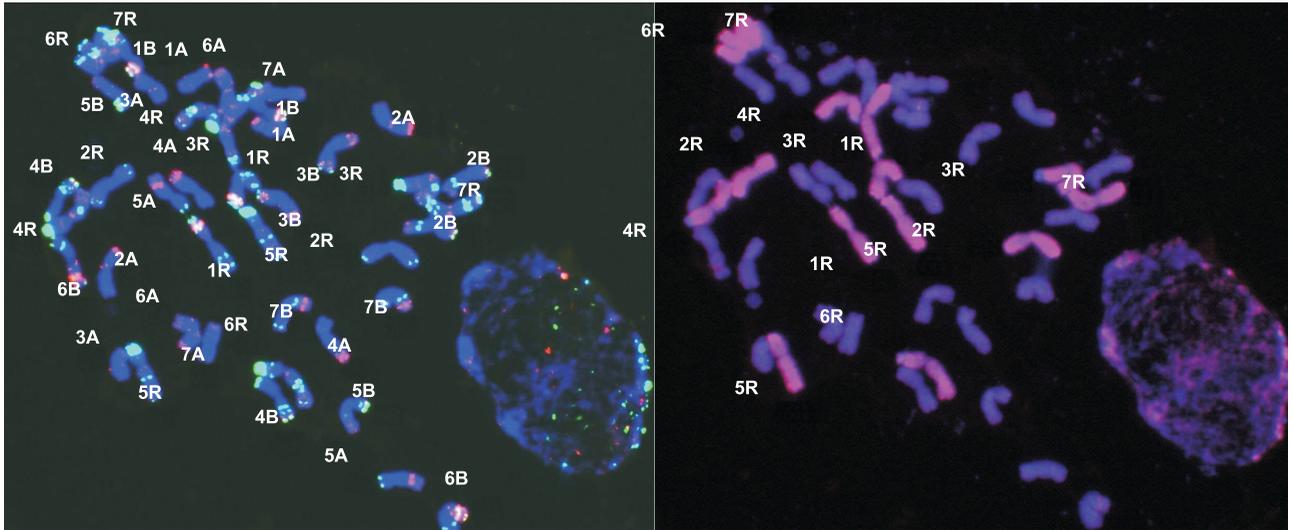


Рис. 1. Молекулярно-цитогенетические анализы генома НАД методами FISH (слева) и GISH (справа): элиминирование хромосом генома D и присутствие полного набора хромосом А, В и R геномов.

Таблица 1. Значения завязываемости и фертильности растений F₁ в трех гибридных комбинациях *Triticale* (6x) × *T. aestivum* L.

Комбинации	Число кастрированных цветков	Число гибридных зёрен	Завязываемость, %	Фертильность F ₁ , %
<i>Triticale</i> (6x) × cv. Opal	76	18	23,68	8,71
<i>Triticale</i> (6x) × var. <i>velutinum</i>	200	40	20,00	26,67
<i>Triticale</i> (6x) × cv. Chinese Spring	90	26	28,89	15,72

Таблица 2. Сравнительная характеристика поведения хромосом в мейозе гибридов F₁ *Triticale* (6x) × *T. aestivum* L. и стабильных линий (L) с колосом вавилоидного типа

Комбинации	МКП	Биваленты		Униваленты	Триваленты	Квадриваленты	Число хиазм	2n	
		закрытые	открытые						
<i>Triticale</i> (6x) × cv. Opal	F ₁	175	10,82 ± 0,60	1,94 ± 0,46	15,86 ± 1,02	0,21 ± 0,14	24,27 ± 0,86	42	
VAV-1	L	169	19,15 ± 0,42	1,26 ± 0,45	1,18 ± 0,32		39,56 ± 0,45	42	
<i>Triticale</i> (6x) × var. <i>velutinum</i>	F ₁	178	9,60 ± 0,27	2,90 ± 0,23	16,51 ± 0,34	0,04 ± 0,10	0,09 ± 0,12	22,46 ± 0,30	42
VAV-2	L	145	18,62 ± 0,29	1,92 ± 0,29	0,92 ± 0,34		39,21 ± 0,35	42	
<i>Triticale</i> (6x) × cv. Ch. Spring	F ₁	148	10,55 ± 0,63	2,02 ± 0,55	16,78 ± 1,21		0,02 ± 0,08	23,37 ± 1,05	42
378/3SD	L	103	17,19 ± 0,39	1,79 ± 0,22	2,74 ± 0,20	0,18 ± 0,14	0,19 ± 0,17	37,12 ± 0,41	42

были промежуточными между родительскими формами, и их фертильность варьировала между 8,7 и 26,7%. Также у гибридов F₁ был изучен процесс мейоза, данные которого приведены в табл. 2. Степень конъюгации хромосом у гибридов F₁ была низкой. Так, количество закрытых бивалентов на одну материнскую клетку пыльцы (МКП) составило в среднем 10–11, открытых бивалентов – 2, а унивалентов – 16–17 (рис. 2). В то же время у всех гибридов F₁ трех комбинаций в малом количестве наблю-

дались мультивалентные ассоциации в виде три- и квад- ривалентов. Частота образования хиазм варьировала от 22 до 24. Также с большой частотой наблюдались такие мейотические нарушения, как асинхронное деление, неравномерное распределение хромосом между полюсами, формирование диад и тетрад с микродрамами.

У гибридных комбинаций в F₂ и F₃ наблюдался широкий формообразовательный процесс с выщеплением более 100 морфотипов. По морфологии колоса



Рис. 2. Метафаза I в мейозе у гибрида F_1 *Triticale* (6x) × cv. Chinese Spring.



Рис. 3. Фракции с вавилоидным типом колосьев, наблюдающиеся при формообразовании в F_3 у гибридной комбинации *Triticale* (6x) × *T. aestivum* var. *velutinum*.



Рис. 4. Короткостебельная линия VAV-1 с вавилоидным типом колоса.

эти морфотипы были подразделены на 4 группы: пшеничный, ржаной, тритикальный и промежуточный. У группы с тритикальным морфотипом были обнаружены растения с вавилоидным типом колоса (рис. 3), которые в поздних поколениях были выделены в константные короткостебельные линии (VAV-1 (рис. 4), VAV-2 и 378/3SD). Исследование мейотического процесса у этих вавилоидных линий выявило значительное увеличение степени хромосомной конъюгации (табл. 2).

Для установления хромосомного состава геномов линия 378/3SD была исследована молекулярно-цитогенетическими методами (FISH и GISH). Результаты показали, что она является замещенной. Например, геномный состав линии 378/3SD включает 14 хромосом A (1A–7A), 12 хромосом B (2B–7B), 8 хромосом D (1D–3D, 6D) и 8 хромосом ржаного (1R, 4R, 5R, 7R) геномов (рис. 5). В этой линии между хромосомами пшеничного и ржаного геномов произошли следующие 4 межгеномных замещения: 1R(1B), 2D(2R), 3D(3R) и 6D(6R). Как видно из геномной конституции этих линий, только одно замещение наблюдалось между ржаным геномом и B геномом пшеницы, остальные были R/D замещениями.

Впервые спонтанное гомеологическое замещение пшеничной хромосомы 1B ржаной хромосомой 1R получено в 1930 г. в Германии в результате гибридизации сорта мягкой пшеницы с сортом ржи Petkus, но оно было обнаружено только в начале 1970-х гг. с открытием C-окрашивания хромосом. Позднее было выявлено свойство ржаной хромосомы 1R компенсировать гомеологичные ей хромосомы пшеницы 1A, 1B и 1D; были созданы линии с замещениями 1A/1R, 1B/1R и 1D/1R, несущие ряд полезных признаков (Ji et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Molnár-Láng et al., 2010; Zhou et al., 2012). Было обнаружено, что 2R(2D)-замещение приводит к изменениям ряда признаков у тритикале – к уменьшению высоты растения, длины колоса и вегетационного цикла растений, толерантности к высоким концентрациям NaCl, улучшению продуктивных качеств (Куркиев, 2008; Силкова и др., 2008; Lei et al., 2011).

Некоторыми исследователями, проводящими идентификацию и характеристику линий с 1R(1B)-замещениями, было отмечено маркирование данного замещения оригинальными аллелями секалинкодирующих локусов *Sec1* и *Sec2* (Моцный и др., 2009).

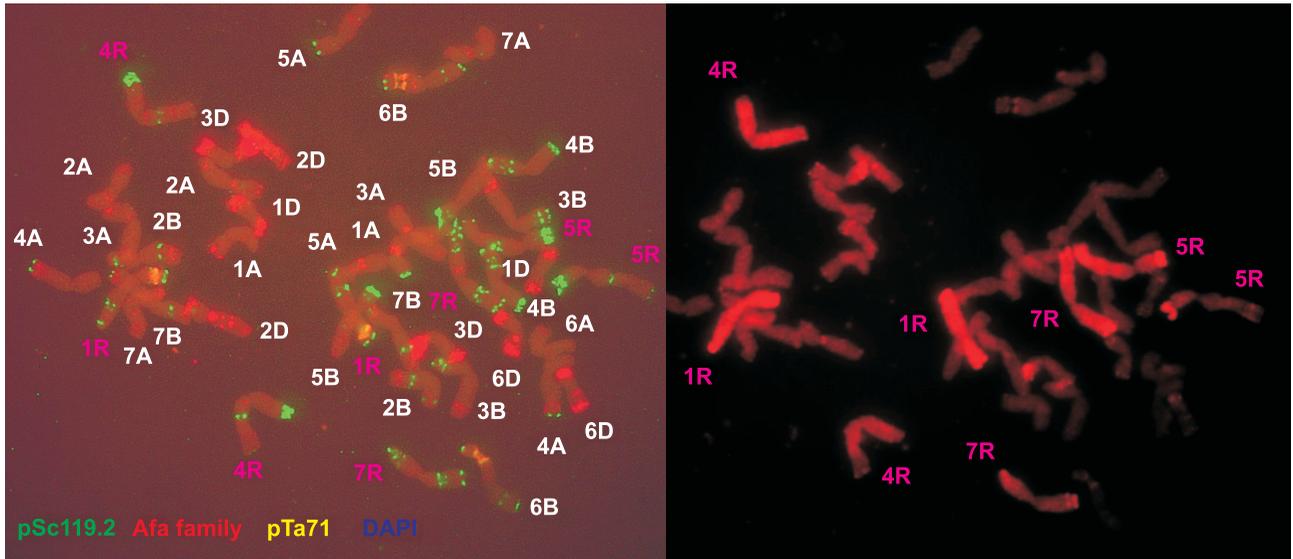


Рис. 5. Молекулярно-цитогенетические анализы генома линии 378/35D методами FISH (слева) и GISH (справа): межгеномные замещения 1R(1B), 2D(2R), 3D(3R) и 6D(6R).

Отмечены теломерно-субтеломерные и геномные перестройки в пшенично-ржаных замещенных и дисомно дополненных линиях (Alkhimova et al., 1999; Bento et al., 2010; Szakács, Molnár-Láng, 2010). При исследовании замещенных линий по хромосомам 2Н, 3Н, замещенной линии по телоцентрической хромосоме 6НС установлены большая генетическая стабильность дисомно дополненных линий по хромосомам 2Н и 3Н, но меньшая стабильность дисомно дополненных линий по хромосоме 1НС, полученных из гибридов при гибридизации местной озимой пшеницы Martonvásári 9kr1 с сортом двухрядного озимого ячменя сорта Igrí (Szakács, Molnár-Láng, 2007, 2010).

Таким образом, хромосомная паспортизация таких линий позволит использовать их в качестве моделей для генетических исследований, в том числе для изучения признака вавилоидности колоса, а также обеспечит им дальнейшее применение в генетических исследованиях по заданным свойствам.

Благодарности

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Фонда развития науки при Президенте Азербайджанской Республики – грант № EIF-2011-11(3)-82/52/3. Авторы выражают свою искреннюю признательность главному директору Центра сельскохозяйственных исследований при АН Венгрии доктору З. Бедо и всему рабочему персоналу лаборатории молекулярной цитогенетики в лице заведующей доктором М. Молнар-Ланг.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Алиева А.Дж. Источник нового типа ветвистоколосости у твердых пшениц. Докл. РАСХН. 2009;3:10-11.

- Алиева А.Дж., Аминов Н.Х. Влияние генома D пшеницы на проявление признака нового типа ветвистоколосости в гибридных популяциях линии 171ACS. Генетика. 2013;49(11):1284-1291.
- Горин А.П., Дунин М.С., Коновалов Ю.Б. Практикум по селекции и семеноводству полевых культур. М.: Колос, 1968.
- Дорофеев В.Ф. Спонтанные мутации как фактор формообразования пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1968;7:16-26.
- Куркиев К.У. Наследование высоты растения у гексаплоидных форм тритикале с R/D замещением. Генетика. 2008;44(9):1238-1245.
- Лукьяненко П.П., Костин В.В. Новые формы твердой пшеницы. Докл. ВАСХНИЛ. 1970;6:2-3.
- Мощный И.И., Файт В.И., Благодарова Е.М. Идентификация и характеристика 1R(1B) замещенных линий мягкой пшеницы. Цитология и генетика. 2009;43(3):26-35.
- Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Агропромиздат, 1988.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Передача генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы методом межгеномного замещения хромосом. Информационный вестник ВОГиС. 2008;12(4):654-661.
- Тумянц М.Г. Генофонд пшениц Армении. Тр. Арм. СХИ. 1935;1.
- Филатенко А.А. Межвидовая гибридизация в роде *Triticum* L.: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Л.: ВИР, 1968.
- Фляксберггер К.А. Пшеница. Культурная флора СССР. М.; Л.: Госиздат колх. и совх. лит.-ры, 1935.
- Цицин Н.В. Теория и практика отдаленной гибридизации. АН СССР. Гл. бот. сад. М.: Наука, 1981.
- Alkhimova A.G., Heslop-Harrison J.S., Shchapova A.I., Vershinin A.V. Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines. Chromosome Res. 1999;7:205-212. DOI: 10.1023/a:1009299300018
- Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560.
- Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticales to their elimination in wheat-rye addition lines. Theor. Appl. Genet. 2010;121:489-497. DOI: 10.1007/s00122-010-1325-6

- Carvalho A., Martín A., Heslop-Harrison J.S., Guedes-Pinto H., Lima-Brito J. Identification of the spontaneous 7BS/7RL intergenomic translocation in one F₁ multigeneric hybrid from the Triticeae tribe. *Plant Breeding*. 2009;128:105-108. DOI:10.1111/j.1439-0523.2008.01519.x
- Gerlach W.L., Bedbrook J.L. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley. *Nucl. Acids Res.* 1979;7:1869-1885.
- Ji J., Wang Zh., Sun J., Li J., Zhang X., Wang D., Zhang A. Identification of new T1BL.1RS translocation lines derived from wheat (*Triticum aestivum* L. cultivar «Xiaoyan No. 6») and rye hybridization. *Acta Physiol. Plant.* 2008;30:689-695. DOI: 10.1007/s11738-008-0167-1
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Chromosome painting of «Amigo» wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994;8:811-813.
- Lei M.P., Li G.R., Zhang S., Liu C., Yang Z. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat *Secale africanum* 2Ra(2D) substitution line for resistance to stripe rust. *J. Genet.* 2011;90(2): 283-287.
- Linc G., Friebe B.R., Kynast R.G., Molnár-Láng M., Köszei B., Sutka J., Gill B.S. Molecular cytogenetic analysis of *Aegilops cylindrica* Host. *Genome*. 1999;42:497-503.
- Mac Key J. Species relationship in *Triticum*. *Proc. 2nd Intern. Wheat Genet. Symp.*, 1963. *Hereditas Suppl.*, 1966;2:237-275.
- Molnár-Láng M., Cseh A., Szakács E., Molnár I. Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL.1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theor. Appl. Genet.* 2010;120(8):1535-1545. DOI: 10.1007/s00122-010-1274-0
- Molnár-Láng M., Linc G., Friebe B.R., Sutka J. Detection of wheat-barley translocations by genomic *in situ* hybridization in derivatives of hybrids multiplied *in vitro*. *Euphytica*. 2000;112: 117-123.
- Nagaki K., Tsujimoto H., Isono K., Sasakuma T. Molecular characterization of a tandem repeat, Afa family, and its distribution among *Triticeae*. *Genome*. 1995;38:479-486.
- Reader S.M., Abbo S., Purdie K.A., King I.P., Miller T.E. Direct labelling of plant chromosomes by rapid *in situ* hybridization. *Trends Genet.* 1994;10:265-266.
- Szakács E., Molnár-Láng M. Development and molecular cytogenetic identification of new winter wheat – winter barley («Martonvásári 9 kr1» – «Igr») disomic addition lines. *Genome*. 2007;50(1): 43-50. DOI: 10.1139/g06-134.
- Szakács É., Molnár-Láng M. Molecular cytogenetic evaluation of chromosome instability in *Triticum aestivum*–*Secale cereale* disomic addition lines. *J. Appl. Genet.* 2010;51:149-152. DOI: 10.1007/bf03195723
- Zhou J., Zhang H., Yang Z., Li G., Hu L., Lei M., Liu C., Zhang J., Ren Z. Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation triticale ZH-1 with multiple resistances to diseases. *Genet. Resour. Crop Ev.* 2012;59:1161-1168. DOI: 10.1007/s10722-011-9751-0