

УДК 577.21:576.311.347:575.222.73:633.1

ГЕТЕРО- И ГОМОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РАЙОНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК У ПОТОМКОВ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2012 г. Н.В. Трубачева¹, Л.А. Кравцова¹, Э.П. Девяткина¹, Т.Т. Ефремова¹,
М.Г. Синявская², В.К. Шумный^{1,3}, Л.А. Першина^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,

e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь;

³ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15 января 2012 г. Принята к публикации 25 января 2012 г.

Изучены особенности состояния 18S/5S митохондриального (мт) повтора и районов хлоропластной (хп) ДНК у аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму ячменя *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson и *H. vulgare* L., и у потомков гибридов, полученных от реципрокных скрещиваний мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. с рожью посевной *Secale cereale* L. Гетероплазматическое состояние 18S/5S мт-повтора, которое является следствием двуродительской передачи мтДНК, обнаружено у гибридов «рожь–пшеница» и наследуется потомками этих гибридов, несущих цитоплазму ржи. Впервые у злаков на примере аллоплазматических линий мягкой пшеницы обнаружено гетероплазматическое состояние хпДНК, сопряженное с гетероплазматическим состоянием 18S/5S мт-повтора. Установлено, что переход гетероплазматического состояния мтДНК, хпДНК и гомоплазматического состояния ячменного типа районов хпДНК в гомоплазматическое состояние пшеничного типа ассоциирован с полным восстановлением фертильности и окончательной элиминацией хромосом ячменя из вновь формирующегося ядерного генома мягкой пшеницы аллоплазматических линий.

Ключевые слова: аллоплазматические линии, реципрокные гибриды, ПЦР-ПДРФ, мтДНК, хпДНК, гетероплазмия, гомоплазмия.

Введение

Отдаленная гибридизация является важным фактором видообразования у покрытосеменных растений (Rieseberg, Willis, 2007) и способствует увеличению генетического разнообразия за счет переноса генов между видами (Zemetra *et al.*, 1998). В экспериментальных условиях скрещивания между разными видами используют для интрогрессии в геном культурных растений отдельных хромосом или их сегментов от других культурных видов или дикорастущих сорочичей с целью создания адаптивных и продуктивных форм для селекции (Miller *et al.*, 2011). Эффективность создания жизнеспособных и фертильных генотипов при отдаленной

гибридизации определяется результатами взаимодействия между чужеродными ядерными и цитоплазматическими геномами, функционирующими в одном организме.

Процессы взаимодействия ядерных и цитоплазматических геномов у растений гибридного происхождения усложняются тем, что при отдаленных скрещиваниях может происходить нарушение эволюционно закрепленного механизма материнской передачи ДНК органелл с заменой на отцовское или двуродительское наследование (Cipriani *et al.*, 1995; Hattori *et al.*, 2002; Hansen *et al.*, 2007; Weihe *et al.*, 2009). Двуродительское наследование приводит к гетероплазмии, которую определяют как наличие у индивидуального растения более одного

варианта хлоропластной (хп) или митохондриальной (мт) ДНК (Woloszynska, 2010). Результатом двуродительской передачи мтДНК при отдаленных скрещиваниях пшеницы объясняют состояние гетероплазмии определенных ее районов, обнаруженное у аллоплазматических линий пшеницы (ядерно-цитоплазматических гибридов), выделенных среди беккроссных потомков гибридов *Aegilops* × *Triticum* (Hattori *et al.*, 2002); у аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму ржи *S. cereale* L. (Синявская и др., 2004; 2005); у ячменно-пшеничных гибридов *H. vulgare* L. × *Triticum* L. и их беккроссных потомков (Бильданова и др., 2003; Синявская и др., 2005; Aksyonova *et al.*, 2005); у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ($2n = 28$) × *T. aestivum* ($2n = 42$) (Трубачеева и др., 2008; 2009). Гетероплазмия у растений гибридного происхождения может затрагивать одновременно несколько районов мтДНК и сохраняться в ряду самоопыленных поколений (Hattori *et al.*, 2002; Трубачеева и др., 2010). Другая особенность, выявленная у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов, – это переход гетероплазматического состояния мтДНК, ассоциированного с проявлением стерильности или частичной фертильности растений, в состояние гомоплазмии пшеничного (отцовского) типа при восстановлении фертильности (Бильданова и др., 2004; Синявская и др., 2005; Aksyonova *et al.*, 2005; Трубачеева и др., 2009). Такие изменения объясняют селективной репликацией районов мтДНК и трансмиссией органелл пшеничного типа, контролируемых ядерными генами (Aksyonova *et al.*, 2005).

Результаты, полученные при изучении двух районов хлоропластной ДНК (*3rbcL*, *trnS1*) у ржано-пшеничных и ячменно-пшеничных гибридов и их беккроссных потомков, оказались недостаточно информативными. У гибридов F_1 , стерильных и частично фертильных беккроссных потомков эти районы хпДНК представлены только материнскими копиями (ржаными или, соответственно, ячменными), а у беккроссных потомков, у которых происходило полное восстановление фертильности, – только отцовскими (пшеничными) (Синявская и др., 2005; Aksyonova *et al.*, 2005). Объяснить такую трансформацию можно, предположив,

что у гибридов F_1 изученные районы хпДНК в результате двуродительского наследования были в гетероплазматическом состоянии, но пшеничные копии находились в следовом количестве и не детектировались.

В настоящей работе поставлена задача исследовать состояние 18S/5S митохондриального повтора и ранее не изученных районов хпДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы, имеющих цитоплазму разного происхождения и характеризующихся различиями по структуре ядерных геномов и проявлению фертильности.

Материалы и методы

Изучены аллоплазматические рекомбинантные и интрогрессивные линии мягкой пшеницы, несущие цитоплазму дикорастущего ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ($2n = 28$). Эти линии были сформированы от отдельных растений беккроссных потомков BC_3 – BC_4 -поколений ячменно-пшеничного гибрида (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*) × *T. aestivum* (Пиротрикс 28), последовательно скрещенного с сортами мягкой пшеницы Пиротрикс 28 и Новосибирская 67. При получении BC_3 -поколения сорт Новосибирская 67 в возвратные скрещивания вводился дважды, а поколения BC_4 – трижды. Использование разных сортов мягкой пшеницы при беккроссировании гибридов приводило к формированию рекомбинантного ядерного генома у беккроссных потомков. Линия Л-32 – потомки BC_3 -поколения, линии Л-36 и Л-218 – BC_4 -поколения. Линия Л-37 выделена среди растений гибридов F_1 , полученных от скрещивания 70-хромосомного амфиплоида *H. marinum* ssp. *gussoneanum* × *T. aestivum* L. (Пиротрикс 28) с мягкой пшеницей сорта Пиротрикс 28 (Першина и др., 2004). В работе использованы растения самоопыленных поколений линий: Л-32(F_8 , F_{11}), Л-36(F_7 , F_{11}), Л-37(F_8 , F_{11}), Л-218(1) (F_5 , F_7), Л-218(2) (F_5 , F_7). Ранее было показано, что у всех аллоплазматических линий, кроме Л-36 и Л-218(1), в замещенном или дополненном состоянии присутствуют пары хромосом $7N^{1mar}$ или $7N^1L^{mar}$, интрогрессированные от дикорастущего ячменя (Трубачеева и др., 2008, 2009). Геномные формулы линий и их происхождение представлены в табл. 1.

Таблица 1

Происхождение аллоплазматических линий мягкой пшеницы и их геномные формулы

Линии	Происхождение линий	Число хромосом	Геномные формулы
Л-32	$BC_3F_{8,11}:[(H. mar \times П) \times П \times H^2]F_{8,11}$	$2n = 42$	$2n = 40w + 2tb =$ $40w + 7H^1L^{mar}(7D)$
Л-36	$BC_4F_{7,11}:[(H. mar \times П) \times П \times H^3]F_{7,11}$	$2n = 42$	$2n = 42w$
Л-37	$BC_1F_{8,11}:[(H. mar \times П)Am \times П]F_{8,11}$	$2n = 43$	$2n = 42w + tb =$ $42w + 7H^1L^{mar}$
		$2n = 44$	$2n = 42w + 2tb =$ $42w + 7H^1L^{mar}$
Л-218-1	$BC_4F_5:[(H. mar \times П) \times П \times H^3]F_5$	$2n = 42$	$2n = 42w$
Л-218-2	$BC_4F_5:[(H. mar \times П) \times П \times H^3]F_5$	$2n = 42$	$2n = 40w + 2b =$ $42w + 7H^1L^{mar}$
Л-80	$BC_4F_9:[(H. v \times я-319) \times C^3 \times У]$	$2n = 42$	$2n = 42w$

Обозначения. *H. mar* – *H. marinum ssp. gussoneanum*, *H. v* – *H. vulgare*, я-319 – линия культурного ячменя я-319, П – сорт мягкой пшеницы Пиротрикс 28, Н – сорт мягкой пшеницы Новосибирская 67, С – сорт мягкой пшеницы Саратовская 29, У – сорт мягкой пшеницы Ульяновка, *tb* и *2tb* – монотело- и дителоцентрическая хромосома ячменя $7H^1L^{mar}$, *2b* – хромосома ячменя $7H^1L^{mar}$.

В качестве контроля при изучении этих аллоплазматических линий использованы ранее полученные эуплазматические (с цитоплазмой пшеницы) пшенично-ячменные замещенные линии Л-411(F_4 ; F_5) и Л-416(F_4 ; F_5) ($2n = 40 + 2t$), у которых хромосома 7D замещена на длинное плечо хромосомы ячменя $7H^1L^{mar}$ (Трубачеева и др., 2009).

Аллоплазматическая рекомбинантная линия Л-80 ($2n = 42$), изученная в F_9 , сформирована на основе одного из растений BC_4 -потомка, полученного от последовательных скрещиваний ячменно-пшеничного гибрида *H. vulgare* (я-319) \times *T. aestivum* (Саратовская 29) с сортом Саратовская 29 (трижды) и сортом Ульяновка (Першина и др., 1999).

В работе использованы реципрокные гибриды, полученные при скрещивании сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 с сортом ржи посевной Онохойская, и их потомки. 56-хромосомные амфилоиды получены в результате спонтанного удвоения числа хромосом у реципрокных гибридов. Амфилоиды с неполным числом хромосом ($2n = 54$) выделены среди самоопыленных потомков 56-хромосомных амфилоидов в F_2 . Аллоплазматические (с цитоплазмой ржи) и эуплазматические (с цитоплазмой пшеницы) линии мягкой пшеницы, имеющие дополненные хромосомы от ржи ($2n = 49 = 42w + 7r$,

$2n = 47 = 42w + 5r$; $2n = 44 = 42w + 2r$), выделены среди самоопыленных потомков гибридов в F_2 – F_4 , полученных от скрещивания 56-хромосомных реципрокных амфилоидов с мягкой пшеницей сорта Саратовская 29 (обозначения: *w* – пшеница, *r* – рожь).

Оценку изучаемых растений по проявлению фертильности проводили при выращивании растений в гидропонной теплице. В работу включали три основных типа растений: стерильные (полное отсутствие зерен с растения), частично фертильные (наличие единичных зерен с растения), фертильные (все колосья полностью озерненные).

Для цитогенетического контроля изучаемого материала использовали стандартный метод изучения числа хромосом в кончиках корешков растений (Першина и др., 2004) и геномную гибридизацию *in situ* (GISH) в соответствии с методикой (Mukai, Gill, 1991).

ПЦР-анализ 18S/5S митохондриального повтора выполнен с использованием специфических праймеров и в соответствии с условиями, опубликованными ранее (Трубачеева и др., 2005).

Изучение районов (*infA*, *rpoB*, *psaA*, *ndhH*, *Ycf5*) хпДНК проведено с помощью ПЦР-ПДРФ-анализа с использованием специфических праймеров, подобранных из базы данных

<http://gobase.bcm.umontreal.ca/> с помощью онлайн-программы Primer-Blast <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Продукты ПЦР и рестрикции разделялись электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле в ТАЕ-буфере. Проведен подбор ПЦР-ПДРФ маркеров, способных дифференцировать хлоропластные последовательности мягкой пшеницы и ржи, мягкой пшеницы и видов ячменя *H. vulgare* и *H. marinum* ssp. *gussoneanum*. С этой целью проведено сравнение нуклеотидных последовательностей, полученных в результате амплификации участков генов хпДНК со специфическими праймерами, и подобраны эндонуклеазы рестрикции, расщепляющие ПЦР-продукт на фрагменты у одного из анализируемых видов. Обнаружено, что все маркеры эффективны для дифференциации хпДНК пшеницы и культурного ячменя, четыре маркера (*infA*, *rpoB*, *psaA* и *ndhH*) – пшеницы и дикорастущего ячменя *H. marinum* ssp. *gussoneanum*, а маркер *ndhH*/MspI подходит для дифференциации хпДНК пшеницы и ржи. Структура праймеров, комбинация район хпДНК/эндонуклеаза рестрикции и длины получаемых фрагментов даны в табл. 2.

Результаты

В табл. 3 представлены данные об особенностях проявления фертильности у линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму *H. marinum* ssp. *gussoneanum*, и результаты изучения у этих линий 18S/5S митохондриального (мт) повтора

и районов хпДНК *infA*, *rpoB*, *psaA* и *ndhH*. У растений этих линий, имеющих в ядерном геноме генетический материал дикорастущего ячменя и проявивших полную или частичную фертильность, обнаружено гетероплазматическое состояние (одновременное присутствие копий ячменя и пшеницы) 18S/5S мт-повтора и района хпДНК *ndhH* (рис. 1). Это характерно для обоих цитотипов ($2n = 42w + tb$) и ($2n = 42w + 2tb$) (обозначение: b – 7Н^{1mar}) пшенично-ячменной дополненной линии Л-37 в поколениях F₈ и F₁₁; частично фертильной замещенной линии Л-218-2 (F₅, F₇); для частично фертильных и фертильных растений линии Л-32 (F₈, F₁₁). Три других района хпДНК (*infA*, *rpoB*, *psaA*) у этих линий представлены только копиями ячменного типа.

Другой результат получен при изучении аллоплазматических рекомбинантных линий Л-218-1 (F₅, F₇) и Л-36 (F₇, F₁₁), не содержащих хромосомы дикорастущего ячменя и характеризующихся полным проявлением фертильности. У этих линий все изученные районы хпДНК и 18S/5S мт-повтор представлены только копиями пшеничного типа (табл. 3).

У контрольных линий Л-411 (F₄, F₅) и Л-416 (F₄, F₅), несущих цитоплазму мягкой пшеницы, независимо от проявления фертильности все изученные районы хпДНК и мтДНК находятся в гомоплазматическом состоянии пшеничного типа.

Аллоплазматическая рекомбинантная линия Л-80 (F₉), несущая цитоплазму ячменя

Таблица 2

ПЦР-ПДРФ маркеры, использованные в работе

Район хпДНК/ эндонуклеаза рестрикции	Структура праймера	Длины фрагментов ПЦР-ПДРФ в п.н.		
		пшеница	ячмень	рожь
<i>ndhH</i> /MspI	5'-tgcattggttcttcgactg-3' 5'-ggattccctcatttcaccaac-3'	250+500	750	750
<i>infA</i> /MspI	5'-acggaagccctaccaatg-3' 5'-tcaaatcttcgctatcctcg-3'	220	70+150	220
<i>rpoB</i> /MspI	5'-tggcacatacccgttatctc-3' 5'-aatggaaccctcgaatctag-3'	250+400	650	250+400
<i>psaA</i> /TaqI	5'-cttgatctggaacctacatg-3' 5'-aataatcccgctaagtggg-3'	50+400	450	50+400
<i>Ycf5</i> /ApaII	5'-tttctcgttgggcttctc-3' 5'-gcctcattagcccaactgc-3'	100+500	600	100+500

Таблица 3

Характеристика аллоплазматических и эуплазматических линий мягкой пшеницы, полученных на основе ячменно-пшеничных гибридов *H. marinum* ssp. *gussoneanum* Hudson ($2n = 28$) \times *T. aestivum* L. ($2n = 42$), по проявлению фертильности, типам 18S/5S мт-повтора и районов хпДНК

Линии и номера поколений	Происхождение цитоплазмы	Геномные формулы	Особенности фертильности	18S/5S мт-повтор	Районы хпДНК			
					<i>infA</i>	<i>rpoB</i>	<i>psaA</i>	<i>ndhH</i>
Л-37 (F ₈ , F ₁₁)	<i>H. mar</i>	$2n = 42w + tb$ $2n = 42w + 2tb$	ч/ферт. ферт.	Я+П Я+П	Я	Я	Я	Я+П
					Я	Я	Я	Я+П
Л-218-1 (F ₅ , F ₇)	<i>H. mar</i>	$2n = 42w$	ферт.	П	П	П	П	П
Л-218-2 (F ₅ , F ₇)	<i>H. mar</i>	$2n = 40w + 2tb$	ч/ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
Л-32 (F ₈ , F ₁₁)	<i>H. mar</i>	$2n = 40w + 2tb$	стер.*	–	–	–	–	–
			ч/ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
			ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
Л-36 (F ₇ , F ₁₁)	<i>H. mar</i>	$2n = 42w$	ферт.	П	П	П	П	П
Л-411 (F ₄ , F ₅)	<i>T. a</i>	$2n = 40w + 2tb$	ферт.	П	П	П	П	П
			ч/ферт.	П	П	П	П	П
Л-416 (F ₄ , F ₅)	<i>T. a</i>	$2n = 40w + 2tb$	ферт.	П	П	П	П	П
			ч/ферт.	П	П	П	П	П

Обозначения. *H. mar* – *H. marinum* ssp. *gussoneanum*, *T. a* – *T. aestivum*, b – ячмень; w – пшеница; Я – ячменные копии органелльных районов, П – пшеничные копии органелльных районов. Здесь и далее: ферт. – фертильные, ч/ферт. – частично фертильные, стер. – стерильные. * Трубочеева и др., 2009.

H. vulgare, представлена растениями трех типов: фертильными, частично фертильными и стерильными. У этих растений изучены 18S/5S мт-повтор и районы хпДНК *infA*, *rpoB*, *psaA*, *ndhH* и *Ycf5*. У фертильных растений 18S/5S мт-повтор находится в гомоплазматическом состоянии, а у частично фертильных и стерильных растений – в гетероплазматическом (табл. 4).

Четыре из пяти изученных районов хпДНК (*infA*, *rpoB*, *psaA* и *ndhH*) у фертильных расте-

ний представлены копиями пшеничного типа, а у частично фертильных и стерильных – копиями ячменного типа. Хотя район *Ycf5* хпДНК и находится в гетероплазматическом состоянии у всех генотипов, но имеет различное соотношение копий ячменя и пшеницы у разных групп растений. Так, у растений с полным восстановлением фертильности фрагменты ячменного типа района *Ycf5* хпДНК выявляются лишь в следовом количестве.

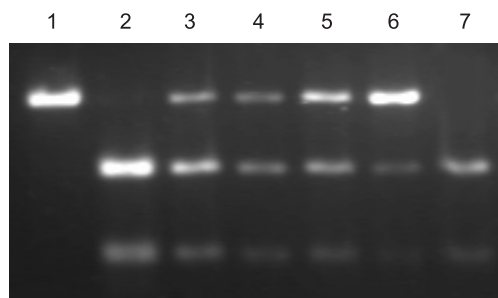


Рис. 1. Результат ПЦР-ПДРФ-анализа с районом *ndhH* хпДНК.

1 – *H. marinum* ssp. *gussoneanum*; 2 – *T. aestivum*; 3 – фертильные растения линии Л-37 (F₁₁); 4 – частично фертильные растения линии Л-37 (F₁₁); 5 – фертильные растения линии Л-32 (F₁₁); 6 – частично фертильные растения линии Л-32 (F₁₁); 7 – фертильные растения линии Л-36 (F₁₁).

Таблица 4

Характеристика аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ($2n = 42$) Л-80 по проявлению фертильности, типам 18S/5S мт-повтора и районов хпДНК

Номер линии	Происхождение цитоплазмы	Геномная формула	Особенности фертильности	18S/5S мт-повтор	Районы хпДНК				
					<i>infA</i>	<i>rpoB</i>	<i>psaA</i>	<i>ndhH</i>	<i>Ycf5</i>
Л-80 (F ₉)	<i>H. vulgare</i>	$2n = 42w$	ферт.	П	П	П	П	П	П+ _я
			ч/ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я	Я+П
			стер.	Я+П	Я	Я	Я	Я	Я+П

Обозначения. w – пшеница, Я – ячменные копии районов органелльной ДНК (+_я – следовое количество), П – пшеничные копии районов органелльной ДНК.

При изучении реципрокных гибридов между пшеницей и рожью и их потомков детектировать различия между органелльной ДНК пшеницы и ржи возможно только при анализе 18S/5S мт-повтора и *ndhH*-района хпДНК. В результате такого анализа установлено, что у гибридов рожь–пшеница и их потомков (амфилоидов и генотипов пшеницы с дополненными хромосомами ржи), несущих цитоплазму ржи, независимо от проявления у растений фертильности/стерильности 18S/5S мт-повтор находится в гетероплазматическом состоянии, а *ndhH*-район представлен только копиями ржаного типа (табл. 5). Гибриды пшеница–рожь, амфилоиды и генотипы с дополненными хромосомами ржи, несущие цитоплазму пшеницы, характеризуются гомоплазматическим состоянием пшеничного типа и 18S/5S мт-повтора, и *ndhH*-района хпДНК.

Обсуждение

Проблема изучения органелльных геномов у отдаленных гибридов связана с ограниченным числом различий, детектируемых между родительскими видами при анализе отдельных последовательностей митохондриальной и хлоропластной ДНК. В данной работе так же, как и в предыдущих работах с отдаленными гибридами мягкой пшеницы (Бильданова и др., 2004; Синявская и др., 2005; Aksyonova *et al.*, 2005; Трубачеева и др., 2005, 2008), информативным оказалось изучение последовательности 18S/5S мт-повтора. Кроме того, в настоящей работе уделено внимание и ранее не изученным

районам хпДНК. Различия в структуре этих районов позволяют путем ПЦР-ПДРФ-анализа определять их принадлежность к родительским видам злаков (мягкая пшеница, культурный ячмень, дикорастущий ячмень *H. maritimum* ssp. *gussoneanum*, рожь посевная) у растений гибридного происхождения, включенных в данную работу.

При изучении реципрокных гибридов F₁, полученных от скрещивания мягкой пшеницы с рожью посевной, обнаружены четкие различия по состоянию 18S/5S мт-повтора и *ndhH*-района хпДНК, в зависимости от происхождения цитоплазмы у гибридов. У растений гибридной комбинации пшеница–рожь, т. е. при создании которых в качестве материнских растений была использована мягкая пшеница, эти районы органелльных ДНК находятся в гомоплазматическом состоянии пшеничного типа. Наблюдаемая гомоплазмия пшеничного типа отражает характерную для мягкой пшеницы передачу органелльных ДНК по материнской линии. У реципрокных гибридов, полученных от опыления ржи мягкой пшеницей, *ndhH*-район хпДНК также находится в гомоплазматическом состоянии материнского (ржаного) типа. Однако для 18S/5S мт-повтора у гибридов рожь–пшеница характерно гетероплазматическое состояние: одновременно присутствуют копии ржаного (материнского) и пшеничного (отцовского) типов.

У потомков гибридов рожь–пшеница – амфилоидов и аллоплазматических генотипов мягкой пшеницы с дополненными хромосомами ржи гетероплазматическое состояние 18S/5S

Таблица 5

Характеристика гибридов, полученных при реципрокных скрещиваниях мягкой пшеницы *T. aestivum* ($2n = 42$) (Саратовская 29) и ржи посевной *S. cereale* ($2n = 14$) (Онохойская), и их потомков по проявлению фертильности, типам 18S/5S мт-повтора и района хпДНК *ndhH*

Гибридные генотипы	Происхождение цитоплазмы	Число хромосом и геномная формула	Особенности фертильности	18S/5S мт-повтор	Район хпДНК <i>ndhH</i>
<i>S. cereale</i> × <i>T. aestivum</i>	<i>S. cereale</i>	$2n = 28$ $2n = 7r + 21w$	ч/ферт. стер.	P+П P+П	P P
Амфиплоиды	<i>S. cereale</i>	$2n = 56$ $2n = 14r + 42w$	ферт.	P+П	P
		$2n = 54$ $2n = 12r + 42w$	стер.	P+П	P
Аллоплазматические генотипы <i>T. aestivum</i> с дополненными хромосомами <i>S. cereale</i>	<i>S. cereale</i>	$2n = 44$ $2n = 2r + 42w$	ферт.	P+П	P
		$2n = 47$ $2n = 5r + 42w$	ч/ферт.	P+П	P
		$2n = 49$ $2n = 5r + 42w$	стер.	P+П	P
<i>T. aestivum</i> × <i>S. cereale</i>	<i>T. aestivum</i>	$2n = 28$ $2n = 21w + 7r$	ч/ферт. стер.	П П	П П
Амфиплоиды	<i>T. aestivum</i>	$2n = 56$ $2n = 42w + 14r$	ферт.	П	П
		$2n = 54$ $2n = 42w + 12r$	стер.	П	П
Генотипы <i>T. aestivum</i> с дополненными хромосомами <i>S. cereale</i>	<i>T. aestivum</i>	$2n = 44$ $2n = 42w + 2r$	ферт.	П	П
		$2n = 47$ $2n = 42w + 5r$	ч/ферт.	П	П
		$2n = 49$ $2n = 42w + 5r$	ч/ферт. стер.	П П	П П

Обозначения: r – рожь *S. cereale*, w – пшеница; P – ржаные копии районов оргanelльной ДНК, П – пшеничные копии районов оргanelльной ДНК.

мт-повтора и гомоплазматическое *ndhH*-района хпДНК сохраняется. Данные о гетероплазматическом состоянии митохондриальной ДНК и гомоплазматическом состоянии хлоропластной ДНК у аллоплазматических линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму и отдельные хромосомы ржи, согласуются с результатами другой работы (Синявская и др., 2005). Однако в этих работах аллоплазматические линии получены с использованием разных сортов мягкой пшеницы и ржи посевной, а при изучении хпДНК были проанализированы различные ее районы.

Из результатов, полученных в нашей работе, следует, что гетероплазматическое состояние 18S/5S мт-повтора как показатель двуродительского наследования мтДНК у отдаленных гибридов мягкой пшеницы носит неслучайный характер и сохраняется в ряду поколений у генотипов, несущих цитоплазму ржи. Так, гетероплазмия этого повтора наследуется амфиплоидами после удвоения числа хромосом у ржано-пшеничных гибридов, передается самоопыленным потомкам амфиплоидов независимо от сохранения полного набора хромосом или потери некоторых из хромосом, а также

при беккроссировании амфиплоидов мягкой пшеницы. В результате этого образуются аллоплазматические генотипы мягкой пшеницы с цитоплазмой и дополненными хромосомами ржи. Гетероплазматическое состояние 18S/5S мт-повтора проявлялось у всех потомков ржано-пшеничных гибридов, включая стерильные, частично фертильные и фертильные генотипы, независимо от структуры ядерного генома (табл. 5).

Обсуждая результаты, полученные при изучении аллоплазматических рекомбинантных линий мягкой пшеницы, несущих цитоплазму культурного ячменя (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, и аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий мягкой пшеницы с цитоплазмой дикорастущего ячменя (*H. marinum*)-*T. aestivum*, следует подчеркнуть особенности образования этих линий. Так, в процессе развития аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* произошло полное вытеснение хромосом культурного ячменя из вновь формирующегося ядерного генома мягкой пшеницы (Бильданова и др., 2003, 2004). Среди этих линий выделены нестабильные по проявлению фертильности линии с высокой частотой развития стерильных растений.

Развитие аллоплазматических линий (*H. marinum*)-*T. aestivum*, напротив, сопровождалось интрогрессией хромосом ячменя в геном мягкой пшеницы (Нумерова и др., 2004; Трубочеева и др., 2008, 2009), а среди растений аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. marinum*)-*T. aestivum* стерильные растения встречаются крайне редко (Трубочеева и др., 2010). При этом полное восстановление фертильности характерно как для отдельных аллоплазматических линий с интрогрессией хромосом дикорастущего ячменя в геном мягкой пшеницы, так и для линий, у которых ядерный геном представлен только хромосомами мягкой пшеницы.

Изучение аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* и (*H. marinum*)-*T. aestivum* выявило у некоторых из них гетероплазматическое состояние как 18S/5S мт-повтора, так отдельных районов хпДНК. Ранее у ячменно-пшеничных гибридов *H. vulgare* × *T. aestivum* и их потомков районы хпДНК были выявлены только в гомоплазматическом состоянии (Синявская и др.,

2005; Aksyonova *et al.*, 2005). В настоящей работе у аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-80(F₉) из пяти изученных хпДНК-районов четыре (*infA*, *rpoB*, *psaA* и *ndhH*) также находятся в гомоплазматическом состоянии. Как и в предыдущих работах (Синявская и др., 2005; Aksyonova *et al.*, 2005), у стерильных и частично фертильных растений были выявлены копии хпДНК районов только ячменного типа, а у фертильных растений – только пшеничного типа. Другая картина обнаружена при изучении *Ycf5*-района. Гетероплазматическое состояние этого района обнаружено у всех изученных генотипов аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-80 (F₉). Однако у растений с полностью восстановленной фертильностью произошло уменьшение копий ячменя в сторону увеличения копий пшеницы. Гетероплазматическое состояние 18S/5S мт-повтора у стерильных и частично фертильных растений линии Л-80 (F₉) перешло в гомоплазматическое состояние пшеничного типа у растений с восстановлением полной фертильности.

У аллоплазматических линий (*H. marinum*)-*T. aestivum*, имеющих в геноме отдельные хромосомы дикорастущего ячменя, три района хпДНК (*infA*, *rpoB* и *psaA*) находятся в гомоплазматическом состоянии ячменного типа, а 18S/5S мт-повтор и *ndhH*-район хпДНК – в гетероплазматическом (табл. 3). Это характерно для разных самоопыленных поколений каждой из линий. Таким образом, при самоопылении происходит передача гетероплазматического и соответственно гомоплазматического состояния этих районов органелльной ДНК.

Важно подчеркнуть, что наличие копий ячменя изученных районов мтДНК и хпДНК не связано с присутствием хромосом ячменя в геноме аллоплазматических линий (*H. marinum*)-*T. aestivum*, а определяется влиянием цитоплазмы ячменя. Это подтверждается тем, что у пшенично-ячменных замещенных линий Л-411 и Л-416, несущих цитоплазму мягкой пшеницы, ячменных копий органелльных ДНК не обнаружено.

Известно, что крайнее проявление ядерно-цитоплазматического конфликта у генотипов, сочетающих чужеродные ядерные и цитоплазматические геномы, – это нежизнеспособность и стерильность (Маан, 1995). Подчеркнем, что у

изученной в данной работе аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-80 (F₉) стерильность растений ассоциирует с гетероплазмией 18S/5S мт-повтора и *Ycf5*-района хпДНК, а также с гомоплазмией районов хпДНК (*infA*, *rpoB*, *psaA* и *ndhH*), что не отличает эти растения от растений с частичной фертильностью. Гетероплазмия 18S/5S мт-повтора была обнаружена и у нежизнеспособных растений, выделенных среди растений одной из аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* другого происхождения (Бадаева и др., 2006).

Другой результат был получен при изучении стерильных растений, выделенных среди растений нестабильной по проявлению фертильности аллоплазматической интрогрессивной линии (*H. marinum*)-*T. aestivum* Л-32. Установлено, что у стерильных растений 18S/5S мт-повтор представлен только копиями ячменного типа (Трубачеева и др., 2009). Среди растений этой же линии, но характеризующихся наличием копий 18S/5S мт-повтора и ячменного, и пшеничного типов, выявлено значительное число растений с полностью восстановленной фертильностью. Следовательно, у этой линии гетероплазмия имеет преимущество, обеспечивающее проявление фертильности растений. Однако с восстановлением полной фертильности у аллоплазматических линий (*H. marinum*)-*T. aestivum*, не имеющих в ядерном геноме хромосом ячменя, так же как и у аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, наблюдается переход всех изученных районов или из гомоплазматического состояния ячменного типа, или гетероплазматического состояния в гомоплазматическое состояние пшеничного типа.

Таким образом, результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что процесс ядерно-цитоплазматической коадаптации при восстановлении фертильности у аллоплазматических линий, выделенных среди беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов, сопровождается изменениями ДНК митохондрий и хлоропластов в сторону «пшеничного» типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№11-04-00806), частичной поддержке программы РАН «Биологическое разнообразие» и интеграционной программы СО РАН.

Литература

- Бадаева Е.Д., Першина Л.А., Бильданова Л.Л. Цитогенетическое исследование нестабильных по проявлению фертильности и жизнеспособности аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* // Генетика. 2006. Т. 42. № 2. С. 198–209.
- Бильданова Л.Л., Бадаева Е.Д., Першина Л.А., Салина Е.А. Молекулярно-генетический анализ и С-окрашивание хромосом аллоплазматических линий мягкой пшеницы, полученных на основе ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum vulgare* L. ($2n = 14$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$), и различающихся по проявлению фертильности // Генетика. 2004. Т. 40. № 12. С. 1868–1877.
- Бильданова Л.Л., Салина Е.А., Першина Л.А. Изучение особенностей рекомбинации ядерного генома у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *Hordeum vulgare* L. ($2n = 14$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) с использованием SSR-анализа // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 1673–1679.
- Нумерова О.М., Першина Л.А., Салина Е.А., Шумный В.К. Выявление хромосом ячменя с использованием метода геномной *in situ*-гибридизации в геноме беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов [*Hordeum geniculatum* All. ($2n = 28$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$)] ($2n = 70$) // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1229–1233.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Восстановление фертильности у беккроссных потомков ячменно-пшеничных гибридов *H. vulgare* L. ($2n = 14$) × *T. aestivum* L. ($2n = 42$) в зависимости от генотипов пшеницы, введенных в возвратные скрещивания // Генетика. 1999. Т. 35. № 2. С. 228–236.
- Першина Л.А., Нумерова О.М., Белова Л.И. и др. Проявление фертильности в процессе формообразования у самоопыленных беккроссных потомков ячменно-пшеничных амфиплоидов [(*Hordeum geniculatum* All. ($2n = 28$) × *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$))] ($2n = 70$) // Генетика. 2004. Т. 40. № 5. С. 636–641.
- Синявская М.Г., Аксенова Е.А., Першина Л.А. и др. Изменение ДНК хлоропластов и митохондрий при отдаленной гибридизации у злаков // Информ. вестник ВОГиС. 2005. Т. 9. № 4. С. 505–511.
- Синявская М.Г., Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. и др. Наследование оргanelльных ДНК у гибридов ржи (*Secale cereale* L.) и тритикале (× *Triticale* Thch.) // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 218–223.
- Трубачеева Н.В., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г. и др. Получение и изучение с применением комплекса методов молекулярного и цитогенетического анализа аллоплазматических эуплоидных ($2n = 42$) и телоцентрически дополненных линий ($2n = 42+2t$) (*Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum*)-*Triticum aestivum* // Генетика. 2008. Т. 44. № 1. С. 81–89.
- Трубачеева Н.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С. и др. Гетероплазмия и гомоплазмия 18S/5S митохондриального повтора у аллоплазматических линий (*H. marinum* subsp. *gussoneanum*)-*T. aestivum* // Вестн. НГУ. 2010. Т. 8. Вып. 3. С. 104–110.
- Трубачеева Н.В., Ефремова Т.Т., Бадаева Е.Д. и др. Получение аллоплазматических и эуплазматических пше-

- нично-ячменных дителосомных замещенных линий 7H^{1L^{mar}}(7D) и изучение 18S/5S митохондриального повтора у этих линий // Генетика. 2009. Т. 45. № 12. С. 1627–1633.
- Трубачеева Н.В., Салина Е.А., Першина Л.А. Изучение митохондриальных геномов аллоплазматических рекомбинантных линий пшеницы, полученных на основе ячменно-пшеничных гибридов *H. geniculatum* All. (= *H. marinum* subsp. *gussoneanum*) ($2n = 28$) × *T. aestivum* L. ($2n = 42$) с использованием RFLP- и ПЦП-анализа // Генетика. 2005. Т. 40. № 3. С. 349–355.
- Aksyonova E., Sinyavskaya M., Danilenko N. *et al.* Heteroplasmy and paternally oriented shift of the organellar DNA composition in barley-wheat hybrids during backcrosses with wheat parents // *Genome*. 2005. V. 48. P. 761–769.
- Cipriani G., Testoin R., Morgante M. Paternal inheritance of plastids in interspecific hybrids of the genus *Actinidia* revealed by PCR-amplification of chloroplast DNA fragments // *Mol. Gen. Genet.* 1995. V. 247. P. 693–697.
- Hansen A.K., Escobar L.K., Gilbert L.E., Jansen R.K. Paternal, maternal, and biparental inheritance of the chloroplast genome in *Passiflora* (Passifloraceae): implications for phylogenetic studies // *Am. J. Bot.* 2007. V. 94. P. 42–46.
- Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus-cytoplasm hybrids // *Genetics*. 2002. P. 1619–1630.
- Maan S.S. The species-cytoplasmic specific hypothesis // *Proc. of a U.S.–Japan symp.: Classical and molecular cytogenetic analysis* / Ed. W.H. Rupp, B.S. Gill. Kansas State Univ. Press, Manhattan, Kans., USA. 1995. P. 165–174.
- Miller S.S., Watson E.M., Lazebnik J. *et al.* Characterization of an alien source of resistance to Fusarium head blight transferred to Chinese Spring wheat // *Botany/Botanique*. 2011. V. 89. P. 301–311.
- Mukai Y., Gill B.S. Detection of barley chromatin added to wheat by genomic *in situ* hybridization // *Genome*. 1991. V. 34. No 3. P. 448–452.
- Rieseberg L.H., Willis J.H. Plant speciation // *Science*. 2007. V. 317. P. 910–914.
- Weihe A., Aplitz J., Pohlheim F. *et al.* Biparental inheritance of plastidial and mitochondrial DNA and hybrid variegation in *Pelargonium* // *Mol. Genet. Genomics*. 2009. V. 282. P. 587–593.
- Woloszynska M. Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes – though this be madness, yet there's method in't // *J. Exptl. Bot.* 2010. V. 61. P. 657–671.
- Zemetra R.S., Hansen J., Mallory-Smith C.A. Potential for gene transfer between wheat (*Triticum aestivum*) and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrical*) // *Weed Sci.* 1998. V. 46. P. 313–317.

THE HETEROPLASMIC AND HOMOPLASMIC STATES OF MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST DNA REGIONS IN THE PROGENIES OF WIDE HYBRIDS OF COMMON WHEAT OF DIFFERENT ORIGINS

N.V. Trubacheeva¹, L.A. Kravtsova¹, E.P. Devyatkina¹, T.T. Efremova¹,
M.G. Sinyavskaya², V.K. Shumny^{1,3}, L.A. Pershina^{1,3}

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

² Institute of Cytology and Genetics, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus;

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The states of the 18S/5S mitochondrial (mt) repeat and some chloroplast DNA regions have been studied in alloplasmic lines of common wheat with cytoplasm from barley species *Hordeum marinum* subsp. *gussoneanum* Hudson and *H. vulgare* L., and in progenies of reciprocal hybrids between *Triticum aestivum* L. and *Secale cereale* L. The heteroplasmic state of the 18S/5S repeat, which was a result of biparental mtDNA transmission, is observed in rye × wheat hybrids and in their progenies possessing rye cytoplasm. For the first time, the heteroplasmic state of chloroplast DNA associated with heteroplasmy of the 18S/5S mt repeat has been detected in cereals by using alloplasmic wheat lines. It has been found that the transition of mt- and cpDNA heteroplasmy, barley homoplasmy of chloroplast regions to wheat homoplasmy is associated with complete fertility restoration and barley chromosome elimination from the newly developed nuclear genomes of alloplasmic lines.

Key words: alloplasmic lines, reciprocal hybrids, PCR-RFLP, mtDNA, cpDNA, heteroplasmy, homoplasmy.