ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 16
1
март 2012

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 16
1
March 2012

«Вавиловский журнал генетики и селекции» / «Vavilov Journal of Genetics and Breeding» до 2011 г. выходил под названием «Информационный вестник ВОГиС» / «The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeding Scientists».

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен ВАК Минобрнауки России в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (по биологическим наукам).
(Редакция 17 июня 2011 г.: http://vak.ed.gov.ru)

«Вавиловский журнал генетики и селекции» включен в федеральный почтовый Объединенный каталог «ПРЕССА РОССИИ».
Персональный подписной индекс № 42153.

Адрес редакции:

«Вавиловский журнал генетики и селекции»,
ИЦиГ СО РАН,
Проспект Академика Лаврентьева, 10,
Новосибирск, 630090

Факс: (383) 3331278
e-mail: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

Регистрационное свидетельство ПИ № ФС77-45870 выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций 20 июля 2011 г.

При перепечатке материалов ссылка на журнал обязательна.

© Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, 2012
© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2012
© Сибирское отделение Российской академии наук, 2012

ВАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 16
1
март 2012

Содержание

В. К. Шумный, Е. А. Салина

УЛУЧШЕНИЕ ПШЕНИЦЫ – АКТУАЛЬНАЯ ЗАДАЧА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ 8

О. П. Митрофанова

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ПШЕНИЦЫ В РОССИИ: СОСТОЯНИЕ И ПРЕДСЕЛЕКЦИОННОЕ ИЗУЧЕНИЕ 10

В. П. Шаманин, А. И. Моргунов, Я. Манес, Ю. И. Зеленский, А. С. Чурсин, М. А. Левшунов, И. В. Потоцкая, И. Е. Лихенко, Т. А. Манько, И. И. Каракоз, А. В. Табаченко, С. Л. Петуховский

СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИЙ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СИБИРСКОГО ПИТОМНИКА ЧЕЛНОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ СИММИТ 21

П. И. Стёпочкин

СОЗДАНИЕ И СЕЛЕКЦИОННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОФОНДА ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ В СибНИИРС 33

Л. А. Беспалова, А. В. Васильев, И. Б. Аблова, В. А. Филобок, Ж. Н. Худокормова, Р. О. Давоян, Э. Р. Давоян, Г. И. Карлов, А. А. Соловьев, М. Г. Дивашук, Н. К. Майер, М. В. Дудников, Н. В. Мироненко, О. А. Баранова

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ им. П. П. ЛУКЬЯНЕНКО 37

Р. О. Давоян, И. В. Бебякина, О. Р. Давоян, А. Н. Зинченко, Э. Р. Давоян, А. М. Кравченко, Ю. С. Зубанова

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОФОНДА ДИКИХ СОРОДИЧЕЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ 44

A. Didier, L. Bardy, E. Boulat, J. Koenig, A. Lapierre, F. Exbrayat, J. Bordes, F. Balfourier

THE PGR NETWORKS IN FRANCE: COLLABORATION OF USERS AND THE GENETIC RESOURCE CENTRE ON SMALL GRAIN CEREALS 52

G. Charmet, E. Storlie

IMPLEMENTATION OF GENOME-WIDE SELECTION IN WHEAT 61

М. В Емцева, Т. Т. Ефремова, В. С. Арбузова

ВРЕМЯ КОЛОШЕНИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ И ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ДОМИНАНТНЫМИ АЛЛЕЛЯМИ *Vrn-B1a* И *Vrn-B1c* 69

Е. К. Потокина, В. А. Кошкин, Е. А. Алексеева, И. И. Матвиенко, В. А. Филобок, Л. А. Беспалова

КОМБИНАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Ppd* И *Vrn* ОПРЕДЕЛЯЕТ СРОКИ КОЛОШЕНИЯ У СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ. 77

С. В. Чеботарь, Е. М. Благодарова, Е. А. Куракина, И. В. Семенюк, А. М. Полищук, Н. А. Козуб, И. А. Созинов, А. Н. Хохлов, А. И. Рыбалка, Ю. М. Сиволап

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ХЛЕБОПЕКАРНОЕ КАЧЕСТВО УКРАИНСКИХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ 87

И. Л. Степаненко, О. Г. Смирнова, И. И. Титов

МОДЕЛЬ ГЕННОЙ СЕТИ РЕГУЛЯЦИИ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ 99

Т. И. Одинцова, Т. В. Коростылева, Л. Л. Уткина, Я. А. Андреев, А. А. Славохотова, Е. А. Истомина, В. А. Пухальский, Ц. А. Егоров

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ 107

Э. Р. Давоян, Р. О. Давоян, И. В. Бебякина, О. Р. Давоян, Ю. С. Зубанова, А. Н. Зинченко, А. М. Кравченко

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ В ВИДАХ *AEGILOPS* L., СИНТЕТИЧЕСКИХ ФОРМАХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЯХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ 116

Л. Я. Плотникова, Т. Ю. Штубей

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНОВ ВОЗРАСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ *LR22B*, *LR34*, *LR37* В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА ИХ ДЕЙСТВИЯ 123

А. М. Кохметова, М. Н. Атишова

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ 132

Е. М. Тимонова, И. Н. Леонова, И. А. Белан, Л. П. Россеева, Е. А. Салина

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ХРОМОСОМ *TRITICUM TIMOPHEEVII* НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ 142

Н. В. Трубачеева, Л. А. Кравцова, Э. П. Девяткина, Т. Т. Ефремова, М. Г. Синявская, В. К. Шумный, Л. А. Першина

ГЕТЕРО- И ГОМОПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РАЙОНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И ХЛОРОПЛАСТНОЙ ДНК У ПОТОМКОВ ОТДАЛЕННЫХ ГИБРИДОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ РАЗНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 160

G. A. Chebotar, S. V. Chebotar, Yu. M. Sivolap

DELLA MUTATIONS IN PLANTS WITH SPECIAL EMPHASIS ON WHEAT 170

И. А. Белан, Л. П. Россеева, В. М. Россеев, Е. Д. Бадаева, Ю. И. Зеленский, Н. П. Блохина, С. С. Шепелев, Л. А. Першина

ИЗУЧЕНИЕ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ И АДАПТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ У ЛИНИЙ СОРТА ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ОМСКАЯ 37, НЕСУЩИХ ТРАНСЛОКАЦИИ 1RS.1BL И 7DL-7Ai 178

М. В. Климушина, Н. И. Гладких, М. Г. Дивашук, Л. А. Беспалова, А. В. Васильев, Г. И. Карлов

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Wx* В КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КРАСНОДАРСКОГО НИИСХ им. П. П. ЛУКЬЯНЕНКО 187

К. Х. Махмудова, Е. Д. Богданова, С. С. Кирикович, Е. В. Левитес

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРИЗНАКОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТРИТОНОМ Х-100 У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) 193

Е. К. Хлесткина

ГЕНЫ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИЕ ОКРАСКУ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ПШЕНИЦЫ 202

И. И. Моцный, С. В. Чеботарь, Л. В. Сударчук, А. В. Галаев, Ю. М. Сиволап

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ (1B)1R И ТРАНСЛОКАЦИИ 1BL.1RS У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ 217

О. Г. Смирнова, А. В. Кочетов

ПРОМОТОРЫ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ 224

В. Е. Козлов

СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА ЗИМОСТОЙКОСТЬ В УСЛОВИЯХ СИБИРИ 232

Е. П. Размахнин, Т. М. Размахнина, В. Е. Козлов, Е. И. Гордеева, Н. П. Гончаров, Ю. Г. Галицын, С. Г. Вепрев, В. М. Чекуров

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОМОРОЗОСТОЙКИХ ФОРМ ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ 240

Л. Л. Бильданова, Е. А. Салина, В. К. Шумный

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА И ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ АНТИФРИЗНЫХ БЕЛКОВ 250

В. Н. Бабенко, К. О. Куташев, В. Ф. Матвиенко

НУКЛЕОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ В САТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ДНК РАСТЕНИЙ .271

О. А. Орловская, Л. В. Корень, Л. В. Хотылева

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ (× *TRITICOSECALE* WITTMACK) ПОСРЕДСТВОМ RAPD- И ISSR-МАРКЕРОВ 279

О. Н. Данилевская

ЕГО ЖИЗНЬ БЫЛА ПОДЧИНЕНА ОДНОЙ ЗАДАЧЕ: УЗНАТЬ, КАК РАБОТАЕТ ХРОМОСОМА. К 65-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ГЕНЕТИКА ЕВГЕНИЯ ВИТАЛЬЕВИЧА АНАНЬЕВА (1947–2008) ...285

VAVILOV JOURNAL
OF GENETICS AND BREEDING
FOUNDED IN 1997

Vol. 16
1
March 2012

Content

V.K. Shumny, E.A. Salina

WHEAT IMPROVEMENT – AN IMPORTANT TASK FOR GENETICISTS AND BREEDERS 8

O.P. Mitrofanova

WHEAT GENETIC RESOURCES IN RUSSIA: CURRENT STATUS AND PRE-BREEDING 10

V.P. Shamanin, A.I. Morgunov, J. Manes, Y.I. Zelensky, A.S. Chursin, M.A. Levshunov, I.V. Pototskaya, I.E. Likhenko, T.A. Manko, I.I. Karakoz, A.V. Tabachenko, S.L. Petukhovsky

BREEDING AND GENETIC ESTIMATION OF SPRING BREAD WHEAT POPULATIONS OF THE SIBERIAN SHUTTLE BREEDING NURSERY OF CIMMYT 21

P.I. Stepochkin

THE DEVELOPMENT OF A GENE POOL OF WHEAT AND TRITICALE AND ITS USE IN BREEDING 33

L.A. Bespalova, A.V. Vasilyev, I.B. Ablova, V.A. Filobok, Zh.N. Khudokormova, R.O. Davoyan, E.R. Davoyan, G.I. Karlov, A.A. Soloviev, M.G. Divashuk, N.K. Mayer, M.V. Dudnikov, N.V. Mironenko, O.A. Baranova

USE OF MOLECULAR MARKERS IN WHEAT BREEDING AT THE KRASNODAR LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE 37

R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan, A.N. Zinchenko, E.R. Davoyan, A.M. Kravchenko, Y.S. Zubanova

USE OF SYNTHETIC FORMS IN THE PRESERVATION AND EXPLOITATION OF THE GENE POOL OF WILD COMMON WHEAT RELATIVES 44

A. Didier, L. Bardy, E. Boulat, J. Koenig, A. Lapierre, F. Exbrayat, J. Bordes, F. Balfourier

THE PGR NETWORKS IN FRANCE: COLLABORATION OF USERS AND THE GENETIC RESOURCE CENTRE ON SMALL GRAIN CEREALS 52

G. Charmet, E. Storlie

IMPLEMENTATION OF GENOME-WIDE SELECTION IN WHEAT 61

M. V. Emtseva, T. T. Efremova, V. S. Arbuzova

HEADING TIME OF SUBSTITUTION AND NEAR-ISOGENIC LINES OF COMMON WHEAT WITH DOMINANT ALLELES *Vrn-B1a* AND *Vrn-B1c* 69

E. K. Potokina, V. A. Koshkin, E. A. Alekseeva, I. I. Matvienko, L. A. Bespalova, V. A. Filobok

COMBINATIONS OF ALLELES OF THE *Ppd* AND *Vrn* GENES DETERMINE THE HEADING TIME I N COMMON WHEAT VARIETIES 77

S. V. Chebotar, E. M. Blagodarova, E. A. Kurakina, I. V. Semenyuk, A. M. Polishchuk, N. A. Kozub, I. A. Sozinov, A. N. Khokhlov, A. I. Ribalka, Yu. M. Sivolap

GENETIC POLYMORPHISM OF LOCI DETERMINING BREAD MAKING QUALITY IN UKRAINIAN WHEAT VARIETIES 87

I. L. Stepanenko, O. G. Smirnova, I. I. Titov

A GENE REGULATORY NETWORK MODEL FOR VERNALIZATION AND SEASONAL FLOWERING RESPONSE IN WINTER WHEAT AND BARLEY....99

T. I. Odintsova, T. V. Korostyleva, L. L. Utkina, Ya. A. Andreev, A. A. Slavokhotova, E. A. Istomina, V. A. Pukhal'skii, T. A. Egorov

WHEAT ANTIMICROBIAL PEPTIDES 107

E. R. Davoyan, R. O. Davoyan, I. V. Bebyakina, O. R. Davoyan, Yu. S. Zubanova, A. M. Kravchenko, A. N. Zinchenko

IDENTIFICATION OF LEAF RUST RESISTANCE GENES IN SPECIES OF *AEGILOPS* L., SYNTHETIC FORMS, AND INTROGRESSION LINES OF COMMON WHEAT 116

L. Ya. Plotnikova, T. Yu. Shtubey

EFFECTIVENESS OF THE WHEAT *Lr22b*, *Lr3*4, AND *Lr37* GENES FOR ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST IN WEST SIBERIA AND THE CYTOPHYSIOLOGICAL BASIS OF THEIR ACTION 123

A. M. Kokhmetova, M. N. Atishova

IDENTIFICATION OF STEM RUST RESISTANCE SOURCES IN WHEAT BY USING MOLECULAR MARKERS 132

E. M. Timonova, I. N. Leonova, I. A. Belan, L. P. Rosseeva, E. A. Salina

EFFECT OF CERTAIN CHROMOSOME REGIONS OF *TRITICUM TIMOPHEEVII* ON THE FORMATION OF PEST RESISTANCE AND QUANTITATIVE TRAITS IN COMMON WHEAT 142

N. V. Trubacheeva, L. A. Kravtsova, E. P. Devyatkina, T. T. Efremova, M. G. Sinyavskaya, V. K. Shumny, L. A. Pershina

THE HETEROPLASMIC AND HOMOPLASMIC STATES OF MITOCHONDRIAL AND CHLOROPLAST DNA REGIONS IN THE PROGENIES OF WIDE HYBRIDS OF COMMON WHEAT OF DIFFERENT ORIGINS 160

G. A. Chebotar, S. V. Chebotar, Yu. M. Sivolap

DELLA MUTATIONS IN PLANTS WITH SPECIAL EMPHASIS ON WHEAT 170

I. A. Belan, L. P. Rosseeva, V. M. Rosseev, E. D. Badaeva, Y. I. Zelenskiy, N. P. Blokhina, S. S. Shepelev, L. A. Pershina

EXAMINATION OF ADAPTIVE AND AGRONOMIC CHARACTERS IN LINES OF COMMON WHEAT OMSKAYA 37 BEARING TRANSLOCATIONS 1RS.1BL AND 7DL-7Ai 178

M. V. Klimushina, N. I. Gladkih, M. G. Divashuk, L. A. Bespalova, A. V. Vasilyev, G. I. Karlov

DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF *Wx* GENES IN THE COMMON WHEAT COLLECTION MADE AT THE KRASNODAR LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE 187

K. Kh. Makhmudova, E. D. Bogdanova, S. S. Kirikovich, E. V. Levites

ESTIMATION OF THE STABILITY OF TRAITS INDUCED BY TRITON X-100 IN COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) 193

E. K. Khlestkina

GENES DETERMINING COLORATION OF DIFFERENT ORGANS IN WHEAT 202

I. I. Motsnyy, S. V. Chebotar, L. V. Sudarchuk, A. V. Galaev, Yu. M. Sivolap

IDENTIFICATION OF A (1B)1R SUBSTITUTION AND 1BL.1RS TRANSLOCATION IN WINTER WHEAT INTROGRESSION LINES BY CYTOGENETIC AND MOLECULAR METHODS 217

O. G. Smirnova, A. V. Kochetov

WHEAT PROMOTER SEQUENCES FOR TRANSGENE EXPRESSION 224

V. E. Kozlov

COMPARISON OF METHODS FOR OBTAINING GENETIC DIVERSITY FOR BREEDING WINTER-HARDY WHEAT IN SIBERIA 232

E. P. Razmakhnin, T. M. Razmakhnina, V. E. Kozlov, E. I. Gordeeva, N. P. Goncharov, G. Y. Galitsyn, S. G. Veprev, V. M. Chekurov

RAISE OF HIGH FROST-RESISTANT *AGROPYRON–TRITICUM* HYBRIDS 240

L. L. Bildanova, E. A. Salina, V. K. Shumny

THE MAIN PROPERTIES AND EVOLUTIONARY FEATURES OF ANTIFREEZE PROTEINS 250

V. N. Babenko, K. O. Kutashev, V. F. Matvienko

NUCLEOSOME ORGANIZATION IN PLANT DNA SATELLITES 271

O. A. Orlovskaya, L. V. Koren, L. V. Khotyleva

EVALUATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF SPRING TRITICALE ACCESSIONS (× *TRITICOSECALE* WITTMACK) BASED ON RAPD AND ISSR MARKERS 279

O. N. Danilevskaya

HIS LIFE WAS DEVOTED TO THE STUDY OF CHROMOSOME FUNCTION. TO THE 65-th YEARS BIRTH ANNIVERSARY OF EVGENY VITALIEVICH ANANIEV (1947-2008) 285

УЛУЧШЕНИЕ ПШЕНИЦЫ – АКТУАЛЬНАЯ ЗАДАЧА ГЕНЕТИКОВ И СЕЛЕКЦИОНЕРОВ

«Хлеб всему голова» – гласит народная мудрость, подчеркивая тем самым главенствующую роль зерновых хлебных культур в жизнедеятельности человека. В связи с этим селекции и производству пшеницы – основной продовольственной культуры во многих странах мира – уделяется большое внимание. В последние годы на международных конференциях по генетике и селекции пшеницы все чаще затрагиваются вопросы, связанные со значительным увеличением народонаселения планеты и потребностью повышения производства пшеницы в условиях изменяющегося климата. Селекционеры сталкиваются с необходимостью поиска новых подходов в создании сортов, которые позволили бы увеличить урожайность пшеницы, несмотря на потери от болезней, вредителей и меняющихся погодных и агроэкологических условий. Несомненно, что новые подходы должны базироваться на знаниях генетической обусловленности и контроля хозяйственно ценных признаков пшеницы и генах, контролирующих устойчивость к биотическому (к патогенам и вредителям) и абиотическому стрессу (к засухе, заморозкам, засоленности почвы). Важными моментами являются вовлечение в селекционный процесс молекулярных маркеров, повышение эффективности их применения и снижение себестоимости за счет разработки новых маркеров и систем их диагностики. Это требует знания о первичной структуре геномной ДНК мягкой пшеницы как основы дальнейшего изучения генов и разработки подходов их эффективной интрогрессии для создания новых линий мягкой пшеницы с повышенной устойчивостью.

На важность разработки новых методов на основе фундаментальных исследований в области генетики растений и внедрения в селекционные процессы указывают также инициативы последних лет. Так, в 2005 г. был образован Международный консорциум по секвенированию генома пшеницы (IWGSC), в состав которого входят 28 стран (от России – ИЦиГ СО РАН). В 2011 г. был создан Международный консорциум по улучшению пшеницы (International Research Initiative for Wheat Improvement – IRIWI), который был поддержан министерствами сельского хозяйства стран большой двадцатки.

Опыт работы в направлении консолидации исследований, а также последние достижения российских и зарубежных ученых указывают на то, что в современных условиях базой для улучшения пшеницы являются комплексный научный подход и тесное сотрудничество. Именно это послужило фундаментом для организации Международной конференции «Генетические ресурсы и геномика пшеницы» (г. Новосибирск, 28 августа–1 сентября 2011 г.).

Тематика конференции была сформирована так, чтобы возник конструктивный диалог между исследователями, работающими в различных областях фундаментальной и прикладной науки. Всего в работе конференции приняло участие 90 российских и зарубежных ученых из 10 стран. В рамках конференции была организована Международная школа молодых ученых «Методы биоинформатики и новые технологии секвенирования геномов».

При подведении итогов конференции говорилось о необходимости организации в России национальной программы, направленной на улучшение пшеницы, изучение и расширение ее биоразнообразия и эффективное использование в селекции.

По материалам Международной конференции «Генетические ресурсы и геномика пшеницы» подготовлены статьи, которые вошли в данный выпуск «Вавиловского журнала генетики и селекции».

В.К. Шумный, Е.А. Салина

Участники Международной конференции «Генетические ресурсы и геномика пшеницы» (г. Новосибирск, 28 августа – 1 сентября 2011 г.)

УДК 575.22:633.1

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ ПШЕНИЦЫ В РОССИИ: СОСТОЯНИЕ И ПРЕДСЕЛЕКЦИОННОЕ ИЗУЧЕНИЕ

© 2012 г. **О.П. Митрофанова**

ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова Российской академии сельскохозяйственных наук, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

Поступила в редакцию 16 декабря 2011 г. Принята к публикации 29 декабря 2011 г.

Охарактеризованы одна их крупнейших мировых коллекций генетических ресурсов пшеницы, сохраняемая в живом состоянии во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова, и проводимые с ней исследования. Рассмотрены история развития идей предселекционного изучения коллекции и результаты оценки генетического разнообразия образцов пшеницы с использованием ДНК-маркеров.

Ключевые слова: генетические ресурсы пшеницы, коллекция пшеницы ВИР, предселекционное изучение, молекулярные маркеры.

В последние десятилетия проблемам сохранения и рационального использования генетических ресурсов растений, служащих основой для развития селекции, устойчивого ведения сельского хозяйства и обеспечения продовольственной безопасности, уделяют большое внимание во всем мире. В России такого рода ресурсы сохраняются в основном в виде коллекций во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР). Деятельность по сохранению коллекций включает большое число разноплановых видов работ. Среди них пополнение коллекций новыми образцами, создание системы надежного хранения и поддержания высокой жизнеспособности семян образцов, изучение и выявление среди них источников ценных для селекции признаков, создание доноров, снабжение научных, селекционных и образовательных учреждений исходным материалом, разработка электронной системы документации коллекций, интеграция их в международную систему генетических банков семян и др. В статье кратко охарактеризована коллекция пшеницы ВИР, рассмотрены история развития ее предселекционного изучения, цели и результаты оценки генетического разнообразия коллекционных образцов с использованием ДНК-маркеров.

Состав и характеристика коллекции пшеницы ВИР

В мире общее число сохраняемых в живом виде образцов пшеницы составляет немногим более 850 тыс., которые находятся в 229 коллекциях (http://www.fao.org/agriculture/seed/sow2/en). Россия (ВИР) наряду с США (National Small Grain Collection), Китаем (Institute of Crop Germplasm Resources in The Chinese Academy of Agricultural Sciences), Индией (National Bureau of Plant Genetic Resources), Италией (Istituto di Genetica Vegetale) и Японией (National Institute of Agrobiological Sciences) обладает одной из наиболее значимых по объему и генетическому разнообразию национальных коллекций пшеницы. Большие коллекции этой культуры собраны и активно используются также международными центрами CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) в Мексике и ICARDA (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) в Сирии. Из сравнения данных, опубликованных в 1-м (The 1st Report …, 1998) и 2-м (The 2nd Report …, 1998) докладах ФАО, следует, что за период с 1998 по 2010 гг. мировая коллекция пшеницы суммарно увеличилась на 67,5 тыс. образцов. Наиболее существенный рост, а именно увеличение на 19449, 22612 и 14063 образцов, отмечен для коллекций Индии,

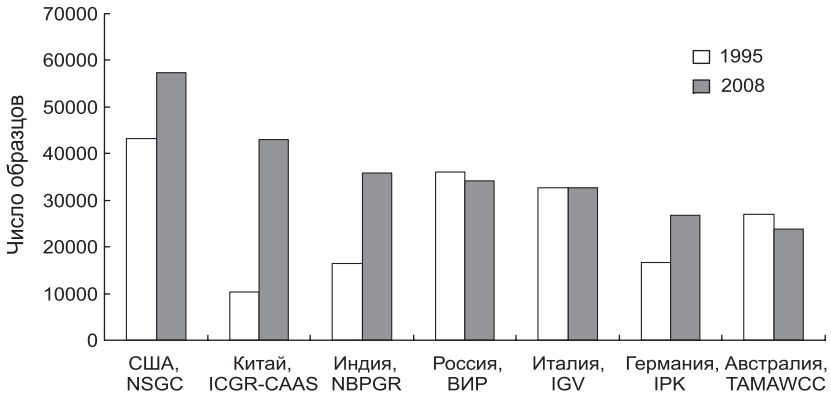


Рис. 1. Динамика коллекций пшеницы, сохраняемых в национальных генетических банках семян.

NSGC – National Small Grain Collection, ICGR-CAAS – Institute of Crop Germplasm Resources in the Chinese Academy of Agricultural Sciences, NBPGR – National Bureau of Plant Genetic Resources, IGV – Istituto di Genetica Vegetale, IPK – The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, TAMAWCC – Tamworth, Australian Winter Cereals Collection.

Китая и США соответственно. Почти в то же самое время, с 2001 по 2011 г., постоянный каталог коллекции пшеницы ВИР пополнился всего 1750 образцами, что составляет 2,6 % от общего увеличения коллекций этой культуры в мире (рис. 1). Незначительные объемы пополнения коллекции ВИР новыми образцами обусловлены целым рядом причин:

– сокращением в результате распада бывшего СССР сети опытных станций ВИР[1] и ограниченными возможностями оставшихся опытных станций для изучения и эффективного репродуцирования пшеницы;

– избирательным привлечением в коллекцию новых образцов. Цели пополнения коллекции: включение в сохраняемый генофонд пшеницы недостающего таксономического, эколого-географического и генетического разнообразия; сохранение сортов, созданных отечественными селекционерами, как селекционные достижения России; предоставление отечественным ученым наиболее выдающихся сортов других стран для вовлечения их в программы скрещиваний;

– хроническим недостаточным финансированием всех видов работ с коллекциями сельскохозяйственных растений.

[1] В ряде стран (Азербайджан, Армения, Грузия, Казахстан, Киргизия, Таджикистан, Туркмения, Украина, Узбекистан), ранее входивших в состав СССР, сформированы собственные коллекции генетических ресурсов возделываемых растений, в том числе за счет дублирования в них образцов из коллекций ВИР.

На 01.10.2011 г. коллекция пшеницы ВИР в постоянном каталоге содержит 38430 образцов, из них 29209 (76 % от общего числа образцов коллекции) относятся к мягкой пшенице *Triticum aestivum* L. Твердая пшеница *T. durum* Desf. представлена 6199 образцами (16,1 %), дикая вместе с примитивной пшеницей – 3022 (7,9 %).

Коллекцию пшеницы начали собирать с 1901 г., первая партия образцов поступила с Тифлисской выставки, о чем имеется запись в одной из регистрационных книг. В формировании коллекции участвовало несколько поколений сотрудников ВИР. Среди них выдающийся ботаник К.А. Флаксбергер (Митрофанова, Удачин, 2007). Его научные труды «Определитель пшениц» (1915), «Пшеницы России» (1917) и монография «Пшеница – род *Triticum* L. pr.p.» (1935) до сих пор остаются востребованными при изучении пшеницы. Огромное разнообразие этой культуры было собрано экспедициями ВИР в 1920–1940 гг. при организации и непосредственном участии в них Н.И. Вавилова. В настоящее время данный оригинальный материал составляет примерно третью часть коллекции и представлен образцами дикой пшеницы, местными и старыми селекционными сортами, полученными путем отбора из местных сортов. Для любого генетического банка семян такой материал имеет особую ценность, поскольку в нем содержится значительный запас комбинаций аллелей генов,

обусловливающих приспособленность пшеницы к различным почвенно-климатическим условиям и устойчивость к биотическим факторам. В 1950–1980-е годы благодаря активному обследованию уже послевоенным поколением сотрудников ВИР первичных и вторичных центров происхождения и разнообразия культурных растений в коллекцию был привлечен большой объем нового материала. В сравнении с этим периодом в последующие годы объемы пополнения коллекции новыми образцами существенно снижены.

Согласно классификации В.Ф. Дорофеева и др. (1979), по числу хромосом в соматических клетках и геномному составу пшеницы можно распределить в пять генетических групп: диплоидные ($2n = 2x = 14$, геномная формула A^uA^u и A^bA^b), тетраплоидные ($2n = 4x = 28$, A^uA^uBB и A^bA^bGG) и гексаплоидные ($2n = 6x = 42$, A^uA^uBBDD и $A^bA^bA^bA^bGG$). В составе этих групп все известные на сегодняшний день виды диких и культурных пшениц, пленчатых и с легким обмолотом (всего 26 видов). Некоторые из видов представлены большим числом ботанических разновидностей.

По биологическому статусу образцы коллекции расклассифицированы на дикие формы, местные сорта, селекционные сорта (снятые с районирования и возделываемые в настоящее время), селекционные и генетические линии, мутанты, искусственно полученные аллополиплоиды различного геномного состава.

Коллекция пшеницы чрезвычайно разнообразна по географическому происхождению образцов: в ней присутствует материал почти из 100 стран Европы, Азии, Африки, Америки и Австралии, в том числе около 6 тыс. образцов (19 % от объема коллекции) из различных регионов России (рис. 2).

В целом уникальность коллекции пшеницы ВИР можно определить следующими показателями:

– более чем вековой историей формирования коллекции (историческая уникальность);

– высоким уровнем таксономического, агроэкологического, географического и генетического разнообразия представленных в ней образцов благодаря особой стратегии сбора материала, которая основана на разработанной Н.И. Вавиловым (1987а) концепции вида. Такой подход означает, что сбору и изучению подлежат не только ценные для практики формы, а все генетическое многообразие форм, репрезентативно представляющее систему изменчивости вида;

– широким размахом внутривидовой изменчивости различных признаков;

– уникальностью территорий и времени сборов, проведенных экспедициями ВИР.

Из истории развития предселекционного изучения пшеницы

Планомерное систематическое изучение пшеницы в России началось с 1907 г. (Митрофанова, Удачин, 2007). В основном оно было направлено на описание морфологического (Флаксбергер, 1935), экологического (Пальмова, 1935) и физиологического (Разумов, 1961) разнообразия форм пшеницы, его классификацию (Вавилов, 1957, 1964), выяснение особенностей географического распределения выявленной изменчивости по различным признакам (Вавилов, 1926; Княгиничев, 1951), разработку проблемы исходного материала для селекции этой культуры (Вавилов, 1935).

В 1931 г. К.А. Флаксбергер и М.М. Якубцинер опубликовали программную статью «Новые пути селекции пшеницы в СССР», в которой

Рис. 2. Относительная доля образцов различных географических регионов в коллекции пшеницы ВИР (по данным на 2008 г.).

показали, что отечественные селекционеры, получающие сорта отбором из местного материала («аналитическая селекция»), «исчерпали все наиболее ценное, что скрывалось в местных пшеницах …» (С. 7). Необходим переход к «синтетической селекции», или «созданию новых, никогда не существовавших в природе сортов, путем искусственного скрещивания» (С. 7). Анализируя успехи зарубежной синтетической селекции, авторы предложили использовать для этого «мировой ассортимент пшениц» (С. 8), при этом они считали, что предварительно следует охарактеризовать материал, провести его эколого-географическое изучение и отобрать нужные типы по наиболее важным хозяйственно-агрономическим признакам. В «разведывательном порядке» на полях каждого из 32 опытных селекционных учреждений было высеяно примерно по 400 образцов, и наиболее продуктивные и/или выделившиеся по каким-либо другим признакам образцы отправлены в селекционные учреждения. Авторы названной выше статьи рассматривали переход от аналитической селекции к синтетической с привлечением предварительно охарактеризованного мирового сортимента пшеницы как новый путь в разрешении проблем отечественного растениеводства. Н.И. Вавилов (1935) поддержал предложенную идею, подчеркивая, что для коренного улучшения пшеницы огромное и решающее значение имеет планомерное использование ее мирового разнообразия. Селекция нуждается в широкой генетической базе, содержащей изменчивость целых видов, прежде всего по физиологическим и агрономическим признакам.

Следует отметить, что идея систематического всестороннего предварительного изучения коллекционных образцов и выявление среди них наиболее ценного исходного материала для селекции оказалась эффективной, на ее основе осуществляется взаимодействие ВИР с селекционными учреждениями России и в наши дни. Общие представления о системе изучения пшеницы, методах и оцениваемых признаках можно получить из методических указаний (Пополнение…, 1999). Комплексное изучение направлено на получение разносторонних сведений о биологических свойствах и хозяйственно ценных признаках образцов, определение их места в системе изменчивости вида и рода, поиск источников и создание доноров по скороспелости, отдельным показателям продуктивности, неспецифической и специфической устойчивости к наиболее вредоносным болезням и вредителям, толерантности к факторам перезимовки, засухе, другим неблагоприятным абиотическим факторам среды. В проведении скрининга коллекции пшеницы вместе с ВИР участвуют и другие институты РАСХН. Результаты скрининга коллекции обычно приводятся в «Каталогах мировой коллекции ВИР», которые вместе с образцами-источниками передаются во все селекционные учреждения России.

По мере усложнения задач селекции пришло понимание важности исчерпывающего знания генетического контроля различных признаков пшеницы, а также генетических характеристик образцов для их эффективного использования. В начале 1990-х годов А.Ф. Мережко (1994) попытался решить проблему формирования широкой генетической базы для селекции по физиологическим и агрономическим признакам через выявление существенной части внутривидовой генотипической изменчивости и создание доноров. Он считал, что для решения современных задач селекции нужна такая система изучения исходного материала, которая позволила бы при исследовании «ограниченного числа специально подобранных линий довольно полно определить генотипический потенциал видов, выявить и включить в селекционное использование гены, играющие особо важную роль в развитии ценных признаков» (С. 109). Введение такой системы генетического изучения растительных ресурсов рассматривалось как дальнейшее развитие учения Н.И. Вавилова (1935) об исходном материале. Программа изучения пшеницы была представлена в виде этапов создания специальных хорошо охарактеризованных в генетическом отношении коллекций внутривидового разнообразия по отдельным признакам (Мережко, 1994). Все этапы и виды выполняемых исследований приведены на рис. 3. Возможности подхода были продемонстрированы на примере изучения высоты растения, устойчивости к бурой ржавчине и скороспелости. Однако интенсивного развития подход не получил из-за

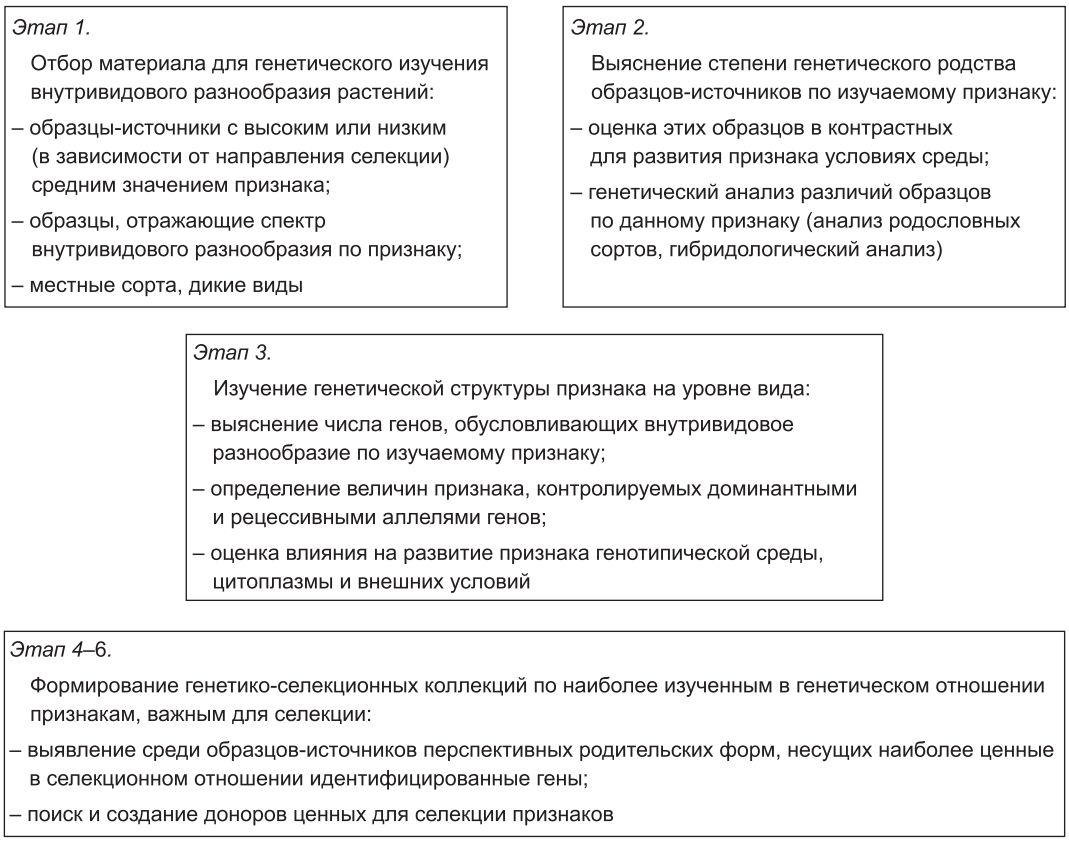


Рис. 3. Этапы создания целевых коллекций внутривидового разнообразия по различным признакам, согласно А.Ф. Мережко (1994).

начавшегося в 1990-х годах кризиса российской науки.

В последние годы в Австралии, Великобритании, Франции и других странах (см., например, http://www.csiro.au, http://www.innovationfarm.co.uk) заметно активизировалась научно-исследовательская деятельность, связанная с предселекционным изучением пшеницы. Разработаны долгосрочные проекты, финансируемые правительствами и частными компаниями, которые направлены на ускорение селекционного процесса, раскрытие механизмов адаптации пшеницы к различным неблагоприятным факторам среды и формирования растениями зерна высокого качества, выявление и создание нового исходного материала, разработку маркер-вспомогательных методов отбора, базирующихся на достижениях современной геномики, протеомики, метаболомики (Haussmann *et al.*, 2004). В России подобного рода проектов пока нет.

Использование маркеров в характеристике генетического разнообразия пшеницы, представленного в коллекции ВИР

Знание организации, содержащейся в коллекции генотипической изменчивости, необходимо не только для ее эффективного использования, но и надежного сохранения и целенаправленного расширения генофонда пшеницы. Чтобы получить общие представления об уровне генетического разнообразия образцов, его временном и географическом распределении, структуре, характеризующейся наличием различных групп генетически близких (сходных) образцов с определенной иерархией межгрупповых связей, используют белковые и ДНК-маркеры.

Как известно, в 1970-е годы благодаря введению в анализ белковых маркеров существенно были расширены исследования по геномному анализу и сортовой идентификации пшеницы,

изучению полиморфизма ее сортов и видов (Молекулярно-биологические аспекты…, 1993). Исследования с применением белковых маркеров не потеряли своей актуальности и в настоящее время (Конарев, 2006). В последнее десятилетие в ВИР запасные белки эндосперма зерновки – глиадины – использовались для определения уровня и характера полиморфизма местных сортов мягкой пшеницы Азии и Африки (Аль-Юсеф, 2009), выявления дублетов среди образцов, полученных в разные годы в коллекцию ВИР из Китая (Пюккенен и др., 2005), оценки подлинности и чистоты семенного материала сортов, содержащих фрагменты или целые хромосомы ржи (Пенева и др., 2002), анализа структуры коллекции пшеницы спельта (Романова, 2001; Каталог… , 2004).

В 1980-е годы появились новые методы изучения полиморфизма ДНК, которые удалось привлечь для характеристики генетического разнообразия и генотипирования образцов коллекции пшеницы. В основном эти исследования выполнены в рамках международных проектов. Были исследованы различные типы ДНК-маркеров – RAPDs, AFLPs и SSRs. Подобранные праймеры и условия для проведения реакции амплификации обеспечивали выявление широкого полиморфизма внутри исследуемых выборок коллекционных образцов или среди отобранных из них единичных типичных растений (генотипов). Одним из важных условий использования молекулярных маркеров были также их случайное распределение в геноме и получение воспроизводимых результатов (Стрельченко и др., 2004). ДНК-маркеры, отвечающие этим требованиям, оказались высокоэффективными для выявления генетического разнообразия как среди местных, так и селекционных сортов (Митрофанова и др., 2005). Почти каждый из сортов имел характерный только для него спектр амплифицированных фрагментов ДНК, а некоторые сразу от 2 до 6 уникальных фрагментов. Сорта (генотипы) с уникальными изменениями в нуклеотидной последовательности ДНК принадлежали разным видам и различались по географическому происхождению (табл. 1). Хотя функциональное значение выявленных различий по изученным участкам генома неизвестно, сохранению таких образцов (генотипов) следует уделять особое внимание.

В других наших исследованиях полиморфизм по 13 микросателлитным локусам, выявляемым с помощью маркеров *Xgwm46*

Таблица 1

Образцы гексаплоидных пшениц с четырьмя и более уникальными ДНК-фрагментами (по: Стрельченко и др., 2004)

Вид, название сорта	№ по каталогу ВИР	Страна происхождения	ДНК-маркеры*
T. aestivum			
Candeal	18340	Испания	OP-B13$_{470}$, *Xcfd71-4d*$_{190}$, *Xgwm46*$_{156}$, *Xgwm312*$_{186}$, *Xgwm337*$_{177}$
Punjab Type 15	23811	Индия	*Xgwm251*$_{99}$, *Xgwm260*$_{186}$, *Xgwm261*$_{173}$
PR 9	23974	Индия	*Xgwm46*$_{190}$, *Xgwm135*$_{149}$, *Xgwm251*$_{121}$, *Xgwm413*$_{112}$
Гюльгери	40182	Россия	UBC386$_{360}$, *Pst*I-GGG/*Mse*I-GAA$_{100}$, *Xgwm44*$_{192}$, *Xgwm251*$_{79}$
T. compactum			
Местный	48997	Афганистан	OP-A16$_{470}$, OP-T17$_{200}$, *Xgwm251*$_{105}$, *Xgwm337*$_{191}$, *Xgwm427*$_{202}$, *Xgwm626*$_{121}$
T. petropavlovskyi			
Майк	43376	Китай	OP-O1$_{580}$, *Pst*I-ACC/*Mse*I-CAC$_{137}$, *Xgwm44*$_{150}$, *Xgwm190*$_{202}$, *Xgwm312*$_{240}$

* В названии маркера цифра в нижнем регистре, например, *Xgwm44*$_{150}$, обозначает длину фрагмента в п.н.

(хромосома 7B), *Xgwm149* (4B), *Xgwm186* (5A), *Xgwm190* (5D), *Xgwm257* (2B), *Xgwm261* (2D), *Xgwm285* (3B), *Xgwm341* (3D), *Xgwm413* (1B), *Xgwm437* (7D), *Xgwm469* (6D), *Xgwm610* (4A) и *Xgwm626* (6B), использовали для характеристики и сравнительной оценки уровня генетического разнообразия выборок образцов (генотипов) мягкой пшеницы, взятых из трех различных генетических банков семян (табл. 2). Суммарная выборка включала 976 образцов, которые представляли 675 мест экспедиционных сборов, расположенных в 48 странах Европы, Азии и Африки. От каждого из образцов было взято одно типичное растение (генотип). В этой выборке выявлено 269 аллелей, из них 191 (71 %) имели встречаемость менее 5 % и рассматривались как редкие аллели, в том числе 40 (15 % от общего числа) были уникальными и обнаружены только у одного из изученных генотипов (Стрельченко и др., 2009). Число аллелей для одного микросателлитного локуса варьировало от 5 (*Xgwm257*) до 32 (*Xgwm186*), а среднее число составило 20,7. По каждому локусу обнаружено от 2 до 4 аллелей, имеющих встречаемость более 10 %, и только 2 аллеля ($Xgwm261_{176}$ и $Xgwm626_{104}$) присутствовали у половины и более генотипов. При сравнении состава аллелей микросателлитных локусов идентифицирована 21 группа, содержащая от 2 до 9 идентичных генотипов. Чаще всего в составе групп были генотипы, представляющие образцы одной и той же коллекции, которые были собраны либо в одном месте, либо на географически близко расположенных территориях. Условно генотипы каждой из таких групп можно считать дублетными. С учетом различий объемов выборок генотипов, представляющих сравниваемые коллекции, был сделан вывод о том, что все они имеют приблизительно одинаковый уровень аллельного разнообразия по изученным 13 микросателлитным локусам и одинаковую долю специфических аллелей (табл. 2). Анализ географического распределения аллелей показал, что наибольшее их разнообразие характерно для генотипов из регионов Центральной Азии и Кавказа.

Чтобы ответить на вопрос, насколько родословная какой-либо совокупности селекционных сортов отражает их генетическое сходство по полиморфизму ДНК, было изучено 124 селекционных и местных сорта мягкой пшеницы двумя методами: с использованием RAPD-маркеров и генеалогическим анализом (Митрофанова и др., 2004а). Установлена средняя степень сопряженности между группами, выявленными в кластерном анализе матрицы коэффициентов родства, рассчитанных на основе изучения родословных, и матрицы коэффициентов сходства, полученных при сравнении RAPD-спектров, по составу входящих в них сортов.

Для изучения степени и характера генетической дифференциации, а также взаимосвязей между гексаплоидными пшеницами с геномной формулой A^uA^uBBDD была сформирована специальная выборка из местных и стародавних сортов в соответствии с агроэкологической классификацией пшеницы, разработанной Н.И. Вавиловым (1957, 1964). Эта классификация основана на историко-географическом делении обширных территорий возделывания важнейших полевых культур на различающиеся по размеру агроэкологические области

Таблица 2

Характеристика образцов из различных генетических банков семян по разнообразию аллелей 13 микросателлитных локусов

Коллекция*	Страна	Число изученных образцов	Число выявленных аллелей микросателлитных локусов (% от суммарного числа)	
			общее	из них специфичных
AWCC	Австралия	187	194 (72)	10
ICARDA	Сирия	338	210 (78)	19
ВИР	Россия	451	236 (88)	32

* AWCC – Australian Winter Cereals Collection, ICARDA – коллекция International Center for Agricultural Research in the Dry Areas.

и районы. Каждая область или район характеризуется в значительной мере единством не только почвенно-климатических условий, но и определенным экологическим типом сортов, обозначенных как агроэкологическая группа. Применительно к полевым культурам Н.И. Вавилов выделил 95 областей и в пределах 3 из них 21 район. Отобранные нами местные сорта представляли все 7 видов гексаплоидной пшеницы: *T. aestivum* L., *T. compactum* Host, *T. sphaerococcum* Perciv., *T. petropavlovskyi* Udacz. et Migusch., *T. macha* Dekapr. et Menabde, *T. spelta* L., *T. vavilovii* (Thum.) Jakubz. Среди них мягкая пшеница (*T. aestivum*) включала представителей 5 подвидов (*irano-turkestanicum* Vav., *indicum* Vav., *sinicum* Vav., *eurasiaticum* Vav., *abyssinicum* Vav.), а карликовая пшеница (*T. compactum*) – 3 (*armeno-turkestanicum* Vav., *eurasiaticum* Vav. и *sinicum* Vav.). В целом сорта относились к 45 агроэкологическим группам и происходили из 44 стран мира. Каждая из агроэкологических групп была представлена 2–25 сортами, а каждый сорт или суммарной выборкой из 5–10 растений, или отдельным растением (генотипом).

RAPD-спектры были проанализированы для 414 образцов и 137 полиморфных продуктов, полученных с использованием 28 праймеров, были включены в матрицу данных (Strelchenko *et al.*, 2005). В анализе микросателлитов 38 олигонуклеотидных пар праймеров использовали для типирования в этой выборке 347 генотипов (Митрофанова и др., 2009). AFLP-анализ был выполнен для того, чтобы охарактеризовать полиморфизм ДНК 81 генотипа с использованием 5 комбинаций PstI- и MseI-праймеров (Стрельченко и др., 2004). Для построения классификаций по результатам анализа полиморфизма ДНК применяли различные методы многомерной статистики (метод главных компонент, кластерный анализ, канонический дискриминантный анализ). Расчеты проводили с использованием STATISTICA 6.0. Степень генотипического сходства (различия) оценивали разными коэффициентами (по Nei and Li, Simple matching или Dice) в зависимости от характера исходных данных.

Полученные результаты продемонстрировали, что независимо от типа ДНК-маркеров и метода классификации наборы изученных местных сортов (генотипов) разделялись на азиатскую и европейскую пшеницу, согласно происхождению материала (Митрофанова и др., 2004б). В пределах каждой из них были выделены группы сортов или генотипов, включающие преимущественно мягкую пшеницу вместе с другими видами, но происходящими из тех же регионов, что и мягкая пшеница. На приведенной дендрограмме (рис. 4), показывающей дифференциацию изученной выборки местных сортов гексаплоидной пшеницы, отдельные группы образовали сорта или генотипы из Центральной Азии, Восточного Китая и Японии, Индии и Пакистана, Кавказа и Турции, Западной и Восточной Европы. Другими словами, в каждой из групп объединялся материал из какого-либо древнего очага земледелия (Вавилов, 1987б). Различия между европейской и азиатской пшеницей, как и между названными группами сортов (генотипов), определялись количественными различиями по частоте встречаемости большого числа SSR-аллелей или RAPD-фрагментов. Более того, изучение 148 образцов «европейской пшеницы» (ssp. *eurasiaticum* Vav.) с помощью RAPD-маркеров выявило тенденцию объединения сортов в соответствии с их принадлежностью к той или иной агроэкологической группе (Стрельченко и др., 2002).

Построенная классификация местных и стародавних сортов или отобранных из них генотипов гексаплоидных пшениц в общих чертах совпадала с агроэкологической классификацией мягкой пшеницы, предложенной Н.И. Вавиловым (1964), но радикально отличалась от известных ботанических классификаций (Miller, 1987). Полиморфизм ДНК большого числа участков генома пшеницы, по-видимому, связан с историей ее длительного возделывания в различных эколого-географических регионах.

Заключение

Традиционно коллекцию генетических ресурсов пшеницы ВИР рассматривают как базу исходного материала для селекции этой культуры, проведения фундаментальных исследований и обучения. Комплексное предселекционное изучение коллекционных образцов имеет свою историю и сложившуюся систему.

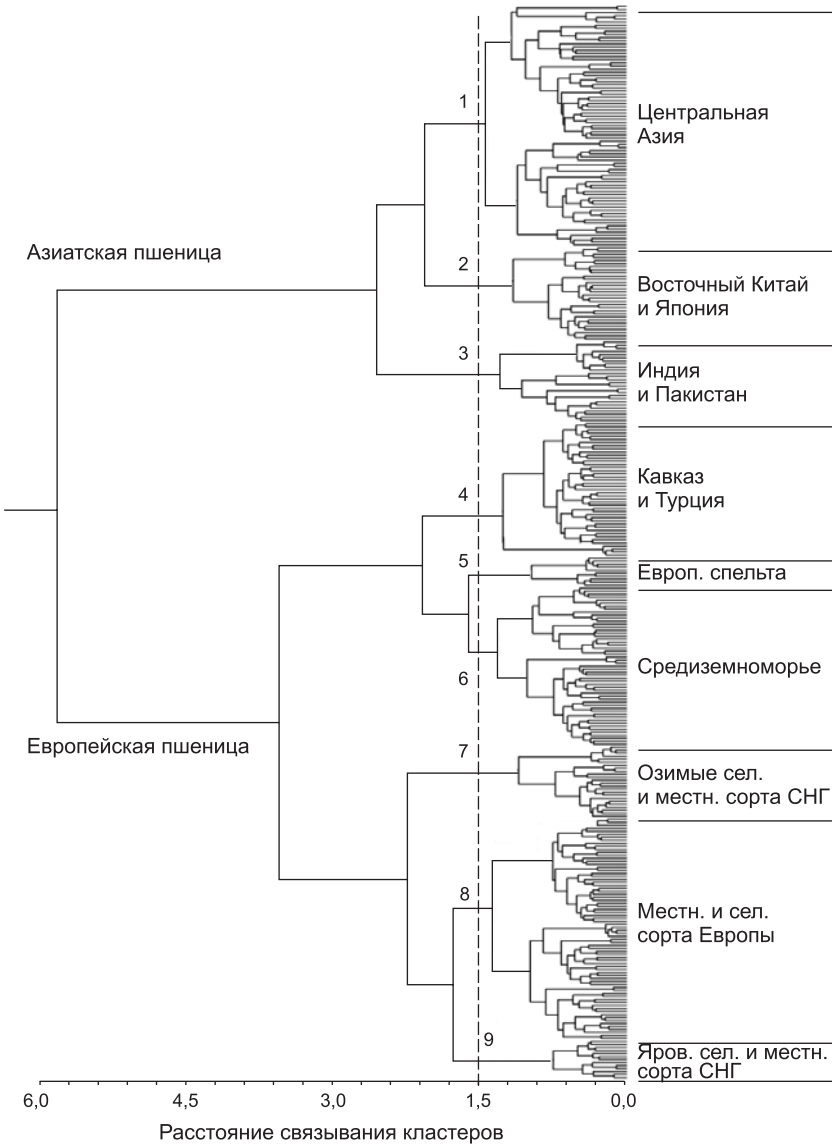


Рис. 4. Дендрограмма, показывающая генетическую дифференциацию 350 местных сортов гексаплоидных пшениц ($2n = 6x = 42$, *A^uA^uBBDD*) на основании сравнения 707 SSRs и 137 RAPDs (по результатам работ Strelchenko *et al.*, 2005, 2010).

В настоящее время оно проводится в основном с целью выявления среди образцов источников ценных признаков, которые могут быть использованы в селекции. В последнее время важную роль в структурировании представленного в коллекции генетического разнообразия пшеницы играют методы анализа белковых и особенно ДНК-маркеров. Знание степени генетического сходства коллекционных образцов, характера их генетических различий и взаимосвязей способствует не только целенаправленному привлечению в коллекцию ВИР нового материала (расширению сохраняемого генофонда пшеницы), но и повышению эффективности формирования выборок для любых исследований, в том числе при подборе исходного материала для селекции.

Литература

Аль-Юсеф В.А.Ч. Фенотипическое и генетическое разнообразие местной яровой мягкой пшеницы Азии и Африки из коллекции ВИР: Автореф. дис. … канд. биол. наук. СПб, 2009. 22 с.

Вавилов Н.И. Центры происхождения культурных растений // Тр. по прикл. ботан. и селекции. 1926. Т. 16. Вып. 2. С. 1–138.

Вавилов Н.И. Линнеевский вид как система (1931а) // Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости. Л.: Наука, 1987а. С. 160–180.

Вавилов Н.И. Проблема происхождения земледелия в свете современных исследований (1931б) // Происхождение и география культурных растений. Л.: Наука, 1987б. С. 161–170.

Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. 244 с.

Вавилов Н.И. Мировые ресурсы зерновых культур и льна. Опыт агроэкологического обозрения важнейших полевых культур. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1957. 462 с.

Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. Пшеница. М.; Л.: Наука, 1964. 122 с.

Дорофеев В.Ф., Филатенко А.А., Мигушова Э.Ф. и др. Культурная флора СССР. Т. I. Пшеница. Л.: Колос, 1979. 347 с.

Каталог мировой коллекции ВИР. СПб: ВИР, 2004. Вып. 752. Редкие виды пшеницы. Генетическое разнообразие коллекции пшеницы спельты (*Triticum spelta* L.). 78 с.

Конарев А.В. Использование молекулярных маркеров в решении проблем генетических ресурсов растений и селекции // Аграрная Россия. 2006. № 6. С. 4–22.

Княгиничев М.И. Биохимия пшеницы. Качество зерна пшеницы в зависимости от сорта и условий возделывания. М.; Л.: Гос. изд-во с.-х. лит-ры. 1951. С. 138–274.

Мережко А.Ф. Проблема доноров в селекции растений. СПб: ВИР, 1994. 127 с.

Митрофанова О.П., Мартынов С.П., Стрельченко П.П. Оценка генетических взаимосвязей сортов мягкой пшеницы по данным их генеалогии и RAPD-анализа // Селекция, семеноводство и возделывание полевых культур: Сб. матер. междунар. науч.-практ. конф. Ростов-на-Дону, 2004а. С. 85–91.

Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В. Структура генетических взаимосвязей между местными сортами гексаплоидных пшениц по данным RAPD-, AFLP- и SSR-анализов // Аграрная Россия. 2004б. № 6. С. 10–19.

Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Балфорьер Ф. Характеристика сорта Безостая 1 и генетически близких ей сортов по данным анализа микросателлитных локусов // Безостая 1 – 50 лет триумфа: Сб. матер. междунар. конф., посвящ. 50-летию создания сорта озимой мягкой пшеницы Безостой 1. Краснодар, 2005. С. 196–204.

Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Конарев А.В., Бальфорьер Ф. Генетическая дифференциация гексаплоидной пшеницы по данным анализа микросателлитных локусов // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1351–1359.

Митрофанова О.П., Удачин Р.А. Константин Андреевич Фляксбергер – основоположник научного изучения пшеницы в России // Информ. вестник ВОГиС. 2007. Т. 11. № 3/4. С. 591–608.

Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, селекции и генетики. Теоретические основы селекции / Под ред. В.Г. Конарева. М.: Колос, 1993. Т. 1. 447 с.

Пальмова Е.Ф. Введение в экологию пшениц. М.; Л.: Огиз. Сельхозгиз, 1935. 74 с.

Пенева Т.И., Митрофанова О.П., Конарев А.В. Белковые маркеры в анализе генетической стабильности сортов пшеницы, содержащих хроматин 1R ржи // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 35–40.

Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале (Методические указания). СПб: ВИР, 1999. 82 с.

Пюккенен В.П., Губарева Н.К., Митрофанова О.П. Поиск возможных дублетов среди коллекционных образцов мягкой пшеницы из Китая // Аграрная Россия. 2005. № 2. С. 31–35.

Разумов В.И. Среда и особенности развития растений. М.; Л.: Сельзохгиз, 1961. 368 с.

Романова Ю.А., Губарева Н.К., Конарев А.В. и др. Исследование коллекции вида пшеницы *Triticum spelta* L. по полиморфизму глиадинов // Генетика. 2001. Т. 37. № 9. С. 1258–1265.

Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Малышев Л.Л. и др. Генетическая дифференциация евразийского подвида мягкой пшеницы по данным RAPD-анализа // Аграрная Россия. 2002. № 3. С. 11–23.

Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Конарев А.В. Сравнение возможностей RAPD-, AFLP- и SSR-маркеров для различения местных сортов гексаплоидных пшениц // Аграрная Россия. 2004. № 6. С. 3–9.

Стрельченко П.П., Митрофанова О.П., Малышев Л.Л. и др. Сравнительная оценка местных сортов мягкой пшеницы, отобранных из трех мировых коллекций, по структуре микросателлитных локусов // Кариология и молекулярная систематика: Сб. науч. работ участников 6-го совещ. по кариологии, кариосистематике и молекулярной филогении растений. СПб, 2009. С. 145–148.

Фляксбергер К.А. Определитель пшениц // Тр. Бюро по прикл. ботанике. 1915. Т. 8. № 1/2. С. 9–210.

Фляксбергер К.А. Пшеницы России. Петроград, 1917. 62 с.

Фляксбергер К.А. Пшеница – род *Triticum* L. pr.p. // Культурная флора СССР. I. Хлебные злаки. Пшеница. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. С. 17–404.

Фляксбергер К.А., Якубцинер М.М. Новые пути селекции пшеницы в СССР // Техника социалистического земледелия, 1931. № 6. С. 6–9.

Haussmann B.I.G., Parzies H.K., Presterl T. *et al*. Plant genetic resources in crop improvement // Plant Genetic Res. 2004. V. 2. No 1. P. 3–21.

Miller T.E. Systematics and evolution // Wheat Breeding, Its Scientific Basis / Ed. F.G.H. Lupton. London; N.Y./USA: Chapman and Hall, 1987. P. 1–30.

Strelchenko P., Mitrofanova O., Terami F. Phylogeography of hexaploid wheat complex based on RAPD data // Genetic Resources and Biotechnology / Eds D. Thangadurai, T. Pullaiah, M.A. Pinheiro de Carvalho. Regency Publications, New Delhi/India. 2005. V. 1. P. 49-70.

Strelchenko P., Mitrofanova O., Balfourier F. Differentiation

of wheat germplasm based on microsatellite loci analysis // 8th Intern. Wheat Conf., 2010. Abstr. of oral and poster presentations. St. Petersburg, Russia. P. 473–474.

The 1-st Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 1998. available at http://apps3.fao.org/wiews/docs/swrfull.pdf.

The 2-nd Report on the State of the World's Plant Genetic Resources for Food and Agriculture. Rome, 2010. available at http://www.fao.org/agriculture/seed/sow2/en.

WHEAT GENETIC RESOURCES IN RUSSIA: CURRENT STATUS AND PRE-BREEDING

O.P. Mitrofanova

N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia,
e-mail: o.mitrofanova@vir.nw.ru

Summary

One of the largest world wheat collections maintained in a living state at the N.I. Vavilov Research Institute of Plant Industry, St. Petersburg, is described, and studies conducted with the collection are reviewed. The history of pre-breeding studies and results of genetic diversity evaluation of wheat samples by means of DNA markers is surveyed.

Key words: wheat genetic resources, Vavilov Institute wheat collection, pre-breeding, molecular markers.

УДК 631.5275 (571.1)

СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИЙ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СИБИРСКОГО ПИТОМНИКА ЧЕЛНОЧНОЙ СЕЛЕКЦИИ СИММИТ

© 2012 г. **В.П. Шаманин[1], А.И. Моргунов[2], Я. Манес[3], Ю.И. Зеленский[4], А.С. Чурсин[1], М.А. Левшунов[1], И.В. Потоцкая[1], И.Е. Лихенко[5], Т.А. Манько[5], И.И. Каракоз[1], А.В. Табаченко[1], С.Л. Петуховский[1]**

[1] Омский государственный аграрный университет, Омск, Россия, e-mail: vpshamanin@rambler.ru;
[2] Представительство СИММИТ в Турции, Анкара, e-mail: a.morgounov@cgiar.org;
[3] Международный центр улучшения кукурузы и пшеницы СИММИТ, Мехико, Мексика, e-mail: y.manes@cgiar.org;
[4] Представительство СИММИТ в Казахстане, Астана, e-mail: y.zelenskiy@cgiar.org;
[5] Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства, Новосибирск, Россия, e-mail: lihenko@mail.ru

Поступила в редакцию 16 ноября 2011 г. Принята к публикации 27 декабря 2011 г.

Челночная селекция является перспективным направлением по созданию адаптивных к неблагоприятным факторам сортов яровой пшеницы путем вовлечения в гибридизацию новых источников хозяйственно ценных признаков из мирового генофонда. Ежегодно в Сибирском питомнике челночной селекции (СПЧС) изучается от 360 до 1 тыс. линий и гибридных популяций яровой мягкой пшеницы, созданных по программе селекции между научными учреждениями Западной Сибири, Казахстана и Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы CIMMYT. Выделен исходный материал, устойчивый к листовым патогенам, для селекции в условиях Западной Сибири. Показана селекционная ценность популяций, созданных по программе челночной селекции. Представлены результаты оценки коллекции сортов, селекционного материала и изогенных линий яровой мягкой пшеницы по генам *Sr* на устойчивость к сибирской популяции рас стеблевой ржавчины в условиях опытного поля Омского ГАУ и к вирулентной расе Ug 99. Выделены гибридные популяции яровой мягкой пшеницы, устойчивые к широкому спектру рас стеблевой и бурой ржавчины, в том числе и к вирулентной расе Ug 99, которые можно будет использовать в различных регионах в случае глобального распространения стеблевой ржавчины.

Ключевые слова: яровая пшеница, исходный материал, челночная селекция, бурая и стеблевая ржавчина, раса Ug 99, изогенные линии по генам *Sr*.

Введение

Сопряженное существование хозяина и паразита, их изменчивость дают богатейший материал для естественного отбора. Результатом сопряженной эволюции может быть образование новых вирулентных рас (Вавилов, 1918). В Западной Сибири недобор урожая от бурой ржавчины (*Puccinia recondite* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*) в годы эпифитотий достигает 30 % (Чулкина и др., 1998). В 1990-е и последующие годы в Западной Сибири создана серия сортов яровой мягкой пшеницы с горизонтальной устойчивостью – Эритроспермум 59, Нива 2, Омская 29 и др. (Зыкин и др., 2000). Ю.А. Христовым (1981) в сложном гибриде из Австралии (к-54049) был идентифицирован ген *LrTr*. На основе аналогов Новосибирской 67 с геном *LrTr* созданы сорта с вертикальной устойчивостью: Терция, Соната, Дуэт, Сибаковская юбилейная и др. (Коваль и др., 2001). За период с 1995 г. сорта с геном *LrTr*, имеющие иммунитет к бурой

ржавчине, получили широкое распространение в Западной Сибири и на Южном Урале, что привело к ускорению эволюции паразита и смене расового состава бурой ржавчины (Мешкова и др., 2008).

С учетом того что восприимчивые сорта в среднем снижают урожайность от бурой ржавчины не менее чем на 0,5 т/га, потери от данного патогена только в Омской области составляют около 400 тыс. т зерна, а в целом по Западной Сибири – в пределах 1,5–2 млн т (Шаманин и др., 2010).

Пристальное внимание селекционеров в последние годы к стеблевой ржавчине пшеницы вызвано озабоченностью в связи с высокой агрессивностью данного патогена. Характерная черта этого вида ржавчины в отличие от бурой заключается в том, что она может практически полностью уничтожать посевы пшеницы. Не случайно во времена холодной войны данный патоген рассматривался в качестве биологического оружия. До 2004–2005 гг. борьба со стеблевой ржавчиной приводилась в качестве классического примера эффективной и долговременной генетической защиты растений. Наличие гена *Sr31* (наряду с несколькими другими генами) во многих возделываемых сортах пшеницы обеспечивало защиту пшеницы от болезни последние 30 лет. В 1999 г. в Уганде было впервые отмечено поражение стеблевой ржавчиной генотипов с геном *Sr31*, которые до того времени стеблевой ржавчиной практически не поражались. Данный единичный случай оповестил мир о появлении новой расы стеблевой ржавчины, названной Ug 99. Потребовалось всего несколько лет для распространения новой расы в сеющих пшеницу регионах Кении и Эфиопии. Уже в 2005–2006 гг. возделывание пшеницы в этих странах без химической обработки было практически невозможно (Singh *et al*., 2008). В 2006 г. раса Ug 99 была обнаружена на пшенице в Йемене и в 2007 г. в Иране, в 2009 г. – в Пакистане. Вблизи находятся Афганистан, Узбекистан, и через Казахстан занос стеблевой расы в Западную Сибирь вполне возможен. Угроза для Казахстана, Западной Сибири, Урала и других регионов России существует. В 2006–2010 гг. более 1 тыс. российских и казахстанских сортов озимой и яровой пшеницы прошли оценку устойчивости в Кении и лишь единичные сорта продемонстрировали устойчивость.

В соответствии с разработанным совместным проектом ОмГАУ–СИММИТ в 2009 г. (май–октябрь) селекционные линии ОмГАУ и сибирская коллекция яровой мягкой пшеницы (всего 330 образцов) были оценены на восприимчивость к вирулентной агрессивной расе стеблевой ржавчины Ug 99 на инфекционном фоне Института фитопатологии в Кении (Африка) (Shamanin, Morgunov, 2009). Основная часть испытанного материала оказалась неустойчивой к Ug 99, и лишь несколько селекционных линий имели повышенную толерантность к данной расе.

Мониторинг 115 изогенных линий по всем известным в настоящее время *Sr* генам, так называемых «ловушек», позволяет понять эффективность конкретных генов *Sr* в условиях региона. Случаи поражения линий с геном *Sr31* послужат сигналом о заносе на территорию Западной Сибири агрессивной расы стеблевой ржавчины Ug 99. В условиях 2009 г. линии с геном *Sr31* имели иммунитет (Шаманин и др., 2010). В связи с интенсивными расообразовательными процессами в популяциях возбудителей наиболее вредоносных болезней, происходящими в последние годы в условиях Западной Сибири, развернуты работы по обогащению и расширению генетической базы для селекции и контроль за эффективностью известных генов устойчивости к болезням (Morgunov *et al*., 2010; Шаманин, 2010; Шаманин и др., 2010).

Еще Н.И. Вавилов обосновал необходимость расширения исходного материала для селекции за счет использования всего разнообразия возделываемых растений планеты и их диких сородичей (Вавилов, 1924). Генетическое родство сортов во многих регионах России и в мире влечет за собой уязвимость и возможную потерю стабильности зернового производства под воздействием негативных биотических и абиотических факторов окружающей среды. Создание сортов яровой мягкой пшеницы с комплексной устойчивостью к неблагоприятным факторам среды в условиях Западной Сибири – одна из актуальных проблем в современном растениеводстве.

В 1998 г. для решения вышеизложенной проблемы селекционные программы Западной Сибири и Казахстана были объединены в Ка-

захстанско-Сибирскую сеть улучшения яровой пшеницы (сокращенно КАСИБ), в которую вошли 7 научных учреждений РФ и 10 учреждений Казахстана. Все участники сети один раз в два года представляют в Казахстанско-Сибирское сортоиспытание (КАСИБ) по 2–4 лучших сорта или линии для совместного изучения. Данные КАСИБ представляют большую ценность, так как они отражают реальную картину поведения сортов и состояния посевов пшеницы на огромной территории (Третован и др., 2006; Zelenskiy *et al*., 2010). Результаты международной программы по испытанию популяций СПЧС и оценки линий по генам *Sr* в условиях Омска (ОмГАУ) и Новосибирска (СибНИИРС) представлены в данной статье.

Материалы и методы

В СИММИТ (Обрегон, Мексика) проводят скрещивания с лучшими адаптивными сортами из Казахстана и Западной Сибири, которые были выделены по данным двух лет испытания. Цель скрещиваний заключается в том, чтобы сочетать адаптивность к условиям западно-сибирского и казахстанского регионов с устойчивостью к болезням (бурой и стеблевой ржавчине), высокой потенциальной урожайностью сортов из СИММИТ и хорошим качеством канадского селекционного материала. Затем проводится отбор получаемого потомства с использованием методологии ведения челночной селекции СИММИТ, согласно которой материал в течение года перемещается между двумя контрастными (различными по условиям выращивания) точками в Мексике: Обрегон (60 м над уровнем моря) и Толука (2640 м над уровнем моря). Программа КАСИБ позволяет ускорить процесс создания нового сорта, с учетом климатических особенностей Мексики, где возможно получение двух урожаев яровой пшеницы в год.

При проведении скрещиваний и испытании линий в СИММИТ (экспериментальная станция в Обрегоне) на площади в 1 га применяется дополнительное освещение. Исходный материал пшеницы, создаваемый по программе челночной селекции, предназначен для возделывания в регионах, расположенных на высоких широтах (> 48°), поэтому он должен обладать требуемым для данных широт уровнем чувствительности к фотопериоду. Иными словами, при коротком дне в Мексике сибирские и казахстанские сорта, которые приспособлены к произрастанию в условиях длинного дня, без дополнительного освещения поздно выколосятся и не созреют. В табл. 1 приведена схема челночной селекции между СИММИТ (Мексика) и научными учреждениями Казахстана и Западной Сибири.

В Мексике в популяциях F_3 проводится отбор более высокостебельных растений, в связи с

Таблица 1

Схема челночной селекции между СИММИТ (Мексика), научными учреждениями Казахстана и Западной Сибири

Место	Фон	Поколение	Селекционный процесс
СИММИТ Обрегон	Поле с подсветкой	F_0–F_1	Скрещивание между сортами и линиями КАСИБ, СИММИТ, США и Канады и размножение
СИММИТ Обрегон	Естественный инфекционный фон	F_2	Отбор форм, устойчивых к листовым патогенам
СИММИТ Обрегон	Естественный инфекционный фон	F_3–F_4	Размножение, отбор устойчивых линий и популяций
Мексика, Эль-Батан	Естественный инфекционный фон	F_4	Тест на качество
Кения (Африка)	Естественный инфекционный фон	F_4	Оценка на устойчивость к стеблевой ржавчине (раса Ug 99)
Казахстан, Сибирь	Естественный фон	F_5 и далее	Отбор на адаптивность в местных условиях
Мексика	Поле с подсветкой	Беккросс	Лучшие линии из КПЧС, материнские формы

тем, что полукарликовые образцы в засушливых условиях Северного Казахстана и Западной Сибири менее урожайные. Помимо отбора на чувствительность к фотопериоду, по высоте растений и по устойчивости к болезням проводится скрининг F_3–F_4 на качество зерна. В Казахстан и Западную Сибирь отправляются только линии и популяции, характеризующиеся твердозерностью, высоким содержанием протеина и хорошей растяжимостью теста. За 11 лет в научных учреждениях Западной Сибири и Казахстана проведена оценка 4085 линий и популяций по 921 комбинации скрещивания – в среднем 4 линии и популяции на комбинацию. Это позволило увеличить генотипическое разнообразие исходного материала в каждом селекционном учреждении – участнике программы КАСИБ.

С 2009 г. ОмГАУ является центром Сибирского питомника челночной селекции. Задача Центра заключается в том, чтобы проводить отбор созданных в СИММИТ гибридных популяций на адаптивность и устойчивость к болезням в условиях Западной Сибири (Шаманин и др., 2009). Отобранные популяции используются в дальнейшем селекционном процессе ОмГАУ и рассылаются всем российским участникам программы КАСИБ.

Сибирский питомник челночной селекции (СПЧС) формируется из популяций, отобранных в питомниках КазРус (сокращение Казахстан–Россия). При испытании популяций в питомниках КазРус и СПЧС повторность однократная, стандартов – не менее чем шестикратная. Сорта-стандарты: Памяти Азиева (среднеранний), Омская 29, Дуэт (среднеспелый), Омская 35 (среднепоздний).

Срок сева поздний: 24–27 мая, для большей вероятности заражения посевов стеблевой ржавчиной, которая чаще поражает пшеницу в поздних сроках сева. Посев сеялкой ССФК-7 на глубину 5 см. Способ посева рядовой. Норма высева 500 зерен/м^2. В течение вегетации проведены фенологические наблюдения, оценка устойчивости к болезням. Селекционные оценки и наблюдения в питомниках проводили в соответствии с общепринятой методикой селекционного процесса (Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). Стандарты и популяции убирались в фазу полной восковой спелости вручную при помощи серпов. Селекционный материал обмолачивался на сноповой молотилке МПСУ-500. Для определения урожайности сухое зерно взвешивалось.

Питомник КАСИБ высевался в 3-кратной повторности на делянках 3 м^2. Учеты и наблюдения аналогичны данным питомников челночной селекции. Методики изучения исходного материала, применяемые в селекционном процессе, и статистической обработки полученных данных – общепринятые (Седловский и др., 1982; Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). Оценка степени поражения стеблевой ржавчиной в условиях опытного поля ОмГАУ проводилась в процентах, а в Кении по следующей шкале: R (Resistance – устойчивый) – 1 балл (поражение 5 %); MR (Moderately resistant – относительно устойчивый) – балл 2–3; S (Susceptible – восприимчивый) – 4 балла (поражение более 60 %) по шкале Cobb (Peterson *et al*., 1948). Для оценки степени устойчивости (восприимчивости) к сибирской популяции рас стеблевой ржавчины известных в настоящее время генов *Sr* были посеяны изогенные линии по генам *Sr*, сорта и линии с их сочетанием (всего 115 линий), так называемые «ловушки». Посев линий-«ловушек» был осуществлен вручную. Каждую линию высевали по 2 рядка длиной 1 м, через каждые 10 номеров размещали стандарт устойчивости к стеблевой ржавчине – сорт Омская 37 и восприимчивости – Чернява 13. Данные линии были получены из СИММИТ. Коллекция сортов яровой мягкой пшеницы, которая была любезно предоставлена для опытов отделом растительных ресурсов СибНИИРС СО РАСХН (раб. пос. Краснообск, Новосибирская обл.), высевалась на опытном поле ОмГАУ на делянках по 1 м^2. Всего 180 сортов. Повторность однократная. Дисперсионный анализ в бесповторных опытах проведен по стандартам, которые высевались не менее чем в 4-кратной повторности. В 2009 г. (май–октябрь) селекционные линии ОмГАУ и коллекция яровой мягкой пшеницы (всего 330 образцов) были оценены на восприимчивость к вирулентной агрессивной расе стеблевой ржачины Ug 99 на естественном фоне Института фитопатологии в Кении (Африка) (Шаманин и др., 2009).

Результаты и их обсуждение

Исходный материал, созданный в СИММИТ, имеет большую ценность в решении проблемы

устойчивости к листовым патогенам, о чем свидетельствует оценка питомников в условиях 2009–2011 гг. (табл. 2).

Характеристика лучших популяций, выделенных за период с 2009 по 2011 гг., представлена в табл. 3. В 2009 г. в КазРус-9 были выделены популяции 71, 87, 227, 272 и 274, сочетающие в себе наибольшую урожайность и устойчивость к болезням. В жестких засушливых условиях вегетации, сложившихся в 2010 г. (КазРус-10), популяции № 1, 17, 205, 248, 347 достоверно превысили стандарт по урожайности. Кроме этого, выделенные образцы характеризуются высокой и средней степенью устойчивости к мучнистой росе. В КазРус-11 популяции № 351, 407, 709, 717 и 796 можно отметить как более пластичные формы в нашем регионе. При создании некоторых популяций в качестве материнских форм были взяты сорта Саратовская 29, Терция, Лютесценс 13, которые проявили адаптивность и были выделены по результатам экологического испытания в питомнике КАСИБ-4 в 2003–2004 гг.

Гибридные популяции и линии, выделенные в питомниках челночной селекции как источники хозяйственно ценных признаков, включены в селекционный процесс лаборатории селекции пшеницы ОмГАУ (табл. 4).

В табл. 5 приведена общая характеристика популяций в СПЧС-1 в 2010 г. по степени устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине. Устойчивость к местным расам бурой и стеблевой ржавчины проверена на опытном поле ОмГАУ (г. Омск), а оценка на устойчивость к вирулентной расе Ug 99 проведена в Кении (Африка). 32 популяции из 140 имеют высокую степень устойчивости к Ug 99. К местным расам популяции СПЧС-1 практически иммунные: по стеблевой ржавчине 135 популяций, по бурой – 132.

По результатам оценки сортов и селекционных линий в Кении выделена рабочая коллекция из 9 источников, наиболее устойчивых к Ug 99. Проведена селекционная оценка выделенных линий в контрольном питомнике ОмГАУ (табл. 6). Лучшие линии: BC1E59/L.20639(22889), NS888 Lr19/Lut.45-95, NS888Lr19 × Kormovaya12, Om.20/Irt.10//L.444/3/Akt, сочетающие устойчивость к бурой, стеблевой ржавчине и мучнистой росе с высокой продуктивностью, будут включены в гибридизацию в качестве источников устойчивости к Ug 99.

В табл. 7 приведены результаты оценки изогенных линий по генам *Sr*. Данные показывают, что некоторые гены являются эффективными в условиях региона. Среди них имеются гены с полной устойчивостью и гены, придающие толерантность к стеблевой ржавчине, что отмечено в табл. 7 соответственно одной и двумя звездочками. Линии с геном *Sr31* проявили

Таблица 2

Результаты изучения гибридных популяций яровой пшеницы по программе челночной селекции (2009–2011 гг.)

Показатель	Питомник			Всего
	КазРус-9	КазРус-10	КазРус-11	
Год	2009	2010	2011	
Количество популяций, шт.	323	461	948	1732
Количество отобранных популяций для СПЧС, шт.	152	154	309	615
Процент отбора	47	33	33	36
Количество отобранных популяций, устойчивых к патогену:				
мучнистой росе	80	60	35	175
бурой ржавчине	112	132	247	491
стеблевой ржавчине	136	141	246	523
Урожайность отобранных популяций, г/м^2, min – max	60,6–357,3	154,3–597,7	95,6–469,6	

Таблица 3

Характеристика лучших популяций в питомниках челночной селекции, отобранных в КазРус для СПЧС

Селекционный номер	Происхождение	Оценка устойчивости к патогенам			Урожайность, г/м^2
		мучнистой росе, балл	бурой ржавчине, балл/%	стеблевой ржавчине, балл/%	
КазРус-9 (2009 г.)					
	Омская 29 стандарт	4	4/25	4/25	308
71	KAZAKHSTANSKAYA-25/2*ATTILA/3/T.DICOCCON PI94625/AE. SQUARROSA (372)//3*PASTOR/4/OMSKAYA 37	8	0	0	315
87	SARATOVSKAYA29/4/KAUZ//PRL/VEE#6/3/BAV92/5/HY439/6/T.DICOCCON PI94625/AE.SQUARROSA (372)//3*PASTOR/7/LUTESCENS 210.99.10	7	4/5	0	357*
227	TERTSIYA/5/CROC_1/AE.SQUARROSA (224)//OPATA/3/BJY/COC//PRL/BOW/4/BJY/COC//PRL/BOW/6/PARUS/PASTOR	6	4/25	0	352*
272	LUTESCENS54//JNRB.5/PIFED/5/SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92	5	0	0	297
274	LUTESCENS54//JNRB.5/PIFED/5/SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92	8	4/10	0	351*
$НСР_{05}$				21	
КазРус-10 (2010 г.)					
	Омская 29 стандарт	3	3/10	2/5	343
1	SONATA*2/5/CHEN/AE.SQ//2*WEAVER/3/BAV92/4/JARU	7	0	0	505*
17	CHELYABA/4/OASIS/SKAUZ//4*BCN/3/WBLL1/5/LUTESCENS 30-94	7	0	0	414*
205	OMSKAYA37/5/SERI*3//RL6010/4*YR/3/PASTOR/4/BAV92	7	0	0	459*
248	LUTESCENS13,KAZ/MUU//LUTESCENS 30-94	8	0	0	386*
347	VISTA//LONG91-1211/SW89.1862/3/EMB16/CBRD//CBRD	7	0	0	411*
$НСР_{05}$				38	
КазРус-11 (2011 г.)					
	Дуэт стандарт	4	3/40	2/40	294
351	ARIA/3/EMB16/CBRD//CBRD/4/LUTESCENS 30-94	6	0	0	311
407	LUTESCENS13,KAZ*2/3/EMB16/CBRD//CBRD	5	0	0	341*
709	UDACHA/3/KA/NAC//TRCH/4/LUTESCENS 1350	6	0	0	373*
717	UDACHA/3/KA/NAC//TRCH/4/LUTESCENS 1350	6	0	0	384*
796	LUTESCENS 196.94.6/KBIRD//LUTESCENS 1350	4	0	0	366*
$НСР_{05}$				41	

* Достоверная прибавка урожайности по сравнению со стандартом.

Таблица 4

Количество линий, выделенных из исходного материала челночной селекции и включенных в селекционный процесс в ОмГАУ (2011 г.)

Тип питомника	Количество
Питомник гибридизации	8
Селекционный питомник первого года	4312
Селекционный питомник второго года	194
Контрольный питомник	32
Итого	4546

Таблица 5

Общая характеристика популяций СПЧС-1 по устойчивости к болезням (2010 г.)

Тип поражения	Оценка устойчивости к Ug 99 в Кении	Оценка в Омске	
		стеблевая ржавчина	бурая ржавчина
R	5	135	132
MR	6	5	7
R-MR	5	0	0
MR-MS	16	0	1
Всего	32	140	140

Таблица 6

Результаты оценки некоторых хозяйственно ценных признаков у линий, устойчивых к расе Ug 99 стеблевой ржавчины (Омск, 2011)

Селекционный номер	Сорт, селекционная линия	Продолжительность вегетационного периода, сут.	Оценка устойчивости к патогенам:			Урожайность, г/м^2
			мучнистая роса, балл	бурая ржавчина, %	стеблевая ржавчина, %/тип поражения	
St	Памяти Азиева	85	3	0	40 MS	246
St	Омская 29	88	5	40	20–60 MS	223
St	Омская 35	90	5	0	10–40 M-MS	272
St	Терция	88	3	15	60–80 MS-S	255
87	Челяба 75	92	5	0	5 R-MR	209
118	Эритр.23334	94	3	0	5 R-MR	205
120	Эритр.23442	92	5	0	5 R-MR	181
61	BC1E59/L.20639(22889)	92	7	0	5 R-MR	257
128	BC2E.59/L.20639 (22918)	92	5	0	5 R-MR	205
143	Lut.23419	92	3	0	5–10 MR	185
94	NS888 Lr19/Lut.45-95	92	7	0	5–10 MR	288
70	NS888Lr19 × Kormovaya12	90	7	0	5 MR	282
89	Om.20/Irt.10//L.444/3/Akt	94	7	5	5 MR	343
$НСР_{05}$					48	

иммуннитет к болезни, и это свидетельствует о том, что заноса на территорию Западной Сибири агрессивной расы стеблевой ржавчины Ug 99 в 2009–2011 гг. не отмечено.

Таким образом, в ближайшие годы на фоне ухудшающейся фитопатологической обстановки, связанной с появлением агрессивных рас бурой и стеблевой ржавчины и возделыванием восприимчивых сортов на основной площади посева пшеницы в Западной Сибири, возможно возрастание потерь урожая яровой пшеницы от стеблевой и бурой ржавчины. Стратегическое направление борьбы с ржавчиной, которое является доминирующим в современной сельскохозяйственной науке в большинстве регионов мира, – это создание устойчивых сортов.

Таблица 7

Оценка изогенных линий по генам *Sr* на устойчивость к стеблевой ржавчине, %/тип поражения

Сорт, линия	Ген *Sr*	Омск			Новосибирск 2011 г.
		2009 г.	2010 г.	2011 г.	
Омская 37 (устойчивый стандарт)	Ген неизвестен	10	0R	5MR	10
Чернява 13 (восприимчивый стандарт)	Ген неизвестен	100	10MS	60MS-S	100
MDS7W2691A/V3498-SR7A, SR10	*Sr7A.Sr10*	10	5R-MR	40M	1–5
BARLETA BENVENUT0.SR8B	*Sr8B*	40	0R	5MR	0
W2691-SR9B	*Sr9B*	10	10 MR	5MR	0
CNSTC2B/LINEE.SR9G	*Sr9G***	0	–	5R-MR	0
W2691 SR10	*Sr10*	40	0R	20M	0
ISR11RA	*Sr11RA*	5	–	5MS	0
CS-TC3B-SR12	*Sr12*	5	0R	10M	0
W2691 SR13	*Sr13***	0	10 MR	5TR	0
W269V2/KST	Ген неизвестен	5	–	20MS	25–45
W2691 *'2/NORKA-SR15*	*Sr15*	10	5R-MR	10MS-S	0
LC/KENYA HUNTER-SR17	*Sr17*	5	5R-MR	5M	1
LC-SR19-MQ	*Sr19-MQ*	10	0R	20MS	0
LC-SR20-MQ	*Sr20-MQ*	10	0R	5M	45
SWSR22T.B.	*Sr22T. B.*	10	0R	5MS	1
EXCHANGE-SR23. SRMCN	*Sr23*	10	0R	5M	25
BTSR24AG	*Sr24AG*	10	0R	10M	25
LC-SR25-ARS	*Sr25*	10	0R	20MS	5
EAGLE-SR26.SR9G	*Sr26.Sr9G***	0	5R-MR	–	0
COORONG TRITICALE-SR27	*Sr27**	0	0R	0R	0
W2691 SR28KT	*Sr28KT*	25	5R-MR	–	6
PUSA/EDCH-SR29	*Sr29*	25	10 MR	20M	4
BRT/WST	Ген неизвестен	0	–	0R	0
W2691 SR31KVZ	*Sr31KVZ*	0	0R	20S	10
C77.19.SR32	*Sr32***	0	0R	5TR	0
T./AE.SQ-SR33.SR5	*Sr33.Sr5***	10	0R	5TR	1
W3763-SR35	*Sr35**	0	0R	0R	0
W2691 SR36TT1	*Sr36TT1*	5	0R	0R	4
W2691 SR37TT2	*Sr37TT2*	0	10MR	10M	0
FR*2/SRTT3-SRTT3. SR10	*SrTT3,Sr10*	10	0R	40MS-S	2
MEDEA AP9D-SRDP-2	*AP9D-SrDP-2**	0	0R	0R	0
BT-SrGt	*SrGt*	10	0R	40MS-S	8
BTSR WLD	*SrWLD***	0	5RMR	0R	2
H44 DERIV-SRH	*SrH*	65	–	10MR	10
ENTRELARGO DE MONTIJO	Ген неизвестен	40	0R	5MR	–
TAF-2-SRAGI	*SrAGI*	65	20M	0R	0
MQ-SR7B,SR18,SR19,SR20,+	*Sr7B.Sr18, Sr19*	65	0R	20MR	100
LOCAL RED	Ген неизвестен	40	–	10MS	–

Продолжение таблицы 7

Сорт, линия	Ген *Sr*	Омск			Новосибирск 2011 г.
		2009 г.	2010 г.	2011 г.	
Seri 82	*Sr31*	0	0R	0R	0
PBW343	*Sr31*	0	0R	0R	0
Cham-8	*Sr31*	0	0R	5TR	1
Sr31(Benno)/6*LMPG	*Sr31*	0	0R	0R	5
LcSr24Ag	*Sr24***	25	0R	0R	25
Sr 24 (Agent)/9*LMPG	*Sr24***	0	–	5M	0–45
Sr36(CI12632)/8*LMPG	*Sr36*	5	5R-MR	60M	1
W2691SrTt-1	*Sr36**	0	0R	0R	1
Eagle	*Sr26***	0	0R	5TR	15
Sr 26/9*LMPG	*Sr26**	0	0R	0R	0–5
Super Seri	*iSr25**	0	0R	0R	0
Coroong	*Sr27**	0	0R	0R	0
Cham-6	Ген неизвестен	10	0R	5TR	1
Cham-10	Ген неизвестен	0	0R	0R	0
EL Nielain	Ген неизвестен	0	5R-MR	0R	5
Utique 96	*Sr31 absent**	0	0R	0R	свч
Hidhab	Ген неизвестен	0	0R	0R	1
Gemmeiza-9	Ген неизвестен	5	0R	5TR	0
Giza-168	*Sr31 absent***	0	0R	5MR	свч
Chamran	Ген неизвестен	0	0R	5TR	0
nqalab91	Ген неизвестен	0	–	5MR	0
Bacanora = Kauz′s′	Ген неизвестен	0	–	0R	0
Cook	*Sr36**	0	–	0R	1–5
Debeira	Ген неизвестен	0	0R	0R	0
Altar (Durum)	Ген неизвестен	0	0R	5TR	–
Pavon 76	*Sr2 complex***	0	0R	5R-MR	0
Buck Buck	*Sr2 +Sr 23***	0	0R	5TR	0
Aguilal	Ген неизвестен	–	0R	5TR	0
Millo (Durum)	Ген неизвестен	0	5MR	20MS	–
Kubsa = Attila	*Sr31 absent**	0	–	5R	0
Thatcher	Ген неизвестен	0	0R	20MR-MS	0
Guard	Ген неизвестен	0	0R	10M	5–100
Kasyon/Genaro-81//Cham4 (Check) ICW92-0279-OAP-4AP-0L-	Ген неизвестен	25	5R-MR	10MS	5
Arim (Durum)	Ген неизвестен	0	–	10MR	0
ER/APM (Barley)	Ген неизвестен	0	0R	0R	65
ISr6-Ra	*Sr6*	0	0R	10MR-MS	–
W2691Sr9b	*Sr9b*	5	10MR	10MR-MS	1
Vemstein	*Sr9e**	0	0R	0R	0
St464Sr13	*Sr13*	0	5R-MR	10M	–
Combination VII	*Sr17(+13)*	5	5R-MR	10 MR	–

Окончание таблицы 7

Сорт, линия	Ген *Sr*	Омск			Новосибирск 2011 г.
		2009 г.	2010 г.	2011 г.	
Pusa 4/Etoile de Choisy	*Sr29*	0	0R	10 MR	5–15
BtSr30Wst	*Sr30*	0	–	0R	5–65
CnsSr32AS	*Sr32***	0	0R	5MR	свч
RL 5405	*Sr33**	0	0R	0R	свч
Mq(2)5*G2919	*Sr35*	25	0R	0R	5
W2691SrTt-2	*Sr37*	65	0R	10MS	свч
RL 6081	*Sr38**	0	–	0R	0
RL 6082	*Sr39*	25	0R	5R-MR	5
RL 6088	*Sr40*	25	5R-MR	5R-MR	5–15
Taf-2	*Sr44*	5	5R-MR	10M	0
W2691SrGtGt	*SrGt*	5	–	–	–
Bt/Wld	*SrWld-1*	0	–	20MS-S	5
Chris	*Sr7a, Sr12,Sr6**	0	0R	0R	0
Norm	Ген неизвестен	0	0R	0R	0
Line ASeln.	*SM4*	10	–	20MS	25–65
W2691 Sr28 kt	*Sr28*	10	–	20MS	25

Примечание. свч – реакция сверхчувствительности; (–) – нет данных (растения засохли).

Наши исследования показали, что на основе метода челночной селекции можно достичь более эффективной оценки исходного материала в контрастных условиях Мексики, Кении и Западной Сибири и отбора наиболее конкурентных гибридных популяций яровой мягкой пшеницы, устойчивых к широкому спектру рас стеблевой ржавчины и других болезней. Обмен материалом между СИММИТ, научными учреждениями Казахстана и Западной Сибири позволяет вовлекать в гибридизацию новые перспективные источники хозяйственно ценных признаков из мирового генофонда и создавать сорта яровой пшеницы с долговременной устойчивостью к болезням. Угроза распространения новой расы стеблевой ржавчины Ug 99 в Западной Сибири вынуждает вести поиск новых источников и генов устойчивости к Ug 99 с целью создания на их основе сортов яровой пшеницы, способных защитить урожай огромного зернопроизводящего региона России. Проведенные исследования позволили создать ценный исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы с комплексной устойчивостью к болезням в условиях Западной Сибири.

Благодарности

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории селекции яровой мягкой пшеницы и озимого тритикале ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, коллективу лаборатории иммунитета СибНИИРС и сотрудникам Национального института фитопатологии Кении за оказанное содействие в проведении исследований.

Литература

Вавилов Н.И. Иммунитет растений к инфекционным заболеваниям // Изв. Петровской с.-х. академии. 1918. Вып. 1/4. 240 с.

Вавилов Н.И. Закономерности в изменчивости растений // Селекция и семеноводство в СССР. Обзор результатов деятельности селекционных и семеноводственных организаций к 1923 году. М.: Новая деревня, 1924. С. 13–46.

Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Изд. 2-е, перераб. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. 427 с.

Зыкин В.А., Шаманин В.П., Белан И.А. Экология пшеницы. Омск: Изд-во ОмГАУ, 2000. 124 с.

Коваль С.Ф., Коваль В.С., Шаманин В.П. Изогенные линии пшеницы. Омск: Омскбланкиздат, 2001. 152 с.

Мешкова Л.В., Россеева Л.П., Шрейдер Е.Р., Сидоров А.В.

Вирулентность патотипов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к TH LR 9 в регионах Сибири и Урала // Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам. Вторая Всерос. конф., Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2008 г. Санкт-Петербург, 2008. С. 70–73.

Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. Алма-Ата: Наука, 1982. С. 47–143.

Третован Р., Моргунов А., Зеленский Ю., Лаге Я. Челночная селекция между Мексикой и Казахстаном: результаты, подробности, перспективы. № 2 (3). 2006. Алматы, 2006. С. 23–27.

Христов Ю.А. Использование в селекции источников устойчивости к бурой ржавчине пшеницы в Сибири: Автореф. дис. … канд. с.-х. наук. Л., 1981. 24 с.

Чулкина В.А. Эпифитотиология (экологические основы защиты растений) / В.А. Чулкина, Е.Ю. Торопова, Г.Я. Стецов // Новосибирск, 1998. 198 с.

Шаманин В.П. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине // Перспективы инновационного развития АПК. Сб. матер. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 420-летию земледелия Зауралья. Тюмень: ТГСХА, 2010. С. 76–83.

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Манес Я., Зеленский Ю.И. Сибирский питомник челночной селекции Международного Центра по улучшению пшеницы и кукурузы (СИММИТ) при ОмГАУ: реальность и перспективы // Вестник Омского гос. аграрного ун-та. 2009. № 3. С. 42–45.

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Манес Я. и др. Селекция яровой мягкой пшеницы к местной популяции и к вирулентной расе Ug 99 стеблевой ржавчины в условиях Западной Сибири // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 1. С. 659–667.

Morgounov A., Ablova I., Babayants O. *et al*. Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine // BGRI 2010 Technical Workshop Oral Presentations. Full Papers and Abstracts. May 30–31, 2010. St Petersburg. St Petersburg, 2010. P. 1–21.

Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Canad. J. Res. 1948. V. 26. P. 496–500.

Shamanin V., Morgunov A. Spring wheat breeding in Western Siberia for resэstance to leaf and stem rust // 12th Intern. Cereal Rusts Powdery Mildews Conf. Antalya. Turkey. October 13–16, 2009. Antalya, Turkey. 2009. P. 82.

Shamanin V., Morgounov A., Zelenskiy Y. *et al*. Spring wheat breeding for leaf and stem rusts under West Siberia environment // 8th Intern. Wheat Conf. June 1–4, 2010. Abstracts of oral poster presentations. St Petersburg. Russia. P. 314.

Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J. *et al*. Will stem rust destroy the world's wheat crop? // Adv. in Agron. 2008. V. 98. 310 p.

Zelenskiy Y., Morgounov A., Manes Y. *et al.* Results of evaluation of spring wheat germplasm through Kazakhstan-Siberia Network // 8th Intern. Wheat Conf. June 1–4, 2010. Abstracts of oral poster presentations. St Petersburg. Russia. P. 200–201.

BREEDING AND GENETIC ESTIMATION OF SPRING BREAD WHEAT POPULATIONS OF THE SIBERIAN SHUTTLE BREEDING NURSERY OF CIMMYT

V.P. Shamanin[1], A.I. Morgunov[2], J. Manes[3], Y.I. Zelensky[4], A.S. Chursin[1], M.A. Levshunov[1], I.V. Pototskaya[1] , I.E. Likhenko[5], T.A. Manko[5], I.I. Karakoz[1], A.V. Tabachenko[1], S.L. Petukhovsky[1]

[1] Omsk State Agrarian University, Omsk, Russia, e-mail: vpshamanin@rambler.ru;
[2] CIMMYT-Turkey, Ankara, Turkey, e-mail: a.morgounov@cgiar.org;
[3] CIMMYT-Mexico, Mexico D.F. Mexico, e-mail: y.manes@cgiar.org;
[4] CIMMYT-Kazakhstan, Astana, Kazakhstan, e-mail: y.zelenskiy@cgiar.org;
[5] Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences, Novosibirsk, Russia, e-mail: lihenko@mail.ru

Summary

Shuttle breeding contributes much to the breeding to common wheat varieties resistant to adverse environmental factors by involving new sources of valuable biological and economical features from the world's gene pool. Annually, 360 to 1000 lines and hybrid populations of spring bread wheat are studied in the Siberian shuttle breeding nursery (SSBN), established according to the shuttle breeding program participated

by scientific institutions of West Siberia, Kazakhstan and the International Maize and Wheat Improvement Centre CIMMYT. Stable forms resistant to fungal diseases in West Siberia have been selected. The breeding value of the population created in the shuttle breeding program is shown. The results of evaluation of the collection of spring bread wheat varieties, breeding material and isogenic lines with *Sr* genes for resistance to Siberian populations of stem rust races under the conditions of the Omsk State Agrarian University experimental field and to the virulent race Ug 99 are presented. We have raised the most competitive hybrid populations of spring bread wheat resistant to a wide range of races of stem and leaf rust, including a virulent race Ug99. They can be used in different regions in case of global dispersal of stem rust.

Key words: spring wheat, starting material, shuttle breeding, leaf and stem rust, race Ug 99, isogenic lines for *Sr* genes.

УДК 575.162

СОЗДАНИЕ И СЕЛЕКЦИОННОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНОФОНДА ПШЕНИЦЫ И ТРИТИКАЛЕ В СИБНИИРС

© 2012 г. **П.И. Стёпочкин**

Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции Россельхозакадемии, Новосибирск, Россия, e-mail: petstep@ngs.ru

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

Изложены результаты работ по формированию генофонда яровой мягкой пшеницы, яровой и озимой тритикале, созданию признаковой, генетической и рабочей коллекций этих культур для условий Сибири. В коллекцию включены также почти все стародавние сорта, созданные в сибирском регионе. Все образцы форм пшеницы и тритикале зарегистрированы в базе паспортных данных под каталожными номерами ГНУ СибНИИРС. Свой каталожный номер имеют также нетипичные формы, выделенные из гетерогенных популяций. Кроме того, создается коллекция спонтанных яровых мутантов, выделенных из популяций озимых культур. На основе сибирского генофонда в СибНИИРС создано 22 сорта яровой пшеницы и 2 сорта озимой тритикале.

Ключевые слова: коллекция, генофонд, сортообразец, пшеница, тритикале.

Растительные ресурсы важны как для будущих поколений людей, так и для национальной селекции. Роль мировых ресурсов для хозяйственного пользования неоднократно подчеркивалась Н.И. Вавиловым (1938, 1987а). Он сформулировал принципы подбора, формирования и использования исходного материала в селекционном процессе, рассматривая исходный материал как источник будущих сортов. Н.И. Вавилов отмечал: «Успех селекционной работы определяется в значительной мере исходным материалом…. Исследования местного материала должны быть базой селекционной работы. Наряду с этим всемерно должны быть использованы мировые ассортименты, включающие как лучшие мировые стандартные сорта, так и все ботаническое разнообразие, известное для данной культуры» (Вавилов, 1987б).

В Государственном научном учреждении Сибирском научно-исследовательском институте растениеводства и селекции (СибНИИРС) создается генофонд растений тритикале и пшеницы на основе имеющейся признаковой, генетической и рабочей коллекций. Признаковые коллекции содержат образцы, контрастные по признакам, т. е. с хорошо выраженным альтернативным их проявлением (количественных признаков: по длительности вегетационного периода, высоте соломины, крупности зерна и др.; качественных признаков: окраске колоса, семян, остистости, опушенности колоса). Генетические коллекции содержат образцы, различающиеся по признакам, но с известным генетическим контролем. Рабочие коллекции охватывают совокупность форм, находящихся в селекционной проработке (Гончаров, 1993).

Коллекции растений культурных и диких видов хранятся во многих генетических банках семян мира, в том числе и во Всероссийском научно-исследовательском институте растениеводства им. Н.И. Вавилова (ВИР), с которым сотрудничает СибНИИРС как его опорный пункт по испытанию коллекционных форм в условиях Западной Сибири. Новыми источниками для пополнения коллекции являются линии и популяции, полученные непосредственно от селекционеров, независимо от того, вошли они в Государственный реестр сортов или нет.

Создание сибирского генофонда новых сортов сельскохозяйственных культур было начато еще в 1920-е годы с привлечением в основном местных растительных ресурсов. Самые круп-

ные достижения тех лет в области селекции полевых культур были связаны, прежде всего, с отбором из популяций генофонда местных сортов наиболее продуктивных форм и линий. Прямым отбором из них были созданы многие сорта пшеницы. К таковым относятся сорта яровой пшеницы Мильтурум 321, Цезиум 111, Балаганка и Смена (Каталог сортов …, 1999). Почти все стародавние селекционные сорта, созданные сибирскими селекционерами, находятся на хранении в СибНИИРС. В этом состоит уникальность коллекции.

Как правило, число семян, впервые поступивших для изучения образцов, ограничено (50–100 шт.), и они высеваются вручную каждый в 1–2 ряда, в зависимости от количества семян, в открытом грунте для размножения в полевых условиях. Лишь на следующий год образцы оцениваются в коллекционном питомнике в сравнении со стандартом на делянках площадью 0,5 м^2 по ряду качественных и количественных признаков и фенологическим фазам развития растений. По результатам трехлетнего изучения дается итоговая оценка образца и выявляется его возможность использования в селекции как источника какого-либо признака или свойства. Семена каждого образца закладываются на хранение на 5–6 лет в бумажные пакеты при комнатной температуре и влажности воздуха. Для восстановления всхожести семян каждый образец высевается вручную через 6 лет на двух рядах длиной 80 см в количестве 80–90 зерен на ряд. Каждый образец, поступивший в ГНУ СибНИИРС, приобретает при регистрации свой собственный пятизначный каталожный номер сибирского генофонда (впереди ставится буква С) и заносится в электронную базу паспортных данных образцов. Если образец уже имеет каталожный номер ВИР, то он становится дополнительным к регистрационному номеру ГНУ СибНИИРС. В базе паспортных данных предусмотрен следующий порядок: регистрационный каталожный номер ГНУ СибНИИРС, каталожный номер ВИР, место происхождения (страна, город, область, где создан сортообразец), название разновидности, название сорта или линии. Например: С-00445, к-60565, Англия, *v. lutescens* L., Maris Anfiela.

Не все коллекционные сортообразцы представляют собой чистые линии. Они могут содержать в своих популяциях различные биотипы и морфотипы растений, а также примеси из-за возможного механического загрязнения, неконтролируемого переопыления растений, спонтанного мутагенеза или продолжающегося расщепления гибридного материала. В тех случаях, когда число морфологически различающихся растений внутри образца-популяции слишком большое, бывает затруднительно выбрать типичные растения для дальнейшего поддержания данного образца в коллекции. Так, при изучении коллекции озимых форм тритикале, полученной из ВИР, в популяциях 5 сортообразцов обнаружены нетипичные растения в различной пропорции (табл.). Так, популяция образца тритикале АДП6 (к-3547) состояла из четырех морфологических типов растений примерно в равной пропорции, которые различались по наличию или отсутствию остей колоса и опушению колосоножки. В этом случае выбрать типичные для данного образца растения не представлялось возможным. Для того чтобы сохранить в коллекции этот образец, отбирали растения всех четырех морфотипов, регистрируя их под разными каталожными номерами ГНУ СибНИИРС, но сохраняя общий каталожный номер ВИР.

Таблица

Число морфотипов растений, выявленных в коллекционных образцах тритикале

Название образца	Каталожный номер ВИР	Происхождение	Число морфотипов, шт.	Доля типичных растений, %
АДП6	к-3547	Украина	4	25+25+25+25
Каприз	к-3584	Россия, Ростовская обл.	2	90
Рус	к-3579	Россия, Краснодарский край	2	95
Pawo	к-3869	Польша	2	98
Алтайский	к-3022	Россия, Алтайский край	6	60

При работе с коллекцией тритикале необходимо колосья типичных растений помещать в бумажные изоляторы до цветения, чтобы предотвратить случайное переопыление и поддержать коллекционный материал в чистоте. Особенно необходимо проводить такую работу с цитогенетически нестабильными октоплоидными тритикале, в популяциях которых могут присутствовать нетипичные растения из-за анеуплоидии, возникающей вследствие нарушений в мейозе. В потомстве анеуплоидных растений могут появляться растения цитогенетически более стабильного гексаплоидного уровня плоидности в результате спонтанного процесса деполиплоидизации (Krolow, 1963; Сасаки, 1978) Это создает дополнительные трудности при работе с октоплоидными тритикале, направленной на сохранение коллекции. С другой стороны, коллекция тритикале таким образом обогащается новыми формами более стабильного уровня плоидности.

В ГНУ СибНИИРС имеется генетическая коллекция тестерных по *Vrn*-генам линий мягкой яровой пшеницы и созданных на их основе линий октоплоидной тритикале. Они используются как в генетических исследованиях по идентификации генов *Vrn* у сортов пшеницы и тритикале, так и при создании селекционного материала и рабочей коллекции.

Помимо различных морфологических типов растений, популяции селекционных сортов озимой пшеницы, но особенно ржи и тритикале, могут содержать разные экоэлементы (Агаев, 1987), которые выявляются при выращивании растений в необычных условиях. Так, при весеннем севе озимых форм пшеницы, ржи и тритикале удалось выделить растения ярового типа, способные переходить к генеративному развитию без прохождения необходимой для озимых культур фазы яровизации (Stepochkin, 2007). Такие растения возникают в результате спонтанного мутагенеза с различной частотой (Стёпочкин, 2005). Частота их возникновения зависит от сроков хранения семян и погодных условий при их формировании и созревании. В СибНИИРС создается рабочая коллекция таких спонтанных мутантов, которая состоит на данный момент из 2 форм пшеницы, 2 форм ржи и 43 форм тритикале. Они используются в гибридизации при создании селекционного материала.

В настоящее время генофонд яровой пшеницы, собранный в СибНИИРС, насчитывает 2450 образцов и ежегодно пополняется 30–50 новыми формами. Генофонд яровых тритикале насчитывает 186 форм, а озимых – 211.

На основе сибирского генофонда и форм пшеницы и тритикале, адаптированных к местным условиям, в СибНИИРС самостоятельно и в соавторстве с учеными других учреждений создано 22 сорта яровой мягкой пшеницы и 2 сорта озимой тритикале. Среди них такие сорта пшеницы, как Новосибирская 1, Новосибирская 67 (в соавторстве с ИЦиГ СО РАН), Приобская, Новосибирская 81, Лютесценс 25, Новосибирская 22, Кантегирская 89 (в соавторстве с НИИАП, Хакасия), Новосибирская 89, Обская 14, Баганская 93 (в соавторстве с Северо-Кулундинской СХОС), Новосибирская 29, Новосибирская 15, Сибирская 12, Удача, Александрина, Баганская 95 (в соавторстве с СибНИИ кормов), Бэль (в соавторстве с ОмГау и Тюменской ГСХА), Памяти Вавенкова, Полюшко, Чагытай (в соавторстве с ГНУ Тувинский НИИСХ), Новосибирская 44, Новосибирская 31, сорта тритикале Цекад 90 и Сирс 57.

Литература

Агаев М.Г. Популяционная изменчивость культурных растений и ее селекционное значение // Генофонд сельскохозяйственных растений и его использование в современной селекции: Сб. науч. тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. Л., 1987. Т. 100. С. 248–260.

Вавилов Н.И. Мировые растительные ресурсы и их использование в селекции // Математика и естествознание в СССР. М.; Л., 1938. С. 575–595.

Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции // Теоретические основы селекции. М.: Наука, 1987а. С. 69–141.

Вавилов Н.И. Селекция как наука // Теоретические основы селекции. М.: Наука, 1987б. С. 7–59.

Гончаров Н.П. Генетические коллекции пшеницы: длина вегетационного периода // Генетические коллекции растений. Новосибирск, 1993. Вып. 1. С. 54–81.

Каталог сортов сельскохозяйственных культур, созданных учеными Сибири и районированных (включенных в Госреестр РФ) в 1929–1998 гг. Новосибирск: СО РАСХН, 1999. 208 с.

Сасаки М. Сложные геномы пшенично-ржаной линии, полученной из октоплоидной // Матер. 14-го междунар. генет. конгр. (Москва, август 1978 г.). М., 1978. С. 187.

Стёпочкин П.И. Факторы, влияющие на частоту возникновения яровых растений в популяциях озимой тритикале // Докл. РАСХН. 2005. № 2. С. 3–6.

Krolow K.-D. Aneuploidie und Fertilitat bei amphidiploiden Weizen Roggen-Bastarden (Triticale). 2. Aneuploidie und Fertilitats-Untersuchungen an einer oktoploiden Triticale-Form mit starker Abregulierungstendenz // Z. Pflanzenzucht. 1963. V. 49. No 3. P. 210–242.

Stepochkin P.I. Study and utilization of spontaneous spring mutations of wheat, rye and triticale in Siberia // Proc. 14th Intern. EWAC Conf. 6–10 May 2007. Istanbul, Turkey. 2007. P. 148–154.

THE DEVELOPMENT OF A GENE POOL OF WHEAT AND TRITICALE AND ITS USE IN BREEDING

P.I. Stepochkin

Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Russian Academy of Agricultural Sciences, Novosibirsk, Russia, e-mail: petstep@ngs.ru

Summary

The results of the work on the development of the gene pool of Siberian spring common wheat and spring and winter triticale are reported. Collections of traits and genes and working collections of these cereals are described. The gene pool includes almost all landraces of Siberian origin. All accessions are registered in the certificate database and have numbers of the Siberian Institute of Plant Industry and Breeding. Atypical forms collected from heterogeneous populations also have their accession numbers. In addition, a collection of spontaneous spring mutants isolated from populations of winter crops is being developed. Twenty two spring common wheat varieties and two winter triticale varieties have been created on the base of the Siberian gene pool developed at the Institute.

Key words: collection, gene pool, accession, wheat, triticale.

УДК 633.111.1:577.2

ПРИМЕНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ им. П.П. ЛУКЬЯНЕНКО

© 2012 г. **Л.А. Беспалова[1], А.В. Васильев[1], И.Б. Аблова[1], В.А. Филобок[1], Ж.Н. Худокормова[1], Р.О. Давоян[1], Э.Р. Давоян[1], Г.И. Карлов[2], А.А. Соловьев[3], М.Г. Дивашук[2], Н.К. Майер[3], М.В. Дудников[3], Н.В. Мироненко[4], О.А. Баранова[4]**

[1] ГНУ Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко Россельхозакадемии, Краснодар, Россия, e-mail: Vasilev2003@inbox.ru;
[2] Центр молекулярной биотехнологии ФБГОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия;
[3] Кафедра генетики и биотехнологии ФБГОУ ВПО Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия;
[4] ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Россельхозакадемии, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 16 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 декабря 2011 г.

В статье описываются первые опыты по применению молекулярных маркеров в селекции озимой пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко (КНИИСХ). Показаны наиболее эффективные точки приложения маркеров при создании новых сортов. Установлено наличие ряда генов, отвечающих за проявление хозяйственно ценных признаков в сортах селекции КНИИСХ.

Ключевые слова: селекция пшеницы, молекулярные маркеры, маркер-опосредованный отбор, MAS, устойчивость к болезням.

В Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко уже более 90 лет успешно проводится работа по созданию новых сортов мягкой и твердой пшеницы озимого, ярового и альтернативного типа развития. В Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию в 2011 г., включено 58 сортов селекции КНИИСХ. Они занимают лидирующее положение в структуре посевных площадей в Северо-Кавказском регионе, широко возделываются в странах Центральной Азии, Закавказья, Украине, Молдавии, в последние годы ряд сортов допущен к использованию в Турции. При создании новых сортов ученые Института используют самые современные подходы, опираясь на традиционные схемы и методы селекции пшеницы, разработанные академиком П.П. Лукьяненко, модифицированные и адаптированные к современным условиям.

Многочисленные факторы, характерные для современного сельскохозяйственного производства, включающие жесткую рыночную конкуренцию, глобальные климатические изменения, ускорение смены патогенного комплекса и его расового состава, требуют от селекционера все большей интенсификации селекционного процесса и предсказуемости результатов с усилением преадаптивной и прецизионной составляющих (Жученко, 2004).

В последние годы в практическую работу селекционера приходит такой мощный инструмент отбора, как молекулярные маркеры. Будучи сцепленными с генами, отвечающими за проявление важнейших хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных растений, они позволяют достоверно провести отбор на уровне индивидуального растения или селекционной линии непосредственно по генотипу, не завуалированному модифицирующим действием средовых факторов. Молекулярные маркеры широко используют в своей работе селекционеры США, Европейского Союза, Австралии, Японии, Китая и других стран. По данным J. Dubcovsky (2004), действующая в США

программа «MAS wheat» в 2004 г. охватывала около 430 проектов, направленных на перенос 43 генов в 75 родительских форм пшеницы.

Мировые разработки в этой области, опубликованные в научных трудах и базах данных сети Интернет, позволили нам приступить к работе по использованию молекулярных маркеров в селекции пшеницы одновременно по нескольким направлениям. Объектами нашей работы стали гены, детерминирующие устойчивость к болезням: бурой (*Lr*), желтой (*Yr*) и стеблевой (*Sr*) видам ржавчины, контролирующие высоту растений (*Rht*), чувствительность к фотопериоду (*Ppd*), потребность в яровизации (*Vrn*), устойчивость к прорастанию на корню (*Vp*) и определяющие состав крахмала (*Wx*), а также локусы количественных признаков, влияющих на устойчивость к фузариозу колоса и пиренофорозу.

Исследования проводятся в сотрудничестве с Центром молекулярной биотехнологии и кафедрой генетики и биотехнологии РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева, лабораторией мониторинга генетической эрозии ГНУ ВИР им. Н.И. Вавилова Россельхозакадемии, лабораторией иммунитета растений к болезням ГНУ ВИЗР Россельхозакадемии.

Внедрение молекулярных маркеров в традиционную схему селекции требует проведения предварительных исследований по изучению их эффективности при отборе и разработке индивидуальной методики для конкретной селекционной программы. В качестве пробного объекта мы выбрали ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr19*. Его присутствие предполагалось в сортах селекции КНИИСХ Яра и Паллада на основании желтой окраски мякиша, обусловленной геном *Y*, который сцеплен с геном *Lr19*. На первом этапе была произведена отработка протокола идентификации гена *Lr19* при помощи микросателлитного маркера STS Lr19-130, опубликованного на сайте Wheat CAP (http://maswheat.ucdavis.edu), и на наборе сортов и линий, которые, по нашим и литературным данным, несут этот ген. Для проверки данных генотипирования был проведен фитопатологический тест при искусственном заражении проростков исследуемых образцов краснодарской популяцией возбудителя бурой ржавчины, собранной на селекционных посевах в КНИИСХ. Полученные данные показали высокую степень совпадения данных оценки по генотипу и фенотипу (Васильев и др., 2009; Vasilyev *et al*., 2010).

Полученная информация о работоспособности и эффективности молекулярного маркера позволила приступить к массовому скринингу селекционного материала, имеющего в родословной сорта и линии с подтвержденным наличием гена *Lr19*. Были обследованы линии контрольного питомника из комбинации Яра/Альмата//Кума. ПЦР-анализ показал присутствие искомого гена у 7 из 19 изученных линий (рис. 1).

Анализ исследуемых линий проводился после браковки по комплексу хозяйственно ценных признаков. Так как информация о наличии у данных линий гена *Lr19* отсутствовала, отбор проводился только на основании оценок по

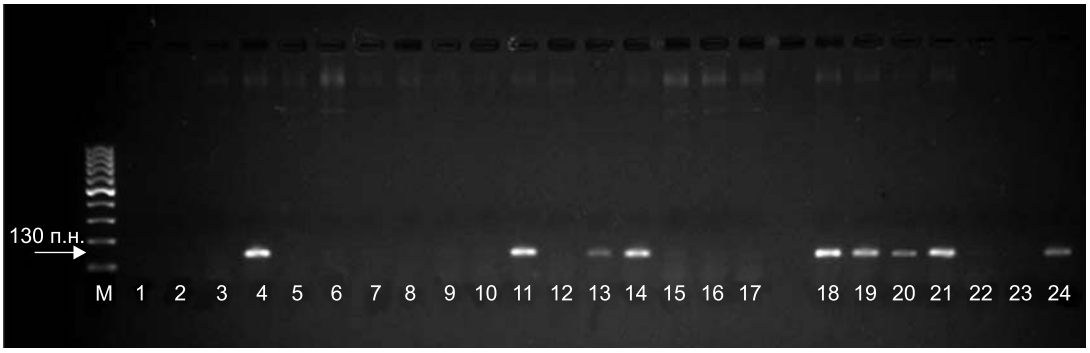


Рис. 1. Электрофорез продуктов амплификации ПЦР-анализа на маркер STS Lr19-130.

1 – Альмата, 13 – Яра, 22 – Кума, 24 – Паллада, 4, 11, 13, 14, 18-21 – линии с геном *Lr19*, 2, 3, 5–10, 12, 15–17 – линии без гена *Lr19*.

другим признакам, в том числе полевой оценке устойчивости к бурой ржавчине. В результате было отобрано и передано в конкурсное сортоиспытание 8 линий, из которых только у двух впоследствии был обнаружен искомый ген. Т. е. 75 % материала изученной гибридной комбинации оказалось неперспективным. В дальнейшем линии, содержащие в генотипе ген *Lr19*, были восстановлены из архива.

Применение молекулярных маркеров незаменимо для задач сочетания нескольких генов в одном сорте (пирамидирования). Известно, что сочетание нескольких генов устойчивости к бурой ржавчине в одном генотипе может обеспечивать более надежную и продолжительную защиту вследствие расширения генетической основы устойчивости (Roelfs *et al*., 1995). Использование традиционных методов оценки устойчивости к бурой ржавчине с созданием искусственных инфекционных фонов позволяет выявлять индивидуальные растения в гибридной популяции, несущие ген устойчивости от донора, а проведение фитопатологического теста при заражении растений изолятами патогена – определять конкретный ген устойчивости. Но создание генотипов с комплексом генов, когда необходимо определить наличие одного гена устойчивости на фоне действия другого, становится очень сложной задачей. Применение молекулярных маркеров для этих целей позволяет решить эту проблему, опираясь не на фенотипическое проявление, а непосредственно на генетическую основу.

Подобные работы по сочетанию в одном генотипе пшеницы нескольких генов устойчивости изложены в работе S.L. Sydenham (2007), описывающей пирамидирование 5 генов и 2 локусов количественных признаков устойчивости к болезням (*Lr19*, *Lr34*, *Sr2*, *Sr26*, *YrSp*, *QYr. sgi-7D* и *QYr.sgi-2B*). D.G. Bonnett с соавт. (2005) описывают работу по сочетанию в одном генотипе генов устойчивости к болезням (*Sr2*, *Lr37*, *Yr17*, *Sr38*) и вредителям (*Cre1*), генов карликовости (*Rht-B1b*, *Rht8*) и генов, определяющих качество зерна (*Glu-B1*, *Glu-D1*, *Glu-A3*).

В 2009 г. нами были проведены скрещивания с целью переноса и пирамидирования генов устойчивости к бурой ржавчине, эффективных в условиях Краснодарского края, в коммерческие сорта селекции КНИИСХ. В качестве источников этих генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr37* и *Lr38*. Преимущество некоторых из них состоит в том, что они были перенесены из диких сородичей пшеницы в составе транслокаций совместно с другими генами устойчивости. Так, ген *Lr19* тесно сцеплен с геном *Sr25*, ген *Lr24* – с геном *Sr24*, ген *Lr37* входит в состав транслокации *VPM* вместе с генами *Yr17* и *Sr38*. В качестве сортов-реципиентов выбраны районированные сорта. Далее были проведены беккроссные скрещивания с целью увеличения доли адаптивного материала в генотипе.

В течение 2010–2011 гг. были произведены массовые анализы на присутствие интрогрессируемого гена в генотипе. Всего было проанализировано 728 растений по всем беккроссным комбинациям. Растения, у которых были идентифицированы искомые гены устойчивости к бурой ржавчине, использовались для повторного беккросса и проведения скрещиваний по объединению нескольких генов в одном генотипе.

Данный этап нашей работы представляет собой упрощенный вариант маркер-опосредованного беккроссирования. Для проведения его в полном объеме и дальнейшего насыщения рекуррентным родителем необходимо отбирать растения, несущие максимальное количество его генетического материала и желательные участки хромосом от сорта-донора хозяйственно ценного признака (Collard *et al*., 2005). Как показано в работе M. Frisch с соавт. (1999), при использовании достаточного числа маркеров, распределенных равномерно по всему геному, можно достичь 94,6 % совпадения с одним из родителей уже за два беккросса. Однако нами был целенаправленно выбран упрощенный вариант, при котором отбираются растения, наиболее приближенные к сорту-реципиенту по фенотипу и обладающие целевым геном от сорта-донора. На данном этапе развития работы по внедрению маркеров мы предпочли низкозатратный вариант работы.

В 2011 г. нами был проведен анализ коллекции коммерческих сортов на присутствие пшенично-ржаных транслокаций 1BL/1RS и 1AL/1RS, несущих ряд генов устойчивости к болезням (*Lr26*, *Sr31*, *Yr9* и *Pm8*) и обусловливающих комплекс адаптивных характеристик.

Для анализа использовали маркер SCM9 (Weng *et al*., 2007). У 36 из 100 изученных образцов выявлена амплификация фрагментов, специфичных для 1BL/1RS:

Аврора	Колос
Айвина	Краснодарская 70
Афина	Красота
Бригада	Купава
Васса	Курень
Веда	Миллениум
Верта	Первица
Вершина	Половчанка
Вита	Полукарликовая 49
Восторг	Ростислав
Горлица	Руфа
Дея	Селянка
Дока	Соратница
Зимница	Таня
Иришка	Утриш
Кавказ	Фортуна
Княжна	Южанка
Коллега	Юка

Транслокация 1AL/1RS не выявлена. Результаты выявления транслокации 1BL/1RS при использовании маркера SCM9 на 98 % совпали с данными отдела технологии и биохимии зерна, основанными на присутствии аллеля *Gli-1B3*. Таким образом, данный ПЦР-маркер может быть использован для анализа ранних поколений селекционного материала, в то время как биохимический маркер на присутствие *Gli-1B3* на ранних этапах практически не используется.

С применением молекулярных маркеров стало возможным на более раннем этапе селекционного процесса идентифицировать материал на присутствие транслокации. Нами была выделена ДНК растений 50 линий комбинации 02-82t (Reykokko/Haruchiban) и 50 линий комбинации 06-13t (91-9t11/WSP96.6) в трехкратной повторности. Установлено достоверное наличие транслокации 1BL/1RS в линиях Л.02-82t12-13, Л.02-82t12-37 и Л.02-82t12-50. Помимо этого в трех линиях данной комбинации выявлено расщепление по изучаемому локусу. В комбинации 06-13t транслокация 1BL/1RS выявлена у 21 линии, у 13 линий выявлено расщепление.

В свете возрастающей угрозы распространения новой высокоагрессивной расы стеблевой ржавчины Ug99 особое значение приобретает селекция на устойчивость к стеблевой ржавчине. Нами был проведен скрининг набора из 24 сортов КНИИСХ на наличие генов *Sr24*, *Sr25*, *Sr36* и *Sr31* с помощью молекулярных маркеров Sr24#50, Gb, Xwmc477 и SCM9 соответственно (http://maswheat.ucdavis.edu, Weng *et al*., 2007). В результате было выявлено присутствие в сорте Паллада гена *Sr25*, эффективного по отношению к Ug99 (Singh *et al*., 2006). В сортах Аврора, Кавказ, Восторг, Афина, Иришка, Айвина и Красота идентифицирован ген *Sr31*. В настоящее время проводится анализ присутствия других генов устойчивости к стеблевой ржавчине в коллекции сортов КНИИСХ.

Важным моментом при внедрении молекулярных маркеров в селекцию является определение их эффективности с точки зрения времени, удобства, трудозатрат и т. д. Затраты на проведение лабораторных анализов должны быть оправданы. С одной стороны, если селектируемый признак достаточно легко определяется по фенотипу или условия для его проявления возникают стабильно, то применение молекулярных маркеров для его отбора не всегда оправданно. С другой стороны, молекулярные маркеры могут оказаться незаменимым инструментом при работе с признаками, работа с которыми требует не только значительных материальных затрат, но и времени.

К таким работам можно отнести селекцию на устойчивость к фузариозу колоса. В 2011 г. группа линий, созданных на основе сортов Дельта и Дея, обладающих неспецифической устойчивостью, и сорта Sumai 3, общепризнанного донора специфической устойчивости, была протестирована на присутствие локуса количественных признаков *QFhs.ndsu-3BS*. С помощью микросателлитного маркера *Xgwm493* (Anderson *et al*., 2001), сцепленного с данным локусом, был обнаружен полиморфизм среди изучаемых линий (табл.).

Все изучаемые линии показали устойчивость на уровне сорта Sumai 3 или несущественно ниже. Постоянный отбор с использованием искусственных инфекционных фонов привел к выбраковке неустойчивых форм. Но при этом передать локус специфической устойчивости от Sumai 3 не получилось. Чем была обусловлена относительная устойчивость той или иной линии – специфической устойчивостью от Sumai 3

Таблица

Идентификация локуса *QFhs.ndsu-3BS* и поражение фузариозом колоса при искусственном заражении линий озимой мягкой пшеницы и сорта Sumai 3 в 2011 г.

№	Сорт, линия	Комбинация	Специфичный фрагмент	Степень поражения		
				по колосу, балл / тип	по зерну	
					балл	%
1	Sumai 3		+	1 / VR	3	2,6
2	13–04 f 1	Дея9/Sumai 3	–	1 / VR	3	6,4
3	13–04 f 6	Дея9/Sumai 3	–	1–2 / VR	3	3,9
4	13–04 f 8	Дея9/Sumai 3	–	5–9 / S	3	9,6
5	13–04 f 9	Дея9/Sumai 3	–	1 / VR	2	1,1
6	13–04 f 10	Дея9/Sumai 3	+	1 / VR	3	5,9
7	170 f 1	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1 / VR	3	4,4
8	170 f 2	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1–2 / VR	1	0,0
9	170 f 3	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	гет./+	1–3 / R	3	6,5
10	170 f 4	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	+	1–2 / VR	3	4,3
11	170 f 5	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1–2 / VR	3	2,3
12	170 f 6	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1 / VR	3	4,5
13	170 f 7	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1 / VR	4	14,2
14	170 f 11	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	–	1 / VR	4	16,0
15	170 f 12	Дельта/Sumai 3 aut//Дельта	гет./+	1 / VR	3	2,9

Обозначения. «–», «+» отсутствие, присутствие фрагмента, «гет./+» – гетерогенное присутствие фрагмента, «S» – восприимчивый тип реакции, «R» – устойчивый тип реакции, «VR» – высокоустойчивый тип реакции.

или неспецифической от сортов Дельта и Дея – до момента проведения анализа ясно не было. Проведенный с помощью молекулярного маркера анализ позволил решить эту задачу и отобрать наиболее перспективные линии для создания сортов, устойчивых к фузариозу колоса.

В 2010 г. программа по переносу локусов специфической устойчивости от Sumai 3 в коммерческие сорта КНИИСХ была запущена заново. С этой целью были проведены серии скрещиваний с рядом коммерческих сортов. С 2012 г. планируется массовый скрининг растений F_2 с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с локусами *QFhs.ndsu-3BS* (*Fhb1*), *Qfhs.ifa-5A* и *Fhb2* (Buerstmayr *et al*., 2009).

Применение молекулярных маркеров может существенно облегчить контроль признака устойчивости к прорастанию на корню. Этот признак в погодно-климатических условиях г. Краснодара проявляется нерегулярно. Но в случае дождливой погоды во время уборки отдельные сорта могут сильно прорастать на корню. В 2010 г. нами был проанализирован набор из 37 сортов КНИИСХ на аллельное состояние гена *Vp-1B*, контролирующего устойчивость к прорастанию на корню при помощи STS-маркера *Vp1B3* (Yang *et al.,* 2007). У 31 сорта присутствовал аллель *Vp-1Bc*, ассоциирующийся с устойчивостью к прорастанию. У сортов Васса, Фортуна, Коллега, Веда, Дока и Первица обнаружен аллель *Vp-1Ba*, отрицательно влияющий на устойчивость к прорастанию на корню. Данное направление работы требует дальнейших исследований по установлению связи аллельного состояния изучаемого гена с прорастанием на фоне генплазмы краснозерной пшеницы местного генофонда, так как изначально данные закономерности были выявлены китайскими исследователями для белозерной пшеницы.

С целью характеристики генотипов коммерческих сортов по генам редукции высоты, имеющим важное значение при создании сортов интенсивного типа, нами было проведено тестирование коллекции из 96 сортов КНИИСХ разных этапов селекции, двух мутантных линий (86КПМ684, М1606ул.) и двух стандарт-

ных сортов (Norin 10, Novosadska Rana 1) на наличие генов *RhtB1b* (*Rht1*), *RhtD1b* (*Rht2*) и аллельного состояния гена *Rht8*. Для определения *RhtB1b* и *RhtD1b* использовали внутригенные маркеры (Ellis *et al.*, 2002), ген *Rht8* идентифицировали с помощью микросателлитного маркера *Xgwm261* (Korzun *et al*., 1998) Установлено присутствие гена *RhtB1b* у 40 образцов из изученного набора, *RhtD1b* – у 13. Ген *Rht8* обнаружен у всех сортов в разных аллельных состояниях: *Rht8a* (дикий тип) – у 2 сортов, *Rht8b* – 9, *Rht8c* – 75, *Rht8g* – 3. У 8 сортов были амплифицированы фрагменты с не специфичной ни для одной из изученных аллелей длиной (194, 202, 204, 211, 213 п.н.).

С целью выявления мутантных аллелей по генам *Waxy*, контролирующим содержание амилопектина в крахмале зерна пшеницы, был проведен анализ коллекции из 98 сортов КНИИСХ разных этапов селекции на аллельное состояние генов *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1*. На основании амплификации различных систем молекулярных маркеров (Nakamura *et al*., 2002; Vanzetti *et al*., 2009; Дивашук и др., 2011) было обнаружено два сорта, несущих аллели *Wx-B1e* гена *Wx-B1* (Нота и Ласточка) и два сорта, несущих нуль-аллели *Wx-A1b* гена *Wx-A1* (Сила и Старшина). Данные сорта можно использовать в качестве основы для создания сортов мягкой пшеницы с модифицированным составом крахмала.

Таким образом, проведенные нами начальные исследования по применению молекулярных маркеров в практической работе по выведению новых сортов пшеницы показали, что их использование может существенно повысить эффективность и облегчить работу селекционера. С появлением на рынке нового высокопроизводительного оборудования для генотипирования селекционного материала эти анализы существенно дешевеют, что позволяет более широко внедрять их в рутинную селекционную работу.

Необходимо также отметить, что полноценная работа по внедрению молекулярных маркеров требует изучения новых объектов с учетом требований конкретной селекционной программы. Это могут быть хозяйственно ценные признаки с еще невыясненной генетической основой, неизученные аллельные вариации местного генетического фонда и т. д. Подобные работы фундаментального характера под заказ прикладной научной программы требуют комплексного подхода и мобилизации новейших достижений в области генетики, биотехнологии, молекулярной биологии и селекции. Только совместными усилиями специалистов этих и других областей науки можно будет полноценно использовать все преимущества молекулярных маркеров для решения практических задач по выведению новых сортов сельскохозяйственных культур.

Литература

Васильев А.В., Беспалова Л.А., Филобок В.А. Использование ДНК-маркеров в селекции озимой пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Научное обеспечение агропромышленного комплекса: Матер. III всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых. Краснодар, 18–20 ноября 2009. Краснодар: КубГАУ, 2009. С. 11–12.

Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1–5.

Жученко А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России (теория и практика). М.: ООО «Издательство Агрорус», 2004. 1109 с.

Anderson J.A., Stack R.W., Liu S. *et al*. DNA markers for Fusarium head blight resistance QTLs its two wheat populations // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 102. No 8. P. 1164–1168.

Bonnett D.G., Rebetzke G.J., Spielmeyer W. Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding // Mol. Breeding. 2005. V. 15. P. 75–85.

Buerstmayr H., Ban T., Anderson J.A. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review // Plant Breeding. 2009. V. 128. P. 1–26.

Collard B.C.Y., Jahufer M.Z.Z., Brouwer J.B., Pang E.C.K. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts // Euphytica. 2005. V. 142. P. 169–196.

Dubcovsky J. Marker-assisted selection in public breeding programs: the wheat experience // Crop Sci. 2004. V. 44. P. 1895–1898.

Ellis M.H., Spielmeyer W., Gale K.R. *et al*. 'Perfect' markers for the Rht-B1b and Rht-D1b dwarfing genes in wheat // Theor. Appl. Genet. 2002. No 105. P. 1038–1042.

Frisch M., Bohn M., Melchinger A.E. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene // Crop. Sci.1999. V. 39. P. 1895–1898.

Korzun V., Roder M.S., Ganal 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.

Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Kondo M. Rapid classification of partial waxy mutants using PCR-based markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1150–1156.

Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust Diseases of Wheat: Concepts and Methods of Disease Management. Mexico, D.F.: CIMMYT 1995. 81 p.

Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y. *et al*. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen // CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 2006. 1. N 054. DOI:10.1079/PAVSNNR20061054.

Sydenham S.L. Pyramiding wheat rust resistance genes using marker-assisted selection. Master's theses, University of Free State, Republic of South Africa. 2007. Available at http://etd.uovs.ac.za/ETD-db//theses/available/etd-02052009-140213/unrestricted/SydenhamSL.pdf.

Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M. *et al*. Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplasm // Electronic J. Biotechnol. 2009. V. 12. No 1. P. 1–9.

Vasilyev A.V., Bespalova L.A., Karlov G.I. *et al*. Marker-assisted selection for leaf rust resistance in the winter wheat in Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture // Abstr. of oral and poster presentations of 8th Intern. Wheat Conf. St. Petersburg, June 1–4, 2010. St. Petersburg. 2010. P. 322–323.

Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background // Plant Breeding. 2007. V. 126. P. 482–486.

Yang Y., Zhao X.L., Xia L.Q. *et al*. Development and validation of a Viviparous-1 STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese wheats // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. P. 971–980.

USE OF MOLECULAR MARKERS IN WHEAT BREEDING AT THE KRASNODAR LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE

L.A. Bespalova[1], A.V. Vasilyev[1], I.B. Ablova[1], V.A.Filobok[1], Zh.N. Khudokormova[1], R.O. Davoyan[1], E.R. Davoyan[1], G.I. Karlov[2], A.A. Soloviev[3], M.G. Divashuk[2], N.K. Mayer[3], M.V. Dudnikov[3], N.V. Mironenko[4], O.A. Baranova[4]

[1] Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia, e-mail: Vasilev2003@inbox.ru;
[2] Centre for Molecular Biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;
[3] Department of genetics and biotechnology, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia;
[4] All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

Summary

Pilot experiments on molecular marker application in breeding of winter wheat at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture (KNIISH) are described. The most efficient ways of marker application in creating new cultivars are outlined. A variety of genes responsible for valuable agronomic traits in KNIISH varieties have been detected.

Key words: wheat breeding, molecular markers, marker-mediated selection, MAS, pest resistance.

УДК 576.3:633.111.1:631.523

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ФОРМЫ КАК ОСНОВА ДЛЯ СОХРАНЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ГЕНОФОНДА ДИКИХ СОРОДИЧЕЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, О.Р. Давоян, А.Н. Зинченко, Э.Р. Давоян, А.М. Кравченко, Ю.С. Зубанова**

Краснодарский НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия, e-mail: davoyanro@mail.ru

Поступила в редакцию 11 ноября 2011 г. Принята к публикации 26 декабря 2011 г.

Представлены результаты изучения и использования синтетической геномно-добавленной формы *Triticum miguschovae* (*T. militinae*/*Aegilops tauschii*) и геномно-замещенных форм Авродес, Аврозис, Авролата, Авротата, Авроале и Аврокум. В геномно-замещенных формах геном D мягкой пшеницы сорта Аврора был замещен соответственно на геномы *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata*, *Secale cereale* и *Agropyron glaucum*. Синтетические формы представляют собой уникальную генетическую основу для сохранения и использования генофонда диких сородичей в селекции мягкой пшеницы. На их основе получены вторичные рекомбинантные синтетики (RS формы) с геномными формулами BBAADS, BBAADR и BBAASS^{sh}, цитологически стабильные интрогрессивные линии, сочетающие высокое содержание белка с устойчивостью к болезням. С использованием полученных интрогрессивных линий создано 5 сортов озимой мягкой пшеницы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, синтетические формы, цитологический анализ, интрогрессивные линии.

Потенциальная урожайность мягкой пшеницы во многом зависит от устойчивости возделываемых сортов к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам внешней среды. Генетического материала самой мягкой пшеницы недостаточно для решения этой проблемы. В особенности это касается генов устойчивости к болезням, ограниченное разнообразие которых является одним из основных лимитирующих факторов селекции.

Значительный резерв генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, находится в генофонде многочисленных родственных мягкой пшенице видов и родов. Многие из них были с успехом использованы для передачи таких признаков в мягкую пшеницу (Knott, 1987; Jiang *et al.*, 1994). Так, в настоящее время значительная часть эффективных генов устойчивости к болезням происходит из этого генофонда (McIntosh *et al.*, 2005).

Существует лишь небольшое число сородичей, хромосомы которых способны конъюгировать с хромосомами пшеницы, что позволяет переносить полезные гены данных видов в пшеницу путем прямого скрещивания. Для большинства же видов необходимо использование специальных приемов хромосомной инженерии, с тем чтобы их генетическое разнообразие преобразовать в форму, доступную для традиционной селекции (Sears, 1972; Knott, 1987; Feldman, 1988). Одним из таких методов является создание и использование синтетических геномно-замещенных и геномно-добавленных форм в качестве «мостиков» для передачи генетического материала от диких сородичей. Следует также отметить актуальность сохранения генофонда диких сородичей в виде синтетических форм.

В статье представлены основные результаты изучения и использования созданных в

КНИИСХ геномно-замещенных и геномно-добавленных синтетических форм.

Геномно-замещенные и геномно-добавленные синтетические формы

Получение амфидиплоидов после предложенного в 1937 г. метода полиплоидизации с использованием колхицина стало традиционным (Blakeslee, Avery, 1937). Амфидиплоиды были получены от скрещивания культурной пшеницы со многими чужеродными видами (Riley, Kimber, 1966; Mujeeb-Kazi *et al*., 1996; Valkoun, 2000).

Большую ценность имеют амфидиплоиды с одним и более субгеномами, гомологичными или гомеологичными субгеномам мягкой пшеницы. Использование таких форм значительно упрощает возможность получения замещенных и транслокационных линий, возрастает вероятность гомо- и гомеологичной конъюгации, в особенности если в используемом амфидиплоиде присутствуют гены-индукторы гомеологичной конъюгации. Создание таких форм позволяет не только в значительной степени облегчить передачу чужеродной генетической информации, но и в более удобной форме сохранять генофонд диких сородичей.

Особый интерес представляют синтетические геномно-замещенные формы, полученные на основе выделения и использования тетракомпонента мягкой пшеницы (BBAA, $2n = 28$). Возможность удаления одного из субгеномов (генома D) мягкой пшеницы и замещения его на геномы других видов впервые была продемонстрирована в работах Kerber (1964), Kerber, Dyck (1969). На основании этого в лаборатории цитогенетики КНИИСХ под руководством Е.Г. Жирова был разработан оригинальный подход к перестройке генома мягкой пшеницы (Жиров, 1989). Путем замещения генома твердой пшеницы на геномы AABB мягкой были получены тетраплоидные компоненты сортов Аврора, Саратовская 29 и Кальянсона. С использованием тетракомпонента сорта Аврора созданы синтетические геномно-замещенные формы Авродес, Аврозис, Авролата, Авротата, Авроале и Аврокум, у которых геном D мягкой пшеницы был замещен на геномы *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata*, *S. cereale* и *Ag. glaucum* соответственно. Кроме этого, была получена геномно-добавленная форма *T. miguschovae*, у которой геном D от *Aegilops tauschii* был добавлен к геномам AG *Triticum militinae* (табл. 1).

Наибольший интерес для селекционной практики, и в частности для передачи генов, контролирующих высокое содержание белка и устойчивость к болезням, представляют геномно-добавленная форма *T. miguschovae* и геномно-замещенные формы Авродес, Авролата, Аврозис и Аврокум. Унаследовав от диких сородичей ценные признаки, эти формы являются более удобными источниками для передачи их в пшеницу. Все формы имеют гексаплоидный уровень плоидности, легко скрещиваются с мягкой пшеницей, и их потомство обладает хорошей жизнеспособностью (Давоян, 1988; Жиров, 1989; Давоян, Жиров, 1995). Исключением была геномно-замещенная форма Аврокум, получен-

Таблица 1

Характеристика синтетических форм по содержанию белка и устойчивости к болезням

Синтетическая форма	Геном	Вид-донор	Белок, %	Листовая ржавчина	Желтая ржавчина	Мучнистая роса
T. miguschovae	AGD	*T. militinae Ae. tauschii*	19,4	R	R	R
Авродес	BAS	*Ae. speltoides*	22,4	R	R	R
Авролата	BAU	*Ae. umbellulata*	18,5	R	R	R
Аврозис	BAS^{sh}	*Ae. sharonensis*	19,4	R	R	R
Авротата	BAN	*Ae. uniaristata*	18,2	MR	R	MS
Авроале	BAR	*S. cereale*	16,0	S	R	R

Примечание. R – устойчивый; S – восприимчивый; MR – умеренно устойчивый; MS – умеренно восприимчивый; ^{sh} – геном S происходит от *Ae. sharonensis*.

ная с участием *Ag. glaucum*. Эта форма представляла собой 76-хромосомный амфидиплоид и после получения гибридов F_1 от скрещивания с ней сорта Аврора из-за слабой жизнеспособности, к сожалению, была потеряна.

В результате постоянного наблюдения за самими синтетическими формами в полевых условиях и систематического цитологического контроля установлено, что они на протяжении многих лет остаются константными по своим морфо-биологическим признакам и имеют достаточно высокую степень бивалентной конъюгации хромосом (табл. 2).

Таблица 2

Ассоциация хромосом в метафазе I мейоза у некоторых синтетических форм

Синтетик	Число растений	Число изученных клеток	Среднее число на клетку		
			униваленты	биваленты	мультиваленты
Авродес	4	232	2,30	18,38	0,57
Аврола та	3	184	0,05	20,95	–
Авротата	2	114	–	21	–
Аврозис	4	195	0,46	20,70	0,06
Авроале	3	158	–	21	–

Среднее число конъюгирующих хромосом составило: 38,7 у Авродеса; 41,8 у Аврола ты; 41,5 у Аврозиса. У остальных форм оно составляло 42 хромосомы. Наличие у геномно-замещенной формы Авродес относительно большого количества мультивалентов в метафазе I мейоза свидетельствует о способности этого синтетика стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом.

Полученные синтетики были использованы для передачи их полезных признаков мягкой пшенице, а также для выяснения некоторых теоретических вопросов. Преимущество используемых нами синтетиков заключается в том, что они позволяют миновать этапы генетической несбалансированности линий, получаемых при традиционной схеме передачи генетического материала диких сородичей в геном мягкой пшеницы. Кроме этого, использование таких синтетиков предполагает получение множественных замещений или транслокаций хромосом в зависимости от того, конъюгируют ли хромосомы генома дикого вида, заместившего геном D мягкой пшеницы, с хромосомами самой пшеницы.

Рекомбинантные синтетические формы

В 1999 г. нами была начата работа по получению рекомбинантных, «вторичных» синтетиков на основе созданных в лаборатории геномно-замещенных форм. Предполагалось, что общие для всех форм геномы BA мягкой пшеницы могут стать основой для возможного рекомбинационного процесса между хромосомами двух различных геномов диких видов. Были получены гибриды F_1 от скрещивания геномно-замещенных форм между собой, у которых был изучен мейоз. В результате проведенного анализа было установлено, что геномы диких сородичей сохранили свою стабильность в этих формах. В то же время у гибридов, в особенности с участием Авродес, отмечалось относительно большое число конъюгирующих хромосом (33,4 у Авродес/Авроале, 35,3 у Авродес/Аврозис). Очевидно, это связано со способностью синтетической формы Авродес подавлять действие гена *Ph* и вызывать гомеологичную конъюгацию хромосом за счет наличия в ее составе генома S от *Aegilops speltoides*. Многие дикие виды обладают генами-промоторами гомеологичной конъюгации (Riley *et al*., 1968; Mello-Sampayo, 1971; Сечняк, Симоненко, 1991). Количество конъюгирующих хромосом может зависеть от генетической дивергенции используемых видов, а также от наличия и активности у них генов-супрессоров *Ph*-генов.

В результате дальнейшей работы (беккроссирование, самоопыление, цитологический отбор) на основе использования геномно-замещенной формы Авродес к 2004 г. были получены новые формы, у которых геном D мягкой пшеницы замещен на смешанный (рекомбинантный) геном двух диких видов. Рекомбинантные формы для краткости были обозначены как RS-синтетики. Предполагаемый геномный состав и характеристика их по устойчивости к некоторым болезням представлены в табл. 3.

Синтетические формы RS2; RS3; RS4; RS7 и RS8 были высокоустойчивы к листовой,

Таблица 3

Характеристика новых синтетических форм по геномному составу и устойчивости к болезням

Синтетическая форма	Геном	Листовая ржавчина	Желтая ржавчина	Мучнистая роса
RS2	BBAASR	R*	R	R
RS3	BBAASR	R	R	R
RS4	BBAASN	R	R	R
RS5	BBAASD	R	R	MR
RS6	BBAASD	R	R	MR
RS7	BBAASU	R	R	R
RS8	BBAASS^{sh}	R	R	R

* Сокращения см. табл. 1.

Таблица 4

Цитологическая характеристика новых синтетических форм

Синтетик	Число растений	Число изученных клеток	Среднее число на клетку		
			бивалентны	унивалентны	мультивалентны
RS2	3	164	19,48	2,90	0,03
RS3	3	170	17,59	6,58	0,05
RS4	2	137	19,06	2,81	0,02
RS5	2	128	18,63	4,56	0,04
RS6	3	141	20,70	0,31	–
RS7	2	124	17,23	4,98	0,02
RS8	2	115	17,04	5,14	0,08

желтой ржавчине и мучнистой росе. RS5 и RS6 проявляли резистентность к листовой и желтой ржавчинам и среднюю устойчивость к мучнистой росе.

В рамках цитологического исследования новых синтетиков проводился анализ конъюгации хромосом в MI мейоза (табл. 4).

Практически все синтетики формировали в MI мейоза достаточно высокое среднее число бивалентов и мультивалентов, указывающее на наличие гомеологичной конъюгации хромосом.

Синтетические формы RS4, RS5, RS6 и RS7 имели низкую фертильность. Для дальнейшего поддержания и получения линий с чужеродными транслокациями их беккроссировали с мягкой пшеницей. Остальные синтетики, несмотря на нестабильный мейоз (рис.), имели удовлетворительную фертильность.

Таким образом, процесс становления рекомбинантного генома у RS форм происходит по-разному и зависит от конкретного сочетания хромосом двух гаплоидных геномов диких видов. В целом он направлен на отбор таких

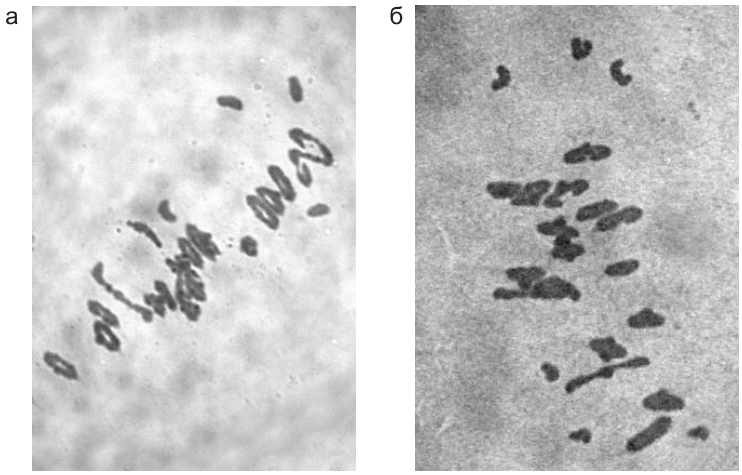


Рис. Конъюгация хромосом в метафазе I мейоза у рекомбинантных синтетических форм.

а – RS2, $16^{II} + 1^{VI} + 4^{I}$; б – RS7, $18^{II} + 6^{I}$.

сочетаний хромосом, которые могут обеспечить нормальное функционирование растительного организма. А.И. Щаповой и Л.А. Кравцовой (1990) при проведении кариологических исследований пшенично-ржаных гибридов было установлено, что гаметы BBAADR подвергаются очень жесткому отбору, направленному, с одной стороны, на сохранение основного числа хромосом с небольшим уровнем анеуплоидии, с другой – на отбор таких сочетаний хромосом двух гаплоидных геномов, в которых присутствующие хромосомы одного генома способны у гаплоидов компенсировать отсутствие гомеологов другого генома. В результате такого отбора в последующих поколениях гибридов BBAADR формируются гексаплоидные формы с комбинированным DR-геномом.

Полученные формы открывают новые возможности в изучении взаимоотношений геномов культурной пшеницы и ее сородичей, а также модификации генома мягкой пшеницы. Заключая в себе значительный генетический ресурс, они являются более удобными источниками ценных генов. Практическая значимость их также определяется высокой устойчивостью к таким болезням, как листовая ржавчина, желтая ржавчина и мучнистая роса. Планируется дальнейшее изучение новых синтетиков и по другим хозяйственно полезным признакам.

Передача генетического материала диких сородичей от синтетических форм мягкой пшенице

Для передачи хозяйственно ценных признаков диких сородичей (*T. militinae*, *Ae. squarrosa*, *Ae. speltoides*, *Ae. umbellulata*, *Ag. glaucum*) мягкой пшенице были использованы синтетические формы *T. miguschovae*, Авродес, Авролата и Аврокум.

Растения F_1, полученные от скрещивания синтетических форм *T. miguschovae*, Авродес и Аврокум с мягкой пшеницей, характеризовались полной устойчивостью к листовой ржавчине и мучнистой росе, но были частично фертильными. Для восстановления фертильности гибридные растения беккроссировали мягкой пшеницей. В целом фертильность растений была восстановлена после первого беккросса. Гибридные растения F_1, полученные от скрещивания геномно-замещенной формы Авролата с сортом Аврора, также были высокоустойчивыми к листовой ржавчине и мучнистой росе. Так как они оказались самофертильными, дальнейшие возвратные скрещивания с мягкой пшеницей не проводились.

Число хромосом у растений первых поколений, полученных от беккроссирования и самоопыления, колебалось от 35 до 49. Поскольку наиболее приемлемое число хромосом для мягкой пшеницы – 42, то и естественный отбор в популяции идет в пользу растений с таким количеством хромосом. После каждого последующего беккросса и самоопыления количество 42-хромосомных растений увеличивалось и в BC_2F_2 оно составляло с участием *T. miguschovae*, Авродес и Аврокум соответственно 52, 20 и 27 %, а с участием синтетической формы Авролата в F_4 – 35 %.

В результате проведенной работы было получено большое количество линий, фенотипически близких к сортам-реципиентам, но отличающихся от них высокой устойчивостью к грибным болезням. Наиболее интересные из них были вовлечены в цитологический анализ, направленный на идентификацию линий со сбалансированным мейозом, и выявление у них чужеродных хромосом и транслокаций. Было изучено 63 и 30 линий поколения BC_2F_3–BC_5, полученных на основе синтетических форм *T. miguschovae* и Авродес соответственно, а также 167 линий BC_1F_4–BC_2F_3, полученных с участием Аврокум, и 157 линий F_5 с участием Авролата.

Анализ MI мейоза показал, что большинство линий, полученных на основе *T. miguschovae*, Авродес и Аврокум, имеют стабильный мейоз: 68, 70 и 86 % соответственно. Относительно небольшая доля (25 %) мейотически стабильных линий была выявлена на основе геномно-замещенной формы Авролата, что объясняется отсутствием беккроссов.

Для того чтобы выяснить, в каком виде был передан генетический материал от синтетических форм, предварительно отобранные цитологически стабильные линии (21^{II}) были скрещены с сортами Chinese Spring, Скифянка и Аврора. В результате изучения конъюгации хромосом в метафазе MI мейоза у гибридных растений F_1 было выяснено, что передача гене-

тического материала от *T. miguschovae* и Авродес в основном происходит через транслокации. В то же время она может осуществляться через гомеологичную рекомбинацию и замещение целых хромосом (Давоян, 1993).

У большинства анализируемых линий, имеющих сбалансированный мейоз и полученных с участием синтетических форм Аврокум и Авролата, замещена одна пара хромосом. В то же время идентифицированы линии, замещенные по двум и трем парам хромосом пшеницы, а также с предполагаемыми транслокациями (Давоян и др., 2004а, б).

Большое количество замещенных линий, полученных от скрещивания геномно-замещенных форм Авролата и Аврокум с сортом Аврора, а также их разнообразие по фенотипическим признакам позволяли ожидать замещения разных хромосом D-генома пшеницы на соответствующие *Ae. umbellulata* и *Ag. glaucum*. Таким образом, появилась возможность создания серий замещенных по D-геному линий мягкой пшеницы. С этой целью первоначально было проведено скрещивание по неполной диаллельной схеме и изучен мейоз у гибридов F_1 между линиями. В результате нами были отобраны линии, различающиеся между собой по замещенным хромосомам (в MI мейоза у всех гибридов было $19^{II}+4^{I}$). У части гибридов между линиями в МКП с большой частотой наблюдалась ассоциация хромосом $20^{II}+2^{I}$. Как известно, каждая чужеродная хромосома может эффективно замещать хромосомы только определенной гомеологичной группы пшеницы (Miller, 1986). С учетом этого можно предположить, что у таких линий, вероятнее всего, замещены гомеологичные хромосомы разных геномов. Изучение мейоза у гибридов F_1 позволило нам также определить линии с одинаковыми замещениями хромосом (в мейозе наблюдали 21^{II}).

Для идентификации чужеродных хромосом дисомно-замещенные линии, имеющие замещения по разным хромосомам пшеницы, были скрещены с серией замещенных по геному D линий сорта Chinese Spring. Выводы о замещенной хромосоме делались исходя из того, что в MI мейоза у гибрида между линией с неизвестной хромосомой и тестера с известной чужеродной хромосомой должны с высокой частотой встречаться клетки с $20^{II}+2^{I}$.

В результате проведенной работы были выявлены линии в комбинации скрещивания Аврора/Аврокум, у которых хромосомы 2D, 4D, 5D, 6D и 7D мягкой пшеницы замещены на соответствующие гомеологичные хромосомы от *Ag. glaucum* (Давоян и др., 2005). В настоящее время с использованием дифференциальной окраски хромосом подтверждены замещения по 5D и 7D хромосомам. Установлена связь замещений с устойчивостью к болезням, содержанием белка, качеством клейковины и другими морфобиологическими признаками.

Хозяйственно-биологическая оценка полученных интрогрессивных линий

Полученные на основе синтетических форм интрогрессивные линии оценивались по ряду хозяйственно ценных и биологических признаков.

Так как одной из главных задач при создании синтетических форм была передача устойчивости к болезням, особое внимание при оценке отводилось именно этому признаку.

Интрогрессивные линии наследуют устойчивость от синтетических форм. При этом для большинства линий характерно проявление резистентности к комплексу болезней. Анализ по устойчивости к листовой и желтой ржавчинам, мучнистой росе и септориозу за 2002–2005 гг. показал, что из 693 проанализированных линий устойчивость одновременно к двум болезням проявляют 39 %, к трем – 29 % и четырем – 12 %. Только 137 линий (20 %) были устойчивы к одной определенной болезни.

Анализ (гибридологический, моносомный, ПЦР-анализ) устойчивости линий к листовой ржавчине**,** одной из самых распространенных и вредоносных болезней пшеницы, выявил линии с разными генами устойчивости к данному заболеванию, отличными от известных эффективных генов (Давоян и др., 2009).

Чужеродные интрогрессии существенно влияют на технологические качества зерна (Bochev, 1983; Аксельруд, Рыбалка, 2002). Основными характеристиками качества зерна являются содержание белка, количество и качество клейковины. Содержание белка и клейковины зависит от условий вегетационного периода. Выявлено широкое варьирование ли-

ний по этим признакам, при этом большинство из них превышали показатели сортов-реципиентов. Так, содержание белка у 155 линий урожая 2005 г. варьировало от 13 до 19 %, а количество клейковины – от 23,5 до 43 %.

Изучение электрофоретических спектров глиадина у полученных линий позволило идентифицировать формулы глиадина, как сходные с таковыми у сортов-реципиентов, так и отличающиеся от них, при этом у некоторых из них выявлены ранее не встречающиеся аллели (Давоян, 2006). Широкий спектр изменений по глиадинкодирующим аллелям, содержанию белка и клейковины у полученных линий подтверждает возможность существенного изменения белкового комплекса мягкой пшеницы за счет интрогрессии в ее геном генетического материала диких сородичей.

Полученные линии имеют значительный полиморфизм и по другим признакам. Выделены линии, сочетающие комплексную устойчивость к болезням с высоким содержанием белка и клейковины. С использованием полученных линий создано 5 сортов озимой мягкой пшеницы: Жировка, Фишт, Восторг, Евгения и Гром. Последний включен в Государственный реестр селекционных достижений РФ в 2010 г. Полученные нами синтетические формы представляют собой уникальную генетическую основу для сохранения и использования генофонда диких сородичей в селекции мягкой пшеницы, открывают новые возможности в изучении взаимоотношений геномов культурной пшеницы и ее сородичей и модификации генома мягкой пшеницы.

Литература

Аксельруд Д.В., Рыбалка А.И. Оригинальные агро-технологические свойства линий озимой мягкой пшеницы на основе чужеродных интрогрессий от диких и культурных сородичей // Пути повышения и стабилизации производства высококачественного зерна: Сб. докл. Междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2002. С. 34–37.

Давоян Р.О. Синтезированный гомолог мягкой пшеницы *Triticum miguschovae* как источник устойчивости к листовой ржавчине // Сб. тр. КНИИСХ. Краснодар, 1988. С. 30–36.

Давоян Р.О. Передача генов устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum militinae* Zhuk. и *Aegilops speltoides* Tauch. в геном мягкой пшеницы через синтетические гексаплоиды *Triticum miguschovae* и Авродес: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Санкт-Петербург: ВИР, 1993. 24 с.

Давоян Р.О., Жиров Е.Г. Геномно-замещенная форма Авродес как источник устойчивости растений мягкой пшеницы к листовой ржавчине и мучнистой росе // С.-х. биология. 1995. № 1. С. 95–101.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Бессараб К.С. Получение и характеристика чужеродно-замещенных линий озимой мягкой пшеницы Аврора с хромосомами *Agropyron glaucum* // Эволюция научных технологий в растениеводстве: Сб. науч. тр., посвящ. 90-летию КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Краснодар, 2004а. Т. 3. С. 3–9.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Кекало Н.Ю. Получение и изучение замещенных по геному D линий мягкой пшеницы с хромосомами *Ae. umbellulata* // Наука Кубани. 2004б. № 3. Ч. I. С. 48–51.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Кекало Н.Ю. Идентификация хромосом пырея сизого (*Agropyron glaucum*) у замещенных линий сорта мягкой пшеницы Аврора // Наука Кубани. 2005. С. 104–107.

Давоян Р.О. Использование генофонда дикорастущих сородичей в улучшении пшеницы (*Triticum aestivum* L.): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар, 2006. 49 с.

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р. и др. Передача устойчивости к болезням от диких сородичей мягкой пшеницы с использованием синтетических форм // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2009. Т. 166. С. 519–523.

Сечняк А.Л., Симоненко В.К. Влияние генома ржи Rcl на гомеологичную конъюгацию хромосом у гибридов *Secale cereale* L. с полиплоидными видами *Triticum* L./ *Aegilops* L. // Цитология и генетика. 1991. Т. 25. № 1. С. 20–23.

Жиров Е.Г. Геномы пшеницы: исследование и перестройка: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Киев, 1989. 36 с.

Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржанных гибридов. Новосибирск: Наука, 1990. 163 с.

Blakeslee A.F., Avery A.G. Methods of inducing doubling of chromosomes in plants // J. Hered. 1937. V. 28. P. 393–411.

Bochev B. The genus *Aegilops* – possibilities and perspectives of utilization the breeding of high quality wheat cultivar // Proc. of 7th World Cereal Genet. And Breed. Congr. Prague, 1983. P. 237–242.

Feldman M. Cytogenetic and molecular approaches to alien gene transfer in wheat // Proc 7th Int. Wheat Genet. Symp. 1988. V. 1. P. 23–32.

Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat // Euphytica. 1994. V. 73. P. 199–212.

Kerber E.R. Wheat: Reconstitution of the tetraploid component (AABB) of hexaploid // Science. 1964. V. 143. P. 242–255.

Kerber E.R., Dyck P.L. Inheritance in hexaploid wheat leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa* // Can. J. Genet. Cytol. 1969. V. 11. P. 639–647.

Knott D.R. Transferring alien genes to wheat // Wheat and

Wheat Improvement. 2nd ed. 1987. P. 462–471.
McIntosh R.A., Devos K.M., Dubovsky J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 supplement // Ann. Wheat Newslett. 2005. V. 51. P. 272–285.
Mello-Sampayo T. Promotion of homoelogous pairing in hybrids of *T. aestivum* × *Ae. longissima* // Genet. Iberica. 1971. V. 23. P. 1–9.
Miller T.E. Double alien chromosome substitution into wheat // Annu. Rep. Inst. Plant Sci. Res. John Innes Centre. Norwich. 1986. P. 67–69.
Mujeeb-Kasi A., Rosas V., Roldan S. Conservation of the genetic variation of *Triticum tauschii* (Coss.) Schmalth. (*Aegilops squarrosa* auct. non L.) in synthetic hexaploid wheats (*T. turgidum* L. s. lat. × *T. tauschii*; $2n = 6x = 42$, AABBDD) and its potential utilization for wheat improvement // Genet. Res. Crop Evol. 1996. V. 43. P. 129–134.
Riley R., Kimber G. The transfer of alien genetic variation to wheat // Reports Plant Breed. Inst. Cambridge. 1966. P. 6–36.
Riley R., Chapman V., Johnson R. Introduction of yellow rust resistance of *Aegilops comosa* into wheat by genetically induced homoeologous recombination // Nature. 1968. V. 217. No 5126. P. 383–384.
Valkoun J. Wheat pre-breeding using wild progenitors // Proc. of the 6th Intern. Wheat Conf. «Wheat in a Global Environment» / Development in Plant Breeding. Dordrecht; Boston; London, 2000. V. 9. P. 699–707.
Sears E.R. Chromosome engineering in wheat // Stadler Symp., Univ. of Missouri, Columbia, USA. 1972. V. 4. P. 23–28.

USE OF SYNTHETIC FORMS IN THE PRESERVATION AND EXPLOITATION OF THE GENE POOL OF WILD COMMON WHEAT RELATIVES

R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan, A.N. Zinchenko, E.R. Davoyan, A.M. Kravchenko, Y.S. Zubanova

Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia,
e-mail: davoyanro@mail.ru

Summary

The results of investigation and exploitation of the synthetic genome addition line *T. miguschovae* (*Triticum militinae*/*Aegilops tauschii*) and genome substitution lines Avrodes, Avrosis, Avrolata, Avrotata, Avroale, and Avrocum are reported. In the genome substitution forms, genomes of *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata*, *Secale cereale* and *Agropyron glaucum* are substituted for the D-genome of common wheat cultivar Avrora. The synthetic forms provide a unique genetic basis for preservation and use of the gene pool of wild relatives in wheat breeding. These forms have been used to produce secondary recombination synthetic forms (RS forms) with genome constitutions BBAADS, BBAASR and BBAASS^{sh}. These cytologically stable introgression lines combine disease resistance and high protein content. Five common winter wheat cultivars have been developed on the base of the introgression lines obtained.

Key words: common wheat, synthetic forms, cytological analysis, introgression lines.

УДК 633.1:575.22

THE PGR NETWORKS IN FRANCE: COLLABORATION OF USERS AND THE GENETIC RESOURCE CENTRE ON SMALL GRAIN CEREALS

© 2012 г. **A. Didier, L. Bardy, E. Boulat, J. Koenig, A. Lapierre, F. Exbrayat, J. Bordes, F. Balfourier**

INRA-UBP Genetic, Diversity and Ecophysiology of Cereals, Clermont-Ferrand FRANCE, e-mail: francois.balfourier@clermont.inra.fr

Received November 19, 2011. Accepted for publication January 18, 2012.

Plant genetic resources (PGR) have been used in breeding programs for many decades to produce modern varieties by introducing genes of interest, in particular, resistance genes. Nevertheless, these resources remain underestimated if we focus on abiotic stress tolerance or new agricultural techniques, which consider productivity with regard to the environment. In recent years, new users, such as scientists and farmers, have discovered diverse sources of interest for screening and exploiting natural diversity conserved in PGR collections.

In the case of the French cereals PGR Network, a share of the responsibility, based on the knowledge and ability of network members, has been decided in order to better promote the use of PGR. The main species of *Triticum* (wheat), *Hordeum* (barley), *Secale* (rye), ×*Triticosecale* (triticale), *Avena* (oat) genera and their wild relatives are held in the collection. By combining phenotypic and genotypic data, the whole genetic resource collection has been structured into smaller functional groups of accessions, in order to facilitate the access and meet the increasing number of different requirements for the distribution of adapted samples of accessions.

New panels are being processed to give breeders and scientists new useful tools to study, for instance, stress resistance or to develop association studies. All these data obtained from the French small grain cereal Network will be progressively available through the INRA Genetic Resource Website (http://urgi.versailles.inra.fr/siregal/siregal/welcome.do).

Key words: cereals, genetic resources, data management, seed distribution.

Introduction

For about one century, plant genetic resources (PGR) were traditionally used by breeders in their breeding programs in order to introduce traits and genes of interest in improved material and, then, to create new cultivars. This context is changing with the occurrence of new constraints, due to environmental conditions (i.e. climate changes, rules with respect to environmental conditions during production) and to the evolution of socio-economic demands. At the same time, new tools to investigate PGR diversity were introduced (Paux *et al*., 2010). There has been a renewed interest for PGR expressed by new users (for instance, scientists who can now describe PGR diversity at new scales as genomic, proteomic and metabolic) in order to search for new alleles for new targets. This attraction also concerns farmers, gardeners and private individuals who are more interested in cultivated biodiversity. This may be represented by landraces or old varieties that they want to use directly for organic farming or for specific adaptations to human nutrition.

In this context, considering the fact that the largest part of our collection is under-estimated for these new aims and targets, we need to define different way to promote genetic resources from the INRA collection. These management activities must be able to answer to the socio-economic evolution of agriculture and to the development of basic scientific knowledge in genetics. To achieve these two aims, responsibility must be shared between actors managing the genetic resources in order to better promote and act on them.

Management of Genetic Resources in France

The INRA Plant Breeding Division supports eleven Genetic Resources Centers (GRC) plus one in the French Indies for tropical species such as yam. These GRC belong to the French IBISA network. Each one of these GRC is focused on a specific group of species. The main missions of these GRC are the characterization of resources (passport data, genetic markers, agronomic criteria of interests), the stock management, ensuring the quality control (identity, viability and sanitary condition) and the management and diffusion of scientific and technical information related to genetic resources.

Small grain collection. In the case of small grain cereals, the Genetic Resources Centre (GRC) held in Clermont-Ferrand gathers accessions of major species of agricultural interest belonging to genus *Triticum* (wheat), *Hordeum* (barley), *Secale* (rye), ×*Triticosecale* (triticale) *Avena* (oat), and their wild relatives.

The bread wheat (*Triticum aestivum*) collection is made up of 11 500 cultivated lines, as landraces, breeding lines, elite's lines and registrated cultivars. A third of these wheats has Fench origin, the second third comes from Europe and the last one is from the rest of the world, with about ninety different countries represented. Among French material, the collection gathers old varieties, or «landraces» from the 19th century, the first French varieties bred in France (Vilmorin's collection), as well as the last «elite» lines from the end of 20th century. The wide coverage of a breeding period allows retracing the history of bread wheat selections in France, given that the pedigree is known. Besides these patrimonial resources, foreign material is composed of genetic resources more traditional. This whole collection is described for agro-morphological traits - height, spike descriptors (awn, hairiness), growth habit, lodging and resistance to major diseases (mildews, rusts) (Roussel *et al*., 2004). An estimation of some technological parameters linked to bread-making quality has been realised by a NIRS methodology (Roussel *et al*., 2005) on most of the accessions. A molecular diversity analysis has also been done on 4 000 accessions to characterize the allelic diversity with 42 microsatellites loci spread across the genomes (one by chromosome arm). From this study, a worldwide bread wheat core collection, namely INRA372CC, was defined by Balfourier *et al*. (2007), from INRA in order to propose to scientists a subsample of a reasonable size with maximized allelic diversity. The core collection captures more than 98% of the genetic diversity conserved in the whole wheat GRC collection. This core collection was deeply phenotyped for about 30 different agronomical, biochemical and technological traits (Bordes *et al*., 2008) linked to bread making quality. It was also genotyped with about one thousand molecular markers (DART, SNP and SSR) spread over the genome, in order to determine its genetic structure (Horvath *et al*, 2009). By introducing this core collection in different scientific projects, 8 times in France and abroad, more data can be analyzed and used to develop association analyses. Currently this subsample is characterized for flour and dough quality (Bordes *et al*., 2011), nitrogen use efficiency, grain protein and earliness (Rousset *et al*., 2010; Le Gouis *et al*., 2012). These projects have been supported by industrial processors, cereal breeders and French National Agency for Research.

Besides this bread wheat collection, the small grain CRG holds 2800 durum wheats and relatives, 450 *Aegilops* sp. and also conserves about 6 500 scientific lines used for cytogenetic and genomic studies; this includes aneuploid, addition, deletion or substitution lines, interspecific hybrid, and recombinant inbred line populations used for molecular mapping work.

The GRC also maintains a barley (*Hordeum vulgare*) collection with around 6 500 accessions. It is mainly composed of traditional genetic resources, and it is a national reference for all French landraces, obsolete and improved accessions, breeding material and French acquisitions from Morocco. This collection is well documented for pedigree, as well as agronomic descriptors for two thirds of the barley varieties. This barley collection contains very specific and important material (as semi-dwarf) with quantitative traits of interest for disease resistance and malting.

Since triticale (×*Triticosecale*) is a cereal species recently developed by man, landraces do not exist. On the other hand, all the rye and bread wheat variability is available to breed new «primary» triticale. So, only some varieties, recently bred, are conserved in the collection as well as scientific material used to breed primary triticale. This collec-

tion gathered about a thousand triticale varieties, or breeding lines mainly originated from France and Europe. The collection both comprises hexaploid (×*Triticosecale neoblaringhemii;* advanced varieties) and octoploid form (×*Triticosecale rimpaui;* primary triticale), for which an evaluation is in process.

For oat (*Avena sativa*), collection gathered around 1200 varieties cultivated in France, for the most part with a French origin (65 %). The rest of the collection comes mainly from Germany, North America, Sweden and the United-Kingdom. This collection with patrimonial value had been evaluated during two European projects – GENRES CT99-106 (Katsiotis *et al*., 2008) and AGRI GEN RES 870/2004 (Germeier *et al*., 2011). As well as agronomic traits, an estimation of biochemical characteristics (protein and cellulose) has been done by NIRS methodology.

Rye (*Secale cereale*) collection contains 85 local populations native mainly to Massif Central (France) and Portugal, too. This small collection has a patrimonial values and does not represent the past French rye diversity, which has probably disappeared.

All these genetic resources (around 25 000 accessions) constitute a useful genebank, as well, for basic genomic studies and applied breeding approaches. It allows for preservation of the existing diversity. In the same way, these resources are a useful tool for the development of new cultivars by modern breeding methodologies to comply with new targets for food supplies.

Management of collection. Management of small grain genetic resources in France is mainly done by two partners. The public sector, represented by INRA, who developed a national scientific network on cereal research of 108 full time permanent staff. This network is organized according to the available tools and abilities with a main head unit in Clermont-Ferrand (GDEC unit), coordinating the scientific projects on genomics, genetic resources and breeding, in concert with others INRA units (Fig. 1).

The second partner is the private sector that represented by UFS, the French Union of Seeds composed by 110 French seed corporations, from an international group to family-owned businesses. It covers all seed species. For small grain cereal section, 12 private breeders are concerned by genetic resource management. The network is made of their 12 locations, where they developed facilities for phenotyping and breeding activities. This multi-location network appears as a good tool to

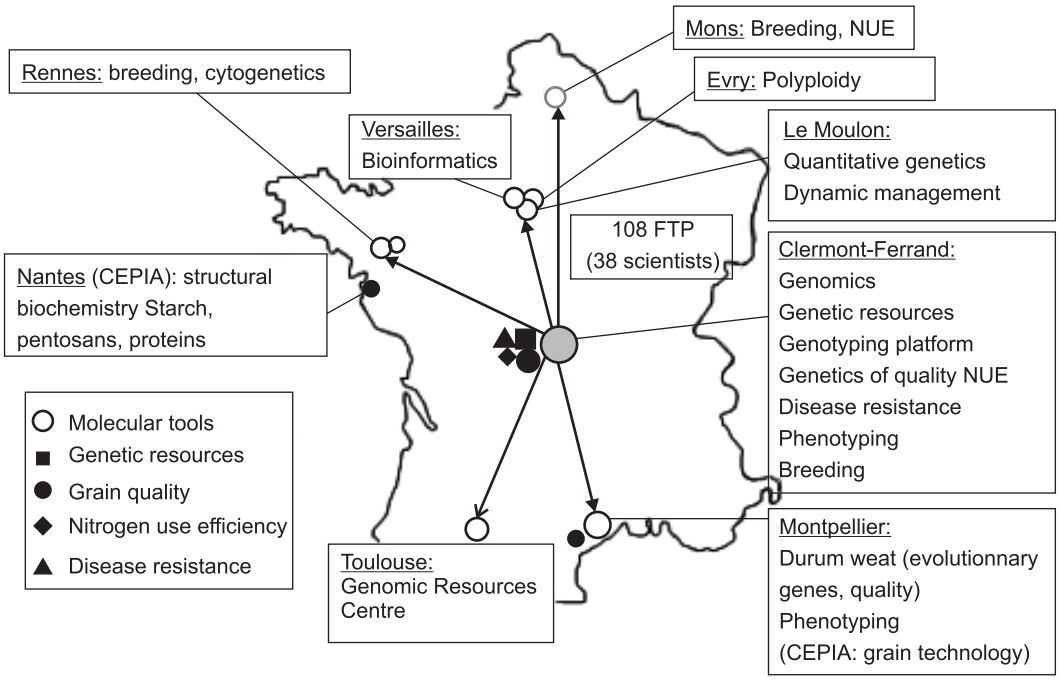


Fig. 1. INRA scientific network.

measure genotype by environment (G×E) interactions in phenotyping activities (Fig. 2).

The management of genetic resources on small grain cereals is shared between these two main actors. All the in-deep phenotyping activities are made by the private breeders' network that can realize a useful characterisation of genetic diversity in contrasting environmental conditions for biotic and abiotic stresses. Activities of pre-breeding, such as inter-specific crosses and enrichment of diversity, are also devoted to the private breeders. Finally, they have facilities to manage, for specific projects, big multiplications of seeds in large quantities when necessary.

In parallel, INRA GDEC Clermont-Ferrand unit shelters the Genetic Resources Centre (http://www.clermont.inra.fr/umr1095_eng/Teams/Technical-and-Experimental-Platforms/Genetic-Resources-Centre) which manages, with the help of the experimental unit, the primary characterisation of the accessions, such as days to flowering, height, growth habit, diseases resistances and so on. The Genetic Resources Centre carries out the multiplication, conservation and distribution of the seed batch. To insure traceability, GRC manages all data in appropriate databases and organizes a quality management system. Furthermore, thanks to its high-throughput genotyping platform and to technological lab facilities, molecular and technological characterisation of diversity may be also performed in INRA-GDEC units.

From the whole network collections, different sub-collections or subsamples of accessions were defined by the main actors of plant genetic resources management. In bread wheat, barley and triticale species, we have defined specific collections (i.e. national collections) made of those accessions historically used in France for breeding programs during the last century. In the case of bread wheat, it is the collection of 1783 accessions which was officially declared in 2010 by the FAO as France's contribution to the International Treaty on Plant genetic Resources for Food and Agriculture. This National Bread wheat collection is currently characterised for both molecular and agronomical traits in a common evaluation project, between the GDEC unit and the UFS genetic resources network, supported by the French Ministry in charge of agriculture and fishing. This project consists of 3 work packages (WP). In the first one, twelve

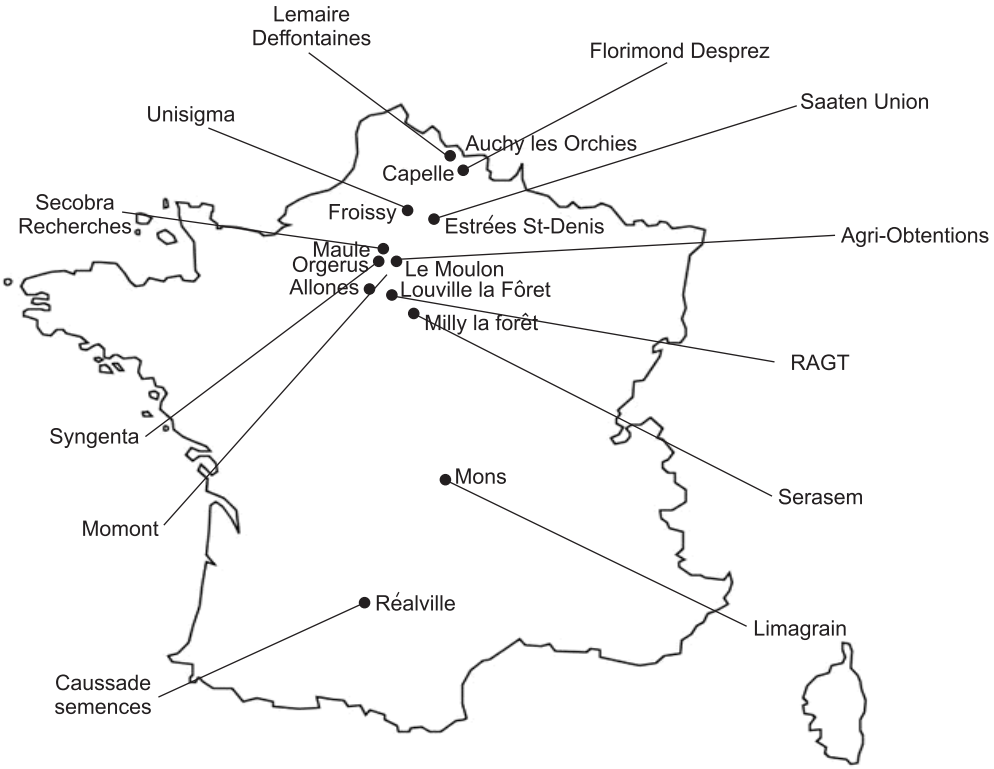


Fig. 2. UFS network on small grain genetic resources.

private breeders have to evaluate, during 3 years, the collection in field nurseries in their multisite evaluation network. In the second, WP2, INRA of Clermont-Ferrand is in charge of genotyping the whole collection with a set of 42 microsatellites markers. And finally, a third WP is a common task of data analysis. The aim is to analyze the structure of the whole collection in order to use this information for a subsequent project, association analyses on a sample set.

Distribution of samples

After five years, the number of samples distributed by the GRC had increased by 290 % (from 1656 to 4857 samples) while the number of requests was quite stable (Fig. 3). Each request includes a Transfer Material Agreement. An increase number of requests is mainly due to an increased number of plant genetic resource network activities. Each year 20 per cent of the distributed samples are sent abroad.

Table 1 shows the number of samples distributed by species function of requester's type during 2005–2010 periods. In terms of the numbers of samples distributed, first of all we have the breeders from French or foreign private companies. During these five years, an exponential increase of private company requests has been received, due to both the PGR activities and to the core collection publication and the FAO participation.

The «Research institutes», which included broad types of research teams and a wide variety

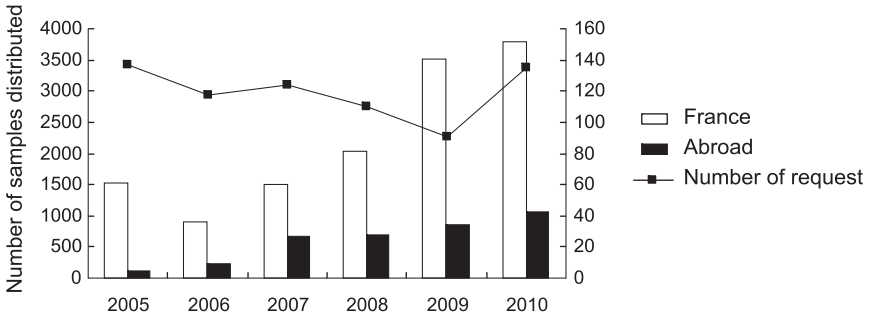


Fig. 3. Number of requests and samples distributed during the five last years (2005–2010).

Table 1

Number of sample distributed by requester type for different species, on 2005–2010 periods

Genus/species	Breeders	Farmers	Research institutes	Others
Aegilops L.	3	13	160	13
Triticum L.				
T. monococcum	25	29	51	18
T. timophevii	4	7	3	5
T. turgidum	78	189	523	57
T. turgidum turgidum	7	85	34	22
T. turgidum durum	12	48	122	19
T. aestivum	5923	1178	5568	378
T. aestivum spelta	19	49	138	10
T. aestivum aestivum	5893	1122	5411	360
Hordeum L.	1766	320	131	53
×*Triticosecale* Wittm.	1	1	46	11
Secale L.	2	27	15	18
Avena L.	89	118	95	33
Total	7891	1882	6592	586

of projects, from «field to laboratory», are the next ones. These institutes are French, European and abroad and can be held by public institutions or private companies.

«Farmers» category includes diverse kinds of farming. Half of these farmers belong to an association called «Reseau Semences Paysannes», which is a militant association. Theses farmers want to develop their own network for exchanges of material in order to promote local varieties. Besides this network, we also have farmers dealing with organic farming, mixed farming and who directly sell their final product – for instance, beer or bread.

Finally, «Others» include associations, non-governmental organization, botanic garden, museum, agricultural college and private individuals.

Requests concern mainly *Triticum* species, and, in a less important part, *Hordeum* species. Wheat relatives are mostly used by research institutes. This can be explained by the research of genes of interest in the ancestries in order to insert them by interspecific crosses. Another interest with this material is to illustrate the historical pedigree of wheat for public exhibition.

Bread (*T. aestivum*) and hard wheat (*T. durum*) are both used by research institutes for genetic analysis, breeding but also for interspecific crosses.

Breeders asked mainly for barley and bread wheat for their breeding programs. This focus is partly due to the genetic resource network organisation and trial evaluation set-up each year.

During these five years, French farmers interests were mainly focused on bread wheat and rivet wheat (*T. turgidum*), with the hope to restore ancestral bread making quality. The other species are more and more required, due to new aims, such as straw for roofs in ecological construction projects. This is the case for rye and old varieties of bread wheat.

The Biological status of accessions distributed is shown in Table 2. Requests from scientists concern landraces, old varieties, modern varieties as well as breeder lines. Research institutes can deal with inappropriate material such as wild or landrace accessions thanks to their experimentation capabilities.

For their breeding programs, private companies have the same kind of interest between modern varieties and breeders lines, and they have less interest in landraces or old varieties. Breeders are searching for material close to modern varieties with low plant heights and well characterized disease resistance. Requests are focused on adapted material which could allow integrating new genes of interest with fewer ancestral burdens.

In the case of farmers, a particular interest is placed on landraces and old varieties, which correspond to 90 % of the requests. Indeed, farmers and in particular baker-farmers look for varieties with a lower gluten content. These varieties are not adapted to the industrial bread-baking process, but they respond well to old bread-baking practices. Use of straw for litter, cattle feed or ecological construction is another aspect to take into account. For these purposes, farmers need not-reduced height plants, as landrace or old varieties.

As shown in Table 3, the origin of material requested is highly dependent on a requester's type.

Table 2

Number of distributed samples by requester type according to their biological status, between 2005 and 2010

Type	Breeders	Farmers	Research institutes	Others	Total
Wild	23 (0,3 %)	20 (1,1 %)	182 (2,8 %)	25 (4,3 %)	250 (1,5 %)
Landraces/old varieties	1396 (17,7 %)	1651 **(87,7 %)**	2591 **(39,3 %)**	476 **(81,2 %)**	6114 (36,1 %)
Modern varieties	3373 **(42,7 %)**	155 (8,2 %)	2268 **(34,4 %)**	54 (9,2 %)	5850 (34,5 %)
Breeder line	3093 **(39,2 %)**	24 (1,3 %)	1313 (19,9 %)	8 (1,4 %)	4438 (26,2 %)
Population	2 (0 %)	29 (1,5 %)	18 (0,3 %)	18 (3,1 %)	67 (0,4 %)
Unknown	4 (0,1 %)	3 (0,2 %)	220 (3,3 %)	5 (0,9 %)	232 (1,4 %)
Total	7891	1882	6592	586	16951

Table 3

Geographical origin of requested samples between 2005 and 2010

Geographical origin	Breeders	Farmers	Research institutes	Others	Total
French	5501 **(69,7 %)**	1390 **(73,9 %)**	2867 (43,5 %)	458 **(78,2 %)**	10216 (60,3 %)
European	1890 (24 %)	283 (15 %)	1759 (26,7 %)	34 (5,8 %)	3966 (23,4 %)
Aboard	472 (6 %)	170 (9 %)	1732 (26,3 %)	67 (11,4 %)	2441 (14,4 %)
Unknown	28 (0,4 %)	39 (2,1 %)	234 (3,5 %)	27 (4,6 %)	328 (1,9 %)
Total	7891	1882	6592	586	16951

Scientists inquire about French material, as well as European and abroad. They can delve further into the description of genetic resources diversity, and they can search more extensively into material adapted or unadapted to European environmental conditions.

Almost 90 % of material used by breeders from the GRC includes French or European accessions. Theses accessions are well adapted to French environmental conditions and are easier to utilize in breeding programs.

This tendency is higher in the «farmers» category, with strong links to territories. Three quarters of samples distributed to farmers include French varieties. They often search for varieties from their areas or varieties cultivated by their grandparents.

To make available the PGR collection to any users, a national website called, «SIReGal» (http://urgi.versailles.inra.fr/siregal/siregal/welcome.do), is in progress. In this website, users have access to the passport data, with information on pedigree, country of origin and some primary evaluation data – growth class, plant height or resistance to some diseases. In the future, a relationship with a molecular database will be available, thanks to a link based on the accession number. A picture book of the collection is also in progress with a special focus on national collections being planned.

Thanks to this website, orders can be made directly by this web interface and sent directly to GRC in INRA Clermont-Ferrand. For now, the national collection of bread wheat (1783 accessions) and barley (461 accessions) are available in SIReGal. This website is not only dedicated to small grain cereals, but it receives information on all other PGR Networks maintained by INRA units. Other crop species are available, too, such as maize, grain legumes and fruit and vegetables species.

Conclusion

As illustrated by the increased number of distributed samples, the French PGR network on small grain cereals appears to be quite effective and satisfactory for a larger number of requesters. In the following years, the main efforts will be focused both on the characterisation of the accessions and on the development of interconnected databases, in order to increase the use of genetic resources. For instance, a new project of evaluation of small grain PGR will be initiated in the «Breedwheat» project, in sharing tasks and responsibilities between public and private breeders. This project, supported by the French Government in the framework of the big program, «Biotechnology and Bioresources», started in 2011 and will be closed in 2020. In this project, devoted to bread wheat, new genomic tools will be developed by INRA in order to genotype the whole bread wheat GRC collection; from the whole collection, two panels of accessions will be defined for biotic (fungal disease resistances) and abiotic stress tolerance (drought, low input fertilizer) and, subsequently, multiplied and phenotyped by private breeders for specific traits in their multilocation network during three years. A genomic selection program will be developed, while a specific task will be devoted to bioinformatics and data management. Finally association analysis will be carried out at the end of the project, in relation to the different partners.

Acknowledgements

The authors would like to thanks the French breeders of the UFS cereal section for their help in the managements of small grain GR in France: J. Auzanneau (Agri Obtentions), S. Caiveau (Syngenta),

J.M Delahaye (Lemaire Deffontaines), B. Duperrier (Limagrain), S. Dutriez (Caussade Semences, P. Giraudeau (Secobra), P. Lonnet (Florimond Desprez), V. Lein (Staaten Union), E. Margalé (Serasem) F. Minard (R2n), S. Regnault (Unisigma), S. Sunderwirth (Momont). The authors are also grateful to E. Storlie for reviewing the manuscript.

References

Balfourier F., Roussel V., Strelchenko P. *et al.* A worlwide bread wheat core collection arrayed in a 384-well plate // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. P. 1265–1275.

Bordes J., Branlard G., Oury FX. *et al.* Agronomic characteristics, grain quality and flour rheology of 372 bread wheats in a worldwide core collection // J. Cereal Sci. 2008. V. 48. P. 569–579.

Bordes J., Ravel C., Le Gouis J. *et al*. Use of a global wheat core collection for association analysis of flour and dough quality traits // J. Cereal Sci. 2011. V. 54. P. 137–147.

Germeier C., Maggioni L., Katsiotis A., Lipman E. Report of a Working Group on Avena (Proc. of the Sixth Meeting, jointly held with the Final Meeting of project AGRI GEN RES 061 on «Avena Genetic Resources for Quality in Human Consumption» (AVEQ), 19–22 October 2010, Bucharest, Romania). Rome, Italy: Bioversity International, 2011. 44 p.

Horvath A., Didier A., Koenig J. *et al*. Diversity and linkage disequilibrium analysis along the chromosome 3B of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) in contrasted plant materials // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 1523–1537.

Katsiotis A., Germeier C.U., Koenig J. *et al*. Screening a European Avena landrace collection using morphological and molecular markers for quality and resistance breeding // Cereal science and technology for feeding ten billion people: genomics era and beyond / Eds J.L. Molina Cano, P. Christou, A. Graner, K. *et al*. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ / IRTA, 2008. P. 27–30.

Le Gouis J., Bordes J., Ravel C. *et al.* Genome wide association analysis to identify chromosomal regions determining components of earliness in wheat // Theor. Appl. Genet. 2012. DOI: 10.1007/s00122-011-1732-3.

Paux E., Faure S., Choulet F. *et al.* Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. P. 196–210.

Roussel V., Branlard G., Vézine J.C. *et al.* NIRS analysis reveals temporal trends in the chemical composition of French bread wheat accessions cultivated between 1800 and 2000 // J. Cereal Sci. 2005. V. 42. P. 193–203.

Roussel V., Koenig J., Beckert M., Balfourier F. Molecular diversity in French bread wheat accessions related to temporal trends and breeding programmes // Theor. Appl. Genet. 2004. P. V. 108. P. 920–930.

Rousset M., Bonnin I., Remoué C. *et al.* Deciphering the genetics of flowering time by an association study on candidate genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 123. P. 907–926.

СЕТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ВО ФРАНЦИИ: СОТРУДНИЧЕСТВО МЕЖДУ ПОЛЬЗОВАТЕЛЯМИ И ЦЕНТР ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР

А. Дидье, Л. Барди, Э. Була, Ж. Кениг, А. Лапьер, Ф. Эксбрайя, Ж. Бордэ, Ф. Балфурье

Национальный институт сельскохозяйственных исследований (INRA)
в Клермон-Ферране, Клермон-Ферран, Франция,
e-mail: francois.balfourier@clermont.inra.fr

Генетические ресурсы растений (ГРР) многие десятилетия использовались селекционерами в селекционных программах для получения современных сортов путем введения целевых генов (в частности генов устойчивости к болезням). Тем не менее ГРР все еще остаются недооцененными при работе с устойчивостью к абиотическому стрессу и над новыми сельскохозяйственными подходами, рассматривающими продуктивность во взаимосвязи с условиями окружающей среды. В последнее время интерес к изучению и использованию природного разнообразия, законсервированного в коллекциях генетических ресурсов растений, проявляют новые пользователи ГРР-коллекций, а именно ученые и фермеры, открывшие интересующие их новые и разнообразные источники. Для более эффективного использования ГРР было принято решение разделить обязанности по работе в Сети генетических ресурсов злаковых растений Франции в зависимости от знаний и возможностей членов Сети. В коллекции содержатся основные виды родов *Triticum* (пшеница), *Hordeum* (ячмень), *Secale* (рожь), ×*Triticosecale* (тритикале) и *Avena* (овес), а также их дикие сородичи. Ввиду растущего спроса на образцы, содержащиеся в коллекции, а следовательно, необходимости более эффективной

работы с ней, вся коллекция на основании сочетания данных по фенотипу и генотипу поделена на небольшие, но более функциональные группы образцов. Ведется работа со все новыми группами образцов, для того чтобы дать селекционерам и ученым новые полезные инструменты исследования, например, для работ по устойчивости к стрессу или по ассоциативному картированию. Все полученные таким образом в Сети генетических ресурсов злаковых растений Франции данные будут появляться в открытом доступе на сайте генетических ресурсов INRA (http://urgi.versailles.inra.fr/siregal/ siregal/welcome.do).

Ключевые слова: злаковые культуры, генетические ресурсы, управление информационными ресурсами, распространение семян.

УДК 633.11:577.21

IMPLEMENTATION OF GENOME-WIDE SELECTION IN WHEAT

© 2012 г. **G. Charmet, E. Storlie**

INRA-UMP, UMR Genetics, Diversity, Ecophysiology of Cereals,
F63100 Clermont-Ferrand, France, e-mail: gilles.charmet@clermont.inra.fr

Received November 19, 2011. Accepted for publication January 10, 2012.

With the expected development of thousands of molecular markers in most crops, the marker-assisted selection theory has recently shifted from the use of a few markers targeted in QTL regions (or derived from candidate or validated genes) to the use of many more markers covering the whole genome. These genome-wide markers are already used for association analysis between polymorphisms for anonymous markers and qualitative or quantitative traits. The condition for success is that a sufficient level of linkage disequilibrium (LD) exists between the adjacent markers used for genotyping and the true genes or QTLs. This LD is known to vary among species and type of genetic material. In selfing species, particularly among breeding lines, LD has been reported to range up to 1 cM or more. In such conditions, uncharacterized markers can be used to predict the breeding value of a trait without referring to actual QTLs. We present an example applying DArT markers to the INRA wheat breeding material in an attempt to implement whole genome selection as an alternative to phenotypic selection. This study assesses different models (GBLUP, Ridge Regression BLUP, Bayesian Ridge Regression and Lasso) and their ability to predict the yields of genotypes evaluated in a multi-site network from 2000 to 2009 in a highly unbalanced design. The prediction coefficients obtained by cross-validation techniques are encouraging, given the small size of the training population.

Keywords: genomic selection, breeding value, GBLUP, Ridge regression, LASSO.

Introduction

To satisfy the demand of the growing world population, agriculture faces the challenge of delivering safe, high-quality, and health-promoting food and feed in an economical, environmentally sensitive, and sustainable manner while maintaining yield and stability across different environments affected by climate change. Grain cereals – mainly wheat, rice and maize- represent a major renewable resource and are among the most widely grown crop worldwide. Wheat is the most widely grown crop worldwide with an average global annual harvest of 621 million tons of grains. Wheat demand is expected to increase from 621 mt to 760 mt in 2020, to 813 mt in 2030 and more than 900 mt in 2050 (FAO, 2002). This implies annual production growth rate of about 2 %, while it was limited to 0,9 % from 1985 to 1995. Moreover, the rate of yield increase has slowed down from 1995 to 2005 in nearly every country (Complementary strategies ..., 2009; Wheat facts ..., 2009), and it is close to 0 in EU, particularly in the major producing countries like France, Germany and UK.

This yield increase should be achieved by «sustainable intensification». Thus, accelerating genetic progress is recognized as a priority in most countries. Genetic progress per year is given by the general formula:

$\Delta G = i \cdot h^2 \cdot \sigma_P / L$ (where i is selection intensity, h^2 trait heritability, σ_P phenotypic variability and L the duration of selection cycle).

The utilization of markers has been proposed as a means to improve trait heritability and increase selection intensity (by reducing need/cost of phenotyping). Marker assisted selection (MAS) can be used to accelerate and improve the transfer of traits under mono or oligogenic control. For example, MAS can facilitate the transfer from an unadapted source into an elite genetic background through recurrent backcrosses. It has been demonstrated that the use of markers tightly linked to the causal gene can avoid costly and time consuming phenotyping, while genome wide markers enable

to recover most of the elite background in two or three backcrosses instead of 6–7 while limiting linkage drag. In the case of complex traits such as yield, there are likely many genes with quantitative effects (QTLs), which have not all been identified. Therefore, the former strategy of marker assisted transfer cannot be applied, and is generally replaced by marker assisted recurrent selection, whose objective is to increase the frequency of favourable alleles at most QTL. By this way, the probability of identifying lines which cumulate favourable alleles is also increased.

In their pioneering work, Lande and Thompson (1990) proposed an extension of the index selection theory by adding a molecular score to the classical phenotypic score. They introduced the theory for optimizing weights given to each component and demonstrated that this index is in any case at least as efficient as the phenotypic score alone. Note that this approach of marker assisted recurrent selection used only markers which have been identified as being significantly associated (linked) to QTL. The efficiency of MAS/phenotype selection is higher when the trait has a low heritability, the population size is large and the detected QTLs explain a large proportion of the trait variation. Thus further studies have shown that efficiency is improved when including QTLs with small effects, even if they are false positives, rather than being too stringent during the QTL detection step (Moreau *et al*., 1998; Bernardo, 2006). This combined index theory has been adapted, particularly by removing the phenotypic component. Hospital *et al*. (1997) showed that the use of marker index only allows early selection, without trait evaluation, thereby shortening selection cycles and accelerating genetic gain per cycle. However, after several cycles of selection, some favorable alleles may become fixed, and recombination will decrease linkage disequilibrium between QTLs and markers. It is then necessary to regularly re-estimate the associations between QTLs and markers and their effects on the trait (Gimelfarb, Lande, 1994). The interest of marker assisted selection for quantitative traits has been experimentally demonstrated (e.g. Eathington *et al*., 2007; Blanc *et al*., 2008) and they are currently used in routine by most large plant breeding companies.

However, the efficiency of these marker assisted selection methods can still be limited by the first step of QTL detection, whose power can be low for QTL with small effects in breeding populations of limited sizes. For complex traits, like grain yield, the most likely hypothesis is that they are controlled by a very high number of genes, most with small effects below the detection threshold. Therefore, a large number of QTL are not accounted for by markers included in the selection index.

A further step was proposed by Whittacker (2000), who suggested including all markers in the selection index, thus skipping the QTL detection step. As the number of markers is generally higher than the number of genotypes, classical multiple regression with markers as fixed effects cannot be used. Therefore Whittacker (2000) suggested using ridge regression models to overcome this overparemetrization problem. This method is based on introducing a penalization parameter, λ, which reduces the space dimensionality. Meuwissen *et al*. (2001) applied ridge regression and several Bayesian approaches to animal populations for predicting breeding values. They proposed the use of genome-wide markers to predict the genetic value of individuals. Therefore, it is appropriate to name these methods «genomic prediction». However, as genomic predictions are intended for selection purposes, the expression «genomic selection» has become common (e.g. Goddard, Hayes, 2007).

The most efficient use of genomic selection is to replace costly and time consuming phenotyping by a prediction of the genetic value of the trait under selection (or any multitrait index). Thus, the main expected advantage is to shorten selection cycles. However, to benefit from shorter cycles, the genetic gain per selection cycle should be close to that expected from phenotypic or combined MAS + phenotypic selection.

The relative efficiency relies on the accuracy of prediction of the true genetic value by the marker score. Abundant theoretical quantitative genetics literature often report the correlation between genomic marker predictions and «true» breeding value or phenotype. The true breeding value is known only in simulated data, in which QTL effects are given to simulated or real markers, and then these effects are summed to obtain the «real» genetic value. In real datasets, the true genetic value is unknown, and it should be remembered that the phenotype is only a predictor of this breeding value, but usually the only available to compare perfor-

mance of marker-based predictors. The quality of a prediction, as measured by this correlation, relies itself on the level of linkage disequilibrium between a QTL and the linked marker. The relevant parameter is the rI, as it was demonstrated that the sample size required to detect a QTL by a nearby marker is $1/r^2$ times the size required if we has tested the QTL itself (Balding *et al*., 2007). The quality of the global prediction of breeding value will depend on the effectiveness of the markers to capture most of the information brought by QTLs. Thus marker density should be high enough, in order that every QTL be in sufficient LD with an adjacent marker. The extent of LD has been extensively studied in animal and plant species, and we should keep in mind that it is a property of each particular genepool, and no generalization is straightforward among germplasm or breeding programmes. For example, this LD range is expected to be large in biparental populations, and Lorenzana *et al*. (2009) obtained reasonably good prediction with as few as 96 markers in simulated maize progenies. But in progenies from more complex mating schemes, the required marker density will be higher (Bernardo, Yu, 2007; Blanc *et al*., 2008; Heffner *et al.*, 2009; Jannink *et al*., 2010). Moreover, the LD pattern changes from one generation to the next, since recombination reduces the range of LD.

For practical applications in breeding programs, one has to estimate marker effects and add them to obtain the genomic estimate of breeding value (GEBV). This estimation requires both genotypic and phenotypic information in a so-called «reference» or «training» population. Then, marker effects can be used to estimate GEBV in a «target» population with only the genotypic information, and, subsequently, selection can be made on the GEBV instead of the phenotypes. Genomic Selection (GS) can be repeated on the progeny of crosses between GEBV-selected individuals and so on. However, as the LD between markers and QTL decreases from one generation to the next, GEBV predictions are less and less accurate. Therefore, new phenotypic measurements are needed to re-estimate marker effects (see Heffner *et al*., 2010).

In this manuscript, we report on some preliminary results about the implementation of genomic prediction of yield in the INRA wheat breeding programme. We used both simulated and real data and discus some of the issues related to genomic prediction for wheat in France. The presented results only deal with the initial prediction of target populations using marker effects estimated from training populations sampled by cross-validation.

Material and Methods

The INRA wheat breeding program is a carried out in three main research units: Clermont-Ferrand, Estrées-Mons and Rennes. Each breeder makes 100–150 crosses every year, using registered varieties (most recently in western Europe) for 50 % of parents and breeding lines from previous cycles of the program for the remaining 50 %. F_2 to F_4 plants are conducted as bulked families with around 2000 plants per cross, then F_5 grains from selected spikes are sown in single rows in a classical pedigree design. Bulked grains of F_6 lines are sown is two replicate trials with randomized 6–10 mI plots in a single location, then the best F_7 in 3–4 replicates, and the most advanced F_8–F_9 lines are evaluated in a network with 4 replicates in 8–10 locations, according to their precocity group. To have a more balanced design, we kept data from 6 locations with the higher number of common genotypes. Therefore, 30–50 most fixed «new» lines enter the most advanced evaluation network each year. Some of them are evaluated only one year, some two or three consecutive years before being presented to official registration for the best ones. As breeding lines are used as genitors only once sufficient phenotypic data are available, i.e. in F_8, the duration of the selection cycle can be estimated to at least 8 years, and more likely 9–10 to take into account the use of registered varieties in crossing schemes. In this study, we used those lines which have been evaluated in the complete multisite network between 2000 and 2009. After discarding some lines with too few data or to many missing markers, this gave a dataset of 318 breeding lines.

DArT markers were provided by Triticarte company (www.triticarte.com.au). After cleaning markers with more than 5 % missing data and minor allele frequency >5 %, we obtained a dataset with 2121 polymorphic markers.

As often reported in the literature, we used Monte-Carlo methods to simulate «true» breeding values to be estimated by GS prediction. For this, a subset of 50, 100 or 250 markers were sampled and given an additive effect drawn from a $\boldsymbol{N}(0,1)$

distribution. Then the sum of the 100 QTL effects was summed for each individual to estimate its «true» breeding value (TBV), and its «realized» genetic variance σ_g^2. Finally a random was generated using a $\boldsymbol{N}$ $(0, \sigma_e^2)$ and added to the TBV to generate a «simulated phenotype» (simP), where σ_e^2 being set as $\sigma_e^2 = \sigma_g^2 \cdot (1 + h^2) / h^2$ to achieve the desired heritability of simP.

For estimating the accuracy of prediction on real data, we focused on yield, whose broad sense heritability in our design was estimated to 0,37. Because of the highly unbalanced design, we first had to correct for other factor and estimate a corrected genetic main effect. This was achieved through the use of mixed models, with environments and blocks within environments as fixed effects and genotypes as random effects, whose variance being modeled by an identity matrix to avoid confusion with further BLUP prediction using marker estimates of additive relationship matrix. Then the BLUP for each of the 318 lines were used as observed phenotypes (obsP).

Several statistical models are being compared for their prediction accuracy as measured by the correlations between GEBV and either TBV, simP or obsP.

Four statistical methods have been used to predict GEBV

- The ridge regression, as described by Whittacker *et al*. (2000) using a home written R programme (R development core team, 2011). Basically, this methods uses a mixed linear model to estimate best linear unbiased predictor (BLUP), assuming that markers have random effects with common variance. RRBLUP uses a penalty parameter, λ^2 in the estimator to shrink marker effects and to avoid over-fitting (Piepho, 2009). In this study, $\lambda^2 = \sigma_e^2 / \sigma_g^2$, where σ_e^2 is the residual variance and σ_g^2 is the marker effect variance – estimated from the additive genetic variance divided by the number of markers.
- The GBLUP (Coster, 2010), using the pedigree library of R. The XX function solve the classical BLUP equation (Henderson, 1975), using a marker-based estimate of the additive relationship matrix.
- Bayesian Ridge Regression and LASSO (De los Campos, Pérez, 2010; Pérez *et al.*, 2010) as implemented in the BRR library of R.

Results

Figure 1 shows the correlations between GEBV and either TBV or simP for the 4 prediction methods on simulated data with 100 QTL at 3 trait heritabilities.

Similar to other publications, the prediction accuracy increases with simulated trait heritabilities and the correlations with TBV are all higher than that with simP at a given heritability. It should be remembered that the correlation with phenotype cannot exceed h, the square-root of trait heritability, which is verified in Fig. 1. Whatever the trait heritability and the measure of accuracy, the 4 methods rank in similar order, the G-BLUP being the least efficient and the Bayesian approaches the most, particularly LASSO.

The accuracies of the four methods on the BLUP prediction of yield in each of the 6 locations and on the overall BLUP prediction are given in Table and illustrated in Fig. 2.

On this real trait averaged over environments, i.e. the best estimate of the additive main genotype effects, the ranking of the 4 methods is quite similar to that obtained on simulated data. The two Bayesian approaches (RRB and LASSO) clearly outperform the mixed model approaches. However the ridge regression appears to be less accurate than G-BLUP, which was the least efficient on simulated data.

Prediction accuracies of the 4 methods, i.e. correlations between GEBV and obsP obtained in six different locations vary from one location to another, likely according to the within location broad sense heritability. Moreover, in some locations all 4 methods gave similar correlations, while in others there are significant differences among them. More remarkably, the ranking of the 4 methods according to their accuracy differs from the ranking observed on simulated data or even the obsP on all environments. This is particularly true for the G-BLUP method, which is never worst, and it even outperforms the Bayesian methods in two locations. It clearly appears that these BLUP estimates of yield, using single locations, differ from the overall estimate, likely due to GxE interactions.

Discussion

In this preliminary attempt to predict the breeding values of elite wheat lines using genomic

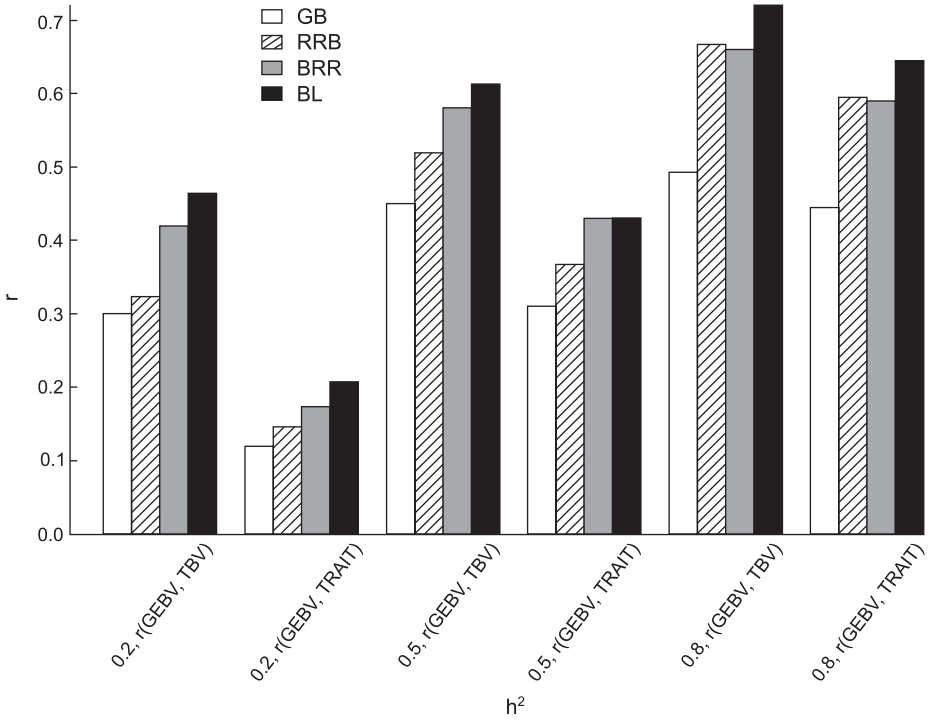


Fig. 1. Correlation between GEBV and simulated true breeding value (TBV) or simulated phenotypes (TRAIT) for 3 heritability values.

RRB: Ridge regresion BLUP, GB: G-BLUP, BRR: Bayesian Ridge regression, BL: Bayesian LASSO. Mean of 100 simulations with 100 QTL with normally distributed effects.

Table

Mean (and standard deviation from 100 cross-validations) of correlations between GEBV estimated from four statistical models and yield predicted in each of the 6 locations and using all locations

Site / Model	cf	di	em	lm	lu	re	All sites
RRB	.289(.14)	.471(.12)	.276(.15)	.332(.12)	.278(.08)	.297(.10)	.488(.12)
GB	.395(.10)	.447(.15)	.330(.12)	.494(.08)	.294(.11)	.344(.11)	.522(.08)
BRR	.329(.12)	.479(.15)	.350(.11)	.492(.08)	.276(.16)	.348(.13)	.506(.11)
BL	.312(.14)	.479(.13)	.333(.12)	.456(.08)	.316(.14)	.324(.12)	.504(.11)

Notes. RRB: Ridge regression BLUP, GB: G-BLUP, BRR: Bayesian Ridge regression, BL: Bayesian LASSO.

markers, results obtained on real data are in accordance with those obtained on simulated traits of similar heritabilities. Indeed the correlation between GEBV and either simulated or observed phenotype is around 0,5. We may assume that the correlation with TBV of real data will also be similar to that obtained on simulated data, i.e. in the range 0,6–0,7. This value is encouraging, and compared to those reported by Crossa *et al*. (2010) who reported accuracy values ranging from 0,355 to 0,608 according to the method and the environment. Heffner *et al*. (2010) recently reported somewhat lower correlation, but they used a more conservative approach, as the used yield in one year as training data and correlate GEBV with yield in another year. If true, an accuracy of 0,6 for TBV is encouraging, since phenotype itself cannot be viewed as a perfect predictor of TBV. Therefore

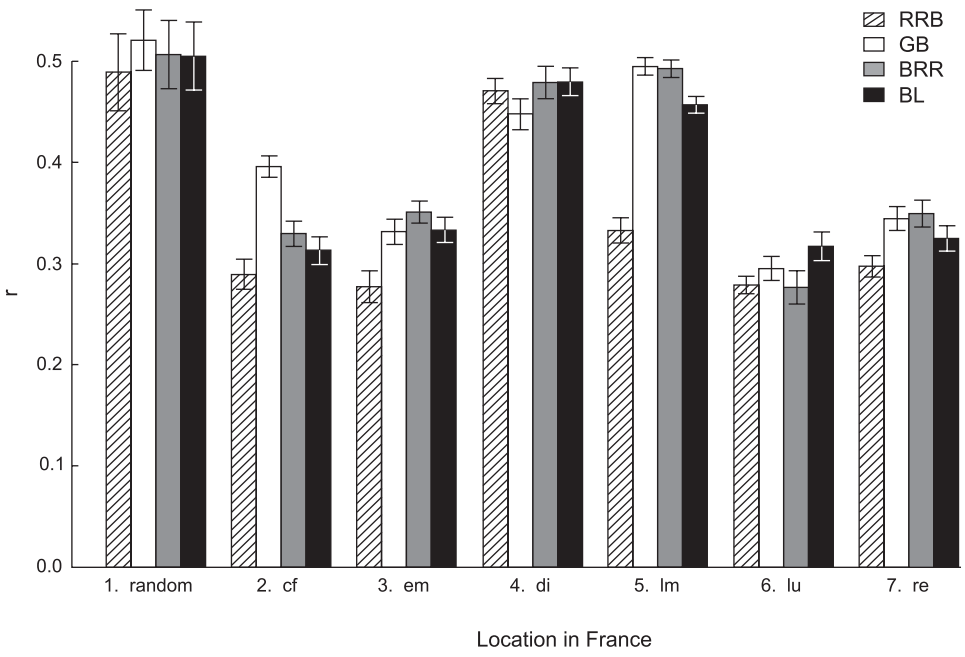


Fig. 2. Mean (and standard deviation from 100 cross-validations) of correlations between GEBV estimated from four statistical models and yield predicted in each of the 6 locations and using all locations.

RRB: Ridge regression BLUP, GB: G-BLUP, BRR: Bayesian Ridge regression, BL: Bayesian LASSO.

selection based on GEBV may not be worse than that based on phenotypes.

However, all studies published so far have failed to obtain very high prediction accuracies. This may be due to the small size of the training population, which is most often lower than 1000. Hayes *et al*. (2009) gave an estimate of the training population required to achieve an accuracy of 0,8, according to trait heritability. For a trait with $h^2 = 0,5$, the theoretical population size is about 5000, nearly twentyfold more than in the present study. Another limitation could come from sparse marker coverage. However, the average marker density achieved with the Dart markers, although unevenly distributed on the genome, seems to be sufficient. This is related to the minimal extent of LD range in the studied material, which itself depends on the number of founder lines and number of generations or the effective population size, as discussed by Heffner *et al*. (2010). As we do not have reliable map positions for every marker, we do not present the pattern of LD in the studied material. However at first glance there are some high values of LD between markers at a few cM apart. Other parameters which affect prediction accuracy have been recently discussed (Zhong *et al*., 2009; Iwata, Jannink, 2011).

The correlation values obtained in this study appear high enough to provide prediction accuracies of TBV of the same magnitude as that provided by replicated phenotypic trials. However, compared to dairy cow, the economic advantage of replacing phenotype prediction by genomic prediction is much less obvious in wheat. Indeed, reliable phenotypic prediction of breeding value of a bull for milk production requires measuring milk production of some or hundreds of its daughters (progeny tests). This requires at least 5–6 years, and the cost is estimated to be around 40 000 € per bull (D. Boichard, pers. comm.). In wheat, 4-time replicated plots in 8–10 locations are usually considered enough to get reliable estimates of mean breeding values of a breeding line, which costs a few hundred euros. Thus the main interest of GS in wheat is shortening selection cycles to accelerate genetic gain. This should only be achieved if fast pure line fixation methods are implemented. This could be accelerated using single seed descent with off season generation in different environments (such as the shuttle breeding used in CIMMYT's programmes), or under controlled conditions using doubled haploid methods, which allow the production of and intermating of GS-selected pure

lines in only 2–3 years instead of 7–10 in classical pedigree selection.

In the framework of the French National Breedwheat programme, a fair comparison of one cycle of phenotypic selection vs two cycles of GEBV-based selection will be carried out on about 1000 DH lines from 34 breeders' crosses over a 6-year period.

References

Balding D.J., Bishop M., Cannings C. Handbook of Statistical Genetics. Chichester, UK: John Wiley and Sons Eds, 2007. V. 2. P. 919–921.

Bernardo R., Moreau L., Charcosset A. Number and fitness of selected individuals in marker-assisted and phenotypic recurrent selection // Crop Sci. 2006. V. 46. P. 1972–1980.

Bernardo R., Yu J.M. Prospects for genomewide selection for quantitative traits in maize // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 1082–1090.

Blanc G., Charcosset A., Veyrieras J.B. *et al*. Marker-assisted selection efficiency in multiple connected populations: a simulation study based on the results of a QTL detection experiment in maize // Euphytica. 2008. V. 161. P. 71–84.

Complementary strategies to raise wheat yield potential // Proc. Symp. Complementary strategies to raise wheat yield potential, CIMMYT headquarters / Eds M. Reynolds, D. Eaton. 10–13 November 2009. Mexico: CIMMYT, 2009. 33 p.

Coster A. Package 'pedigree'. 2010. Available at http://cran.r-project.org/web/packages/pedigree/pedigree.pdf

Crossa J., de los Campos G., Pérez P. *et al*. Prediction of genetic values of quantitative traits in plant breeding using pedigree and molecular markers // Genetics. 2010. V. 186. P. 713–724.

De los Campos G., Pérez P. The Bayesian Linear Regression Package V.1.2. 2010. Available at http://cran.r-project.org/web/packages/BLR/index.html.

Eathington S.R., Crosbie T.M., Edwards M.D. *et al*. Molecular markers in a commercial breeding program // Crop Sci. 2007. V. 47. P. 154–163.

FAO. World Agriculture: Towards 2015/2030. Roma: FAO, 2002. 77 p.

Gimelfarb A., Lande R. Simulation of marker assisted selection in hybrid populations // Genet. Res. 1994. V. 63. P. 39–47.

Goddard M.E., Hayes B.J. Genomic selection // J. Anim. Breed. Genet. 2007. V. 124. P. 323–330.

Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges: Invited review // J. Dairy Sci. 2009. V. 92. V. 433–443.

Heffner E.L., Sorrells M.E., Jannink J.L. Genomic selection for crop improvement // Crop Sci. 2009. V. 49. P. 1–12.

Heffner E.L., Lorenz A.J., Jannink J.-L. Sorrells M.E. Plant breeding with genomic selection: gain per unit time and cost // Crop Sci. 2010. V. 50. P. 1681–1690.

Henderson C.R. Best linear unbiased estimation and prediction under a selection model // Biometrics. 1975. V. 31. P. 423–444.

Hospital F., Moreau L., Lacoudre F. *et al*. More on the efficiency of marker-assisted selection // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 95. P. 1181–1189.

Iwata H., Jannink J.L. Accuracy of genomic selection prediction in barley breeding programs: a simulation study based on the real single nucleotide polymorphism data of barley breeding lines // Crop Sci. 2011. V. 51. P. 1915–1927.

Jannink J.L., Lorenz A.J., Iwata H. Genomic selection in plant breeding: from theory to practice // Brief. Funct. Genom. Proteom. 2010. V. 9. P. 166–177.

Lande R., Thompson R. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits // Genetics. 1990. V. 124. P. 743–756.

Lorenzana R.E., Bernardo R. Accuracy of genotypic value predictions for marker-based selection in biparental plant populations // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 120. P. 151–161.

Meuwissen T.H.E., Hayes B., Goddard M.E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps // Genetics. 2001. V. 157. P. 1819–1829.

Moreau L., Charcosset A., Hospital F., Gallais A. Marker-assisted selection efficiency in populations of finite size // Genetics. 1998. V. 148. P. 1353–1365.

Pérez P., de los Campos G., Crossa J., Gianola D. Genomic-enabled prediction based on molecular markers and pedigree using the BLR package in R // Plant Genome. 2010. V. 3. P. 106–116.

Piepho H.P. Ridge regression and extensions for genomewide selection in maize // Crop Sci. 2009. V. 49. P. 1165–1175.

R Development Core Team. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R foundation for statistical computing, 2011. Available at http://www.R-project.org.

Wheat Facts and Futures / Eds J. Dixon, H.J. Braun, P. Kosina, J. Crouch. Mexico, D.F.: CIMMYT, 2009. 95 p.

Whittaker J.C., Thompson R., Denham M.C. Marker-assisted selection using ridge regression // Genet. Res. 2000. V. 75. P. 249–252.

Zhong S.Q., Dekkers J.C.M., Fernando R.L., Janink J.L. Factors affecting accuracy from genomic selection in populations derived from multiple inbred lines: A barley case study // Genetics. 2009. V. 182. P. 355–364.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГЕНОМНОЙ СЕЛЕКЦИИ НА ПШЕНИЦЕ

Ж. Шармэ, Э. Сторли

Национальный институт сельскохозяйственных исследований (INRA) в Клермон-Ферране, Клермон-Ферран, Франция, e-mail: gilles.charmet@clermont.inra.fr

Ввиду ожидаемой разработки тысяч молекулярных маркеров для большинства культур сместились акценты в теории MAS-селекции (маркер-опосредованной селекции) от маркирования определенных QTL (локусов количественных признаков) несколькими маркерами в сторону так называемой геномной селекции с помощью большого числа маркеров, покрывающих весь геном. Наборы маркеров, покрывающие геном, уже используются для анализа ассоциаций между полиморфизмами по маркерам и признаками (качественными или количественными). При этом обязательным является условие, чтобы ген (или QTL) находился в достаточном неравновесии по сцеплению (LD) с прилегающими к нему маркерами, используемыми для генотипирования. Величина LD варьирует от вида к виду и зависит от типа генетического материала. Так, сообщалось, что при анализе самоопыляющихся видов (особенно селекционных линий таких видов) величина LD составляет до 1 cM и более. При таких условиях для предсказания селекционной ценности признака можно использовать маркеры, не прибегая к анализу локусов количественных признаков. Используя DArT-маркеры на селекционном материале INRA, мы демонстрируем пример применения метода геномной селекции в качестве альтернативы традиционному подходу, основанному на фенотипической оценке. В исследовании проводится оценка возможности использования различных моделей («GBLUP», «Ridge Regression BLUP», «Bayesian Ridge Regression» и «Lasso») для предсказания урожайности генотипов, оцененных в широкой сети испытательных участков с 2000 по 2009 гг. С учетом небольшого размера обучающей популяции в ходе перекрестной проверки получены удовлетворительные предсказательные коэффициенты.

Ключевые слова: геномная селекция, селекционная ценность, метод «GBLUP», метод «Ridge Regression», метод «LASSO».

УДК 633.111.1:631.524:631.547.5

ВРЕМЯ КОЛОШЕНИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ И ИЗОГЕННЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ДОМИНАНТНЫМИ АЛЛЕЛЯМИ *Vrn-B1a* И *Vrn-B1c*

© 2012 г. **М.В. Емцева, Т.Т. Ефремова, В.С. Арбузова**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: emtseva@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 21 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 декабря 2011 г.

Изучено время колошения замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы с аллелями *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* без яровизации и после 30-суточной яровизации в условиях теплицы и поля. Показано, что без яровизации в теплице и в поле растения с аллелем *Vrn-B1*c выколашивались на несколько дней раньше растений с аллелем *Vrn-B1a*. Однако на яровизацию сильнее реагировали растения с аллелем *Vrn-B1a*, что выражалось в более ускоренном колошении. У гибридов F_1, полученных от скрещивания изогенных линий, несущих аллели *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a*, доминировал более слабый аллель *Vrn-B1a*. Таким образом, получено экспериментальное подтверждение множественного аллелизма гена *Vrn-B1*, контролирующего яровой тип развития пшеницы.

Ключевые слова: замещенные и изогенные линии мягкой пшеницы, доминантные аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*, время колошения.

Введение

Продолжительность вегетационного периода мягкой пшеницы является одним из важных адаптивных признаков и определяет не только продуктивность растений, но и устойчивость их к засухе, низким температурам, болезням и другим стрессовым факторам. На время колошения, кроме факторов внешней среды, наибольшее влияние оказывают три группы генов: гены реакции на яровизацию (*Vrn*), чувствительности к фотопериоду (*Ppd*) и раннеспелости (*Eps*). У пшеницы известны гены *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* (ранее *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3*, совместно их обозначают как локусы *Vrn-1*), локализованные в хромосомах 5AL, 5BL и 5DL (Law *et al.*, 1976; Майстренко, 1992; Worland, 1996; McIntosh *et al.*, 2007), *Vrn-D4* (ранее *Vrn4*) – в хромосоме 5D (Kato *et al.*, 1993) и *Vrn-B3* (ранее *Vrn5*) – в хромосоме 7BS (Law, Wolfe, 1966; Yan *et al.*, 2006).

Пшеницы могут быть классифицированы на яровые, озимые и двуручки. Озимым пшеницам для перехода к колошению необходима яровизация – длительное воздействие низкими положительными температурами. Яровые растения выколашиваются без яровизации при посеве весной. Озимый тип развития определяется присутствием рецессивных аллелей во всех локусах *Vrn*, яровой тип – наличием доминантного аллеля как минимум одного из генов *Vrn* (Pugsley, 1971). Двуручки способны выколашиваться как при весеннем, так и при осеннем посеве. По мнению А.Ф. Стельмаха (1985, 1986), типичные двуручки имеют один доминантный ген *Vrn-B1* в чувствительном к фотопериоду сорте. Б.В. Ригин с сотрудниками (1985), наоборот, считают, что разница между яровыми пшеницами и двуручками обеспечивается разными аллелями доминантного гена *Vrn-A1*.

Доминантный ген *Vrn-A1* эпистатичен по отношению к остальным генам *Vrn*, и считается, что носители этого гена не чувствительны к яровизации. Доминантные аллели генов *Vrn-B1*, *Vrn-D1* и *Vrn-D4* определяют небольшую чувствительность к яровизации (Pugsley, 1971, 1972). Гены *Vrn* по-разному влияют на длину вегетационного периода. Самыми раннеспелыми являются сорта, несущие доминантный аллель

гена *Vrn-A1*, тогда как сорта с доминантным аллелем в одном только гене *Vrn-B1* – самые позднеспелые. Сорта, несущие доминантный аллель гена *Vrn-D1*, занимают по колошению промежуточное положение между двумя указанными группами, но ближе скорее к растениям с *Vrn-A1*, чем с *Vrn-B1* (Pugsley, 1972; Košner, Pánková, 2004).

Предполагают, что манипулирование длиной вегетационного периода мягкой пшеницы возможно также при использовании доминантных аллелей генов *Vrn* с различным фенотипическим проявлением. Существование множественного аллелизма генов, контролирующих яровой тип развития, показано в первых работах по генетическому изучению этого признака (Tsunewaki, Jenkins, 1961, цит. по: Гончаров, 2002). После обозначения доминантных генов ярового типа развития символом *Vrn* (Pugsley, 1972) и хромосомной локализации трех генов *Vrn1*, *Vrn2*, *Vrn3* в хромосомах 5-й гомеологической группы пшеницы появились работы, подтверждающие эту гипотезу (Snape *et al.*, 1976; Roberts, McDonald, 1984; Майстренко, 1992; Koval, Goncharov, 1998). Для гена *Vrn1* (по современной номенклатуре *Vrn-A1*) было показано наличие двух аллелей, обозначенных *Vrn1a* и *Vrn1b*, у сортов Новосибирская 67 и Пиротрикс 28 соответственно (Koval, Goncharov, 1998; Гончаров, 2002). При этом изогенная линия с аллелем *Vrn1a* выколашивалась примерно на неделю раньше линии с аллелем *Vrn1b*, и носители аллеля *Vrn1a* были не чувствительны к яровизации, в то время как растения со слабым аллелем *Vrn1b* реагировали на яровизацию ускорением колошения. Проведенные молекулярно-генетические исследования подтвердили эти результаты: показано, что сорт Новосибирская 67 имеет аллель *Vrn-A1a*, а Пиротрикс 28 – *Vrn-A1b* (Shcherban *et al.*, 2011).

Множественный аллелизм гена *Vrn-B1* (ранее *Vrn2*) впервые был предположен на основании различия во времени колошения замещенных линий Саратовская 29(Мироновская 808 5А) и Диамант 2(Мироновская 808 5А) (Майстренко, 1992). У яровых сортов-доноров Саратовская 29 (С29) и Диамант 2 (Дм2), тип развития которых определяется присутствием доминантных аллелей двух генов (*Vrn-A1* и *Vrn-B1*) и которые не отличаются по времени колошения из-за присутствия эпистатичного гена *Vrn-A1*, хромосома 5А была замещена на хромосому 5А озимого сорта Мироновская 808 (М808) с рецессивным аллелем гена *Vrn-A1*. Таким образом, тип развития полученных замещенных линий определялся одинаково: *vrn-A1 Vrn-B1 vrn-D1*, однако линии были более позднеспелыми, чем сорта-доноры, и линия С29(М808 5А) выколашивалась раньше линии Дм2(М808 5А) в среднем на 12 дней. Поэтому был сделан вывод о наличии у гена *Vrn2* двух аллелей, $Vrn2a^S$ (*Vrn-B1c*) и $Vrn2b^D$ (*Vrn-B1a*), от сортов С29 и Дм2 соответственно. Растения с аллелем *Vrn-B1c* выколашивались раньше растений с аллелем *Vrn-B1a*.

Для детального изучения влияния разных доминантных аллелей гена *Vrn-B1* на продолжительность вегетационного периода были созданы две линии озимого сорта Sava с межсортовым замещением хромосомы 5В на таковую от яровых сортов С29 и Дм2 – Sava(С29 5В) и Sava(Дм2 5В) и две изогенные линии озимого сорта Безостая 1 (Без1) с доминантными аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* от этих же сортов, обозначенные i:Без1*Vrn-B1c* и i:Без1*Vrn-B1a* соответственно (Efremova *et al.*, 2011). В этих линиях разные доминантные аллели гена *Vrn-B1* находятся в одинаковой генотипической среде, что позволяет более точно выявить различия в продолжительности периода от всходов до колошения. Однако эффекты разных аллелей на время колошения и реакцию на яровизацию с использованием полученных нами линий до конца не изучены.

В последние годы аллели локуса *Vrn-1* были клонированы и охарактеризованы на молекулярном уровне. У мягкой пшеницы было выявлено три доминантных аллеля *Vrn-A1*, которые ассоциированы с инсерцией (I) и делецией (II) в промоторной области и с большой делецией в составе первого интрона (III) и обозначены *Vrn-A1a*, *Vrn-A1b* и *Vrn-A1c* соответственно (Yan *et al.*, 2004; Fu *et al.*, 2005). У твердой пшеницы обнаружены аллели *Vrn-A1b*, *c*, *d*, *e, f*, *g*, *h*, которые также имеют инсерции или делеции в промоторе или первом интроне (Yan *et al.*, 2004; Dubcovsky *et al.*, 2006). Кроме того, выявлены 3 мутантные формы гена *Vrn-B1*, являющиеся доминантными аллелями. Доминантный аллель *Vrn-B1a* отличается от рецессивного *vrn-B1*

большой делецией 6850 п.н. в составе первого интрона (Fu *et al.*, 2005), второй аллель *Vrn-B1b* отличается от *Vrn-B1a* одной нуклеотидной заменой и небольшой делецией 36 п.н. в первом интроне (Santra *et al.*, 2009), третья мутация (аллель *Vrn-B1c*) связана с делецией 820 п.н. и дупликацией 431 п.н., перемещенной в начало этой делеции, в первом интроне. При этом первичная структура аллеля *Vrn-B1c* сохраняла высокую степень гомологии как с аллелем *Vrn-B1a*, так и с другими изученными аллелями данного гена (Shcherban *et al.*, 2011).

Целью данного исследования является выяснение различий во времени колошения и реакции на яровизацию у замещенных линий на основе сорта Sava и изогенных линий на основе сорта Без1 с двумя разными доминантными аллелями гена *Vrn-B1*, а также изучение наследования признака период «всходы–колошение» у гибридов F_1 и F_2, полученных от скрещивания двух изогенных линий.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили сорта и линии, представленные в табл. 1. Схемы получения замещенных линий сорта Sava и изогенных линий сорта Без1 описаны ранее (Efremova *et al.*, 2011), где представлены результаты изучения замещенных линий сорта Sava после 5 и 6 беккроссов (BC_5–BC_6). В настоящем исследовании нами были изучены замещенные линии BC_7.

Анализ времени колошения и реакции на яровизацию проводился в теплице в 2010 г. Для этого 4-дневные проростки замещенных и изогенных линий яровизировались в течение 30 дней в темноте при температуре +1 °С. Неяровизированные и яровизированные проростки по 20 шт. каждого сорта или линии высаживали в теплице одновременно и выращивали при 14-часовом искусственном дне при температуре +23 ± 3 °С. Время до колошения считали с момента высадки. Кроме того, время колошения сортов, замещенных и изогенных линий, а также гибридов F_1 и F_2, полученных от скрещивания изогенных линий, изучали в поле в условиях Новосибирска. Каждую линию высеяли 24 мая 2010 г. в количестве 60 зерен. Достоверность различий по числу дней до колошения у линий, несущих аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*, рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Для определения генотипа изогенных и замещенных линий по генам *Vrn* были использованы изогенные линии A.T. Pugsley по сорту Triple Dirk (TD): TD D с геном *Vrn-A1*, TD B с *Vrn-B1*, TD E с *Vrn-D1* и TD F с *Vrn-D4*. В качестве рецессивной формы был использован озимый сорт Филатовка. Размножение гибридов F_1 проводили в теплице, а гибриды F_2 высевали в

Таблица 1

Материал исследования

Сорт, линия	Гаплоидный генотип по локусам *Vrn-1*	Литературный источник
Саратовская 29 (С29)	***Vrn-A1 Vrn-B1c*** *vrn-D1*	Майстренко, 1992
Диамант 2 (Дм2)	***Vrn-A1 Vrn-B1a*** *vrn-D1*	–”–
Омская 9	*vrn-A1* ***Vrn-B1c*** *vrn-D1*	http://www.vurv.cz; Shcherban *et al*., 2012
Federation	*vrn-A1* ***Vrn-B1c*** *vrn-D1*	–”–
Mara	*vrn-A1* ***Vrn-B1a*** *vrn-D1*	–”–
Triple Dirk B	*vrn-A1* ***Vrn-B1a*** *vrn-D1*	Pugsley, 1972; Fu *et al*., 2005
С29(М808 5А)	*vrn-A1* ***Vrn-B1c*** *vrn-D1*	Майстренко, 1992
Дм2(М808 5А)	*vrn-A1* ***Vrn-B1a*** *vrn-D1*	–”–
Sava(С29 5В) BC_7F_4	*vrn-A1* ***Vrn-B1c*** *vrn-D1*	
Sava(Дм2 5В) BC_7F_4	*vrn-A1* ***Vrn-B1a*** *vrn-D1*	
i:Без1*Vrn-B1c* BC_8F_3	*vrn-A1* ***Vrn-B1c*** *vrn-D1*	Efremova *et al*., 2011; Shcherban *et al*., 2011
i:Без1*Vrn-B1a* BC_8F_3	*vrn-A1* ***Vrn-B1a*** *vrn-D1*	–”–

поле в 2010–2011 гг. по 140 зерен в каждой комбинации и проводили разделение по фенотипу на яровые и озимые формы в конце вегетации. К озимым относили растения, которые не выколосились или не вышли в трубку после 100 дней от всходов (последние даты наблюдений – 10–15 сентября). Для определения соответствия фактически полученных результатов теоретически ожидаемым использовали критерий χ^2.

Анализ метафазы I мейоза дисомных растений замещенных линий сорта Sava ($BC_7F_{3–4}$) проводили на временных давленных ацетокарминовых препаратах материнских клеток пыльцы. Для этого пользовались микроскопом Axioskop 2 фирмы «Zeiss». Микрофотографии делали цифровой камерой фирмы «Микромед».

Результаты и обсуждение

Мейоз у растений замещенных линий Sava(C29 5B) и Sava(Дм2 5B) (BC_7F_4)

Установлены высокая стабильность мейоза и правильная конъюгация хромосом у растений замещенных линий. У замещенной линии Sava(C29 5B) из 27 изученных растений 26 растений имели в метафазе I 21 бивалент закрытого типа (рис. 1), и только одно растение имело конфигурацию 20”+1’ (моносомик). У линии Sava(Дм2 5B) все 42 изученных растения имели 21 бивалент. Цитологически отобранные дисомные растения BC_7F_4 были включены в эксперимент по изучению времени колошения.

Определение генотипа замещенной и изогенных линий по генам *Vrn*

Отсутствие расщепления при скрещивании с тестером TD B и дигенное расщепление с остальными тестерами TD D, TD E и TD F, а также моногенное расщепление с озимым тестером указывают на то, что яровой тип развития замещенной линии Sava(Дм2 5B) и изогенных линий i:Без1*Vrn-B1c* и i:Без1*Vrn-B1a* контролируется моногенно – доминантным геном *Vrn-B1* (табл. 2). Выделение родоначальных дисомных растений замещенной линии Sava(C29 5B) было проведено позже, поэтому данная линия не была включена в этот эксперимент.

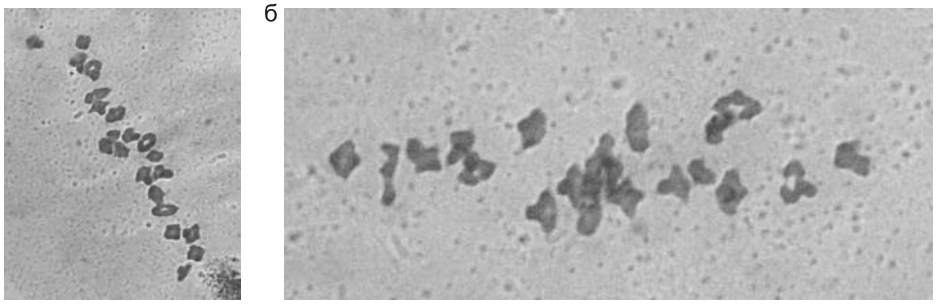


Рис. 1. Метафаза I мейоза (21 бивалент) у замещенных линий.

а – Sava(C29 5B); б – Sava(Дм2 5B).

Таблица 2

Идентификация числа генов *Vrn* и определение генотипа у замещенной линии на основе сорта Sava и изогенных линий на основе сорта Безостая 1

Линии	Расщепление на яровые/озимые формы гибридов F_2 от скрещивания изучаемых линий с изогенными линиями сорта Triple Dirk и рецессивным тестером					Генотип*
	TD D (*Vrn-A1*) 15:1	TD B (*Vrn-B1*)	TD E (*Vrn-D1*) 15:1	TD F (*Vrn-D4*) 15:1	Озимый сорт 3:1	
i:Без1*Vrn-B1c*	144:6	**142:0**	133:4	139:4	–	*Vrn-B1*
i:Без1*Vrn-B1a*	128:5	**124:0**	127:7	132:5	114:29	*Vrn-B1*
Sava(Дм2 5B)	119:11	**122:0**	111:8	107:7	–	*Vrn-B1*

* Указан только доминантный ген, определяющий яровой тип развития.

Время колошения замещенных и изогенных линий в теплице без яровизации и после 30-суточной яровизации

Сопоставление продолжительности периода до колошения у растений замещенных и изогенных линий в условиях теплицы указывает на достоверное влияние на этот признак разных аллелей гена *Vrn-B1*. Так, замещенные линии С29(М808 5А), Sava(С29 5В) и изогенная линия i:Без1*Vrn-B1c*, несущие аллель *Vrn-B1c*, выколашивались за 44, 55 и 60 дней соответственно (рис. 2). Линии с аллелем *Vrn-B1a* – Дм2(М808 5А), Sava(Дм2 5В) и i:Без1*Vrn-B1a* колосились несколько позже, а именно за 60, 57 и 63 дня соответственно. Таким образом, различие по продолжительности периода «всходы–колошение» между линиями с аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* составило 16 ($P > 0{,}999$), 2 ($P > 0{,}99$) и 3 ($P > 0{,}99$) дня у линий С29(М808 5А) и Дм2(М808 5А), замещенных линий на основе сорта Sava и изогенных линий на основе сорта Без1 соответственно. Сорта-доноры С29 и Дм2, яровой тип развития которых контролируется дигенно (табл. 1), не различались достоверно между собой по датам колошения (47 и 46 дней соответственно).

В наших предыдущих исследованиях в условиях Новосибирска и Казахстана (Efremova *et al.*, 2011) также был показан значимый фенотипический эффект двух аллелей, *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a*, на время колошения. При этом разница между замещенными и изогенными линиями была значительно больше – до 10 и более дней, что, вероятно, связано с различными условиями выращивания при проведении этих экспериментов.

Все 6 линий достоверно реагировали на яровизацию ускорением колошения. После 30-суточной яровизации у замещенных линий С29(М808 5А) и Дм2(М808 5А) разница между аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* сократилась с 15 до 10 дней ($P > 0{,}999$), а у замещенных линий на основе сорта Sava и изогенных линий на основе сорта Без1 растения с аллелем *Vrn-B1c* стали выколашиваться на 1 и 6 дней ($P > 0{,}999$) позже, чем растения с аллелем *Vrn-B1a* (рис. 2). У изогенных линий на основе сорта Без1 разница по реакции на яровизацию между растениями с аллелями *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* была 9 дней, а у замещенных линий С29(М808 5А) и Дм2(М808 5А) и замещенных линий на основе сорта Sava эта разница составила 6 и 3 дня соответственно. Сильнее всех реагировала на яровизацию изогенная линия i:Без1*Vrn-B1a* (15 дней). Таким образом, без яровизации растения с аллелем *Vrn-B1c* выколашивались раньше растений с *Vrn-B1a*, но на яровизацию ускорением колошения сильнее реагировали растения с аллелем *Vrn-B1a*. Это подтверждает данные О.И. Майстренко (1992) о разной реакции на яровизацию носителей двух аллелей: более позднеспелые генотипы сильнее реагируют на яровизацию.

Продолжительность периода «всходы–колошение» у сортов, замещенных и изогенных линий в полевых условиях

Время колошения сортов-доноров С29 и Дм2 в условиях поля в 2010 г. различалось и составило 46 и 51 день соответственно (рис. 3). Замещенные линии С29(М808 5А) и Дм2(М808 5А), созданные на основе этих сортов, выколашивались позже рекуррентных родителей, через 50 и 60 дней после всходов соответственно, и разница между линиями составила 10 дней ($P > 0{,}999$). Замещенные линии на основе сорта Sava и изогенные линии на основе сорта Без1 с аллелем *Vrn-B1c* также выколашивались раньше линий, несущих аллель *Vrn-B1a*. Для замещенных линий эта разница составила 4 дня (60 и 64 дня у Sava(С29 5В) и Sava(Дм2 5В) соответственно), а для изогенных линий – 5 дней (54 и 59 дней у i:Без1*Vrn-B1c* и i:Без1*Vrn-B1a* соответственно). При этом оказалось, что в целом изогенные линии сорта Без1 являются более скороспелыми, чем замещенные линии сорта Sava, хотя в предыдущем эксперименте (Efremova *et al.*, 2011) в условиях короткого дня эти линии не различались по скороспелости. Вероятно, это различие между замещенными и изогенными линиями связано с взаимодействием генов *Vrn* и *Ppd* и реакцией конкретного генотипа на условия среды. Известно, что оба сорта-реципиента Sava и Без1 имеют доминантные аллели гена *Ppd-D1* и не чувствительны к длине дня (Worland *et al.*, 1998; McIntosh *et al.*,

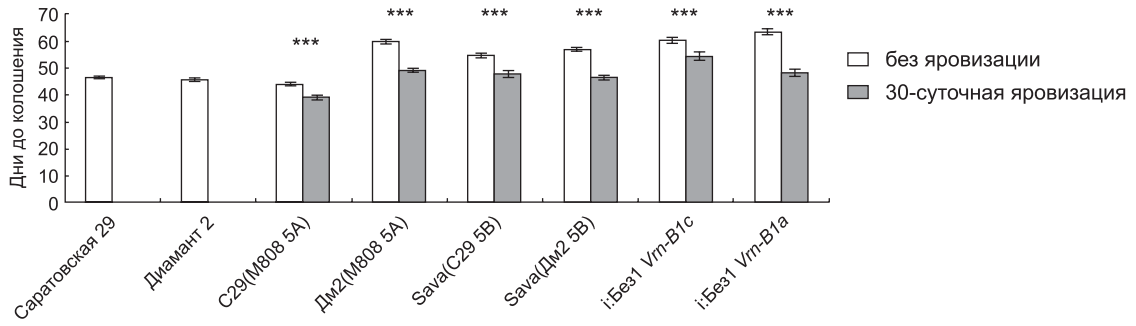


Рис. 2. Время колошения и реакция на 30-суточную яровизацию замещенных и изогенных линий с аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* и время колошения у сортов-доноров (теплица 2010 г.).

*** Достоверные различия ($P > 0{,}999$).

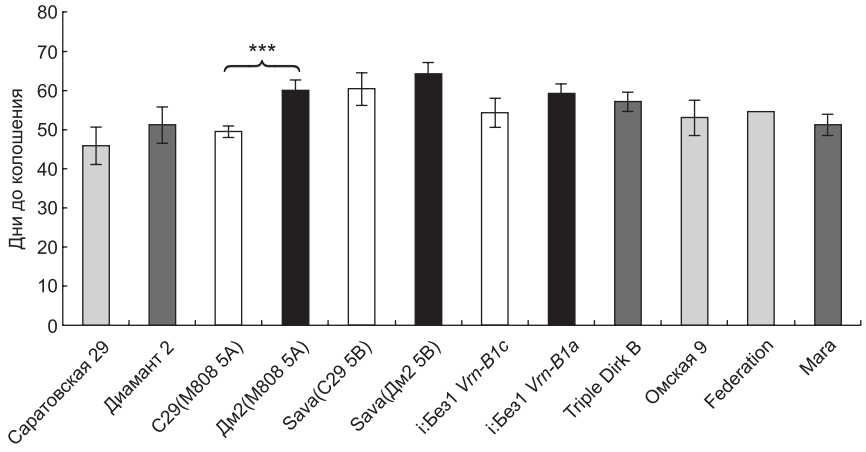


Рис. 3. Число дней от всходов до колошения у сортов, замещенных и изогенных линий с аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* (белый, светло-серый цвет – носители *Vrn-B1c*, черный, темно-серый цвет – носители *Vrn-B1a*) (Новосибирск, поле 2010 г.).

*** Достоверные различия ($P > 0{,}999$).

2010). При этом исследователи отмечали, что генотипы с доминантными аллелями генов *Ppd* являются более скороспелыми при условиях как короткого, так и длинного дня (Гончаров, 2002), поэтому для окончательного объяснения этого вопроса необходимо дальнейшее изучение полученных нами линий в различных условиях выращивания. Но факт влияния аллелей *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* на различия во времени колошения пшеницы не вызывает сомнения.

Результаты изучения сортов Омская 9, Federation, Mara и линии TD B показывают, что генотипы с доминантным аллелем в одном только гене *Vrn-B1* выколашиваются в среднем на 8 дней позже по сравнению с сортами-носителями доминантного аллеля *Vrn-A1* C29 и Дм2. Колошение сортов Омская 9 и Federation, несущих аллель *Vrn-B1c* (таб. 1), наступало на 53–54-й день, а у изогенной линии TD B (*Vrn-B1a*) – на 57-й день. Эффект слабого доминантного аллеля *Vrn-B1a* у сорта Mara (табл. 1) в этом эксперименте не был показан, сорт колосился раньше, чем сорта Омская 9 и Federation, – на 51-й день, хотя в экспериментах 2005–2006 гг. (Efremova *et al.*, 2011) сорт Mara отличался позднеспелостью, как и линия TD B. Различия между указанными сортами по времени колошения обусловлены не только эффектами гена *Vrn-B1*, но и действием других генетических систем, о которых говорилось выше (*Ppd* и *Eps*), а также действием факторов внешней среды, таких, как интенсивность света и питания.

Продолжительность периода «всходы–колошение» у гибридов F_1 и F_2, полученных от скрещивания изогенных линий, несущих аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*

Продолжительность периода «всходы–колошение» у изогенных линий i:Без1*Vrn-B1c* и i:Без1*Vrn-B1a* составила 54 и 57 дней соответственно (рис. 4). У гибридов F_1 между этими линиями она была близка к значению более позднеспелой линии и составила 58 дней. Это может означать доминирование в первом поколении позднеспелости, определяемой аллелем *Vrn-B1a*.

Во втором поколении от скрещивания двух изогенных линий ни одного озимого растения не выщепилось (рис. 5), что свидетельствует об аллельности локусов *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a*. При анализе популяции F_2 видно, что растения распределяются на рано колосящиеся (48–53 дня, как у линии i:Без1*Vrn-B1c*) и поздно колосящиеся (60 и более дней, как у линии i:Без1*Vrn-B1a*), а также промежуточный класс (от 54 до 60 дней), причем большую часть растений можно отнести к позднеспелым генотипам, как у гибридов F_1.

Результаты проведенного генетического анализа подтвердили присутствие в изогенных линиях на основе сорта Без1 двух аллелей, *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c*, с разным фенотипическим эффектом. Однако для окончательного доказательства множественного аллелизма гена *Vrn-B1* необходимо провести тест на аллелизм.

Таким образом, с помощью полученных замещенных и изогенных линий пшеницы

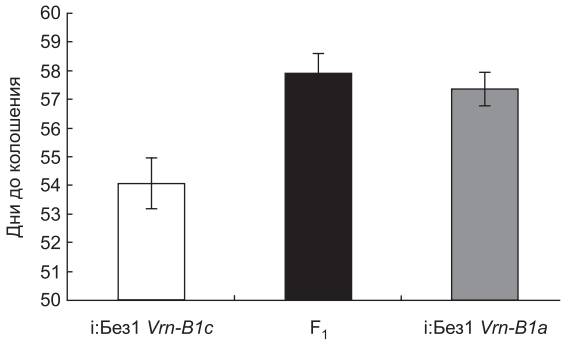


Рис. 4. Длительность периода от всходов до колошения у изогенных линий с аллелями *Vrn-B1c* и *Vrn-B1a* и гибридов F_1 между ними (Новосибирск, поле 2010 г.).

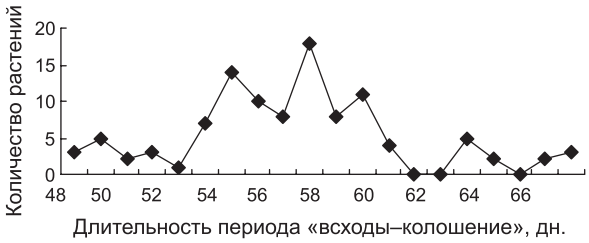


Рис. 5. Распределение по времени колошения гибридов F_2, полученных от скрещивания изогенных линий, несущих разные аллели гена *Vrn-B1* (Новосибирск, поле 2010 г.).

экспериментально доказано наличие у гена *Vrn-B1* двух аллелей, влияющих на различие во времени колошения. Созданные замещенные и изогенные линии могут быть использованы в качестве уникальных моделей для изучения молекулярно-генетических механизмов регуляции продолжительности вегетационного периода мягкой пшеницы.

Авторы выражают благодарность рецензентам, а также Н.П. Гончарову за помощь при подготовке статьи. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ (№ 10-04-00661а), Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Биологическое разнообразие» № 26/28 и интеграционного проекта Президиума СО РАН № 60.

Литература

Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Новосибирск: Сиб. универ. изд-во, 2002. 252 с.

Майстренко О.И. Использование цитогенетических методов в исследовании онтогенеза мягкой пшеницы // Онтогенетика высших растений: Сб. науч. тр. Ин-т генетики Республики Молдова. Кишинев: Штиинца, 1992. С. 98–114.

Ригин Б.В., Звейнек С.Н., Булавка Н.В. Генотипы образцов яровой мягкой пшеницы по генам, контролирующим тип развития // Каталог мировой коллекции Всесоюзного института растениеводства им. Н.И. Вавилова. 1985. Т. 427. С. 38.

Стельмах А.Ф. Генотип типичных двуручек мягкой пшеницы по локусам *Vrn1-3* и *Ppd1-3* // Науч.-техн. бюлл. Одесса: ВСГИ, 1985. Т. 2 (56). С. 15–20.

Стельмах А.Ф. Типичные двуручки мягкой пшеницы и их генетическая природа // С.-х. биология. М., 1986. Т. 2. С. 22–30.

Dubcovsky J., Loukouianov A., Fu D.L. *et al.* Effect of photoperiod on the regulation of wheat vernalization genes *VRN1* and *VRN2* // Plant. Mol. Biol. 2006. V. 60. P. 469–480.

Efremova T.T., Arbuzova V.S., Leonova I.N., Makhmudova K. Multiple allelism in the *Vrn-B1* locus of common wheat // Cereal Res. Commun. 2011. V. 39. No 1. P. 12–21.

Fu D., Szucs P., Yan L. *et al*. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // Mol. Gen. Genomics. 2005. V. 273. P. 54–65.

Kato K., Nakagawa K., Kuno H. Chromosomal location of the genes for vernalization response, *Vrn2* and *Vrn4*, in common wheat, *Triticum aestivum* L. // Wheat Inform. Serv. 1993. V. 76. P. 53.

Košner J., Pánková K. Chromosome substitutions with dominant loci *Vrn-1* and their effect on developmental stages of wheat // Czech J. Genet. Plant Breed. 2004. V. 40. No 2. P. 37–44.

Koval S.F., Goncharov N.P. Multiple allelism at the *VRN1* locus of common wheat // Acta Agron. Hung. 1998. V. 46. No 2. P. 113–119.

Law C.N., Wolfe M.S. Location of genetic factors for mildew resistance and ear emergence time on chromosome 7B of wheat // Canad. J. Genet. Cytol. 1966. V. 8. No 3. P. 462–470.

Law C.N., Worland A.J., Giorgi B. The genetic control of ear-emergence time by chromosomes 5A and 5D of wheat // Heredity. 1976. V. 36. P. 49–58.

McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat (supplement) // 2007. Available at: http://shigen.ac.jp/wheat/komugi.

McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat: 2010 supplement. Available at: http://shigen.ac.jp/wheat/komugi.

Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat // Austral. J. Agric. Res. 1971. V. 22. P. 21–31.

Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // Euphytica. 1972. V. 21. P. 547–552.

Roberts D.W.A., McDonald M.D. Evidence for the multiplicity of alleles at *Vrn1*, the winter-spring habit locus in common wheat // Can. J. Genet. Cytol. (Genome). 1984. V. 26. P. 191–193.

Santra D.K., Santra M., Allan R.E. *et al*. Genetic and molecular characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from the pacific northwest region of the USA // Plant Breed. 2009. V. 128. P. 576–584.

Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time // Mol. Breeding. 2011. DOI 10.1007/s11032-011-9581-y.

Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetical characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions // Cereal Res. Commun. 2012. (in press)

Snape J.W., Law C.N., Worland A.J. Chromosome variation for loci controlling ear emergence time on chromosome 5A of wheat // Heredity. 1976. V. 37. P. 335–340.

Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // Euphytica. 1993. V. 65. P. 53–60.

Tsunewaki K., Jenkins C. Monosomic and conventional gene analyses in common wheat, II. Growth habit and awnedness // Japan. J. Genet. 1961. V. 36. 9-12. P. 428–443.

Worland A.J. The influence of flowering time genes on environmental adaptability in European wheats // Euphytica. 1996. V. 89. P. 49–57.

Worland A.J., Börner A., Korzun V. *et al*. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheats // Euphytica. 1998. V. 100. P. 385–394.

Yan L., Helguera M., Kato K. *et al*. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1677–1686.

Yan L., Fu D., Li C. *et al*. The wheat and barley vernalization gene *Vrn-3* is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 104. P. 19581–19586.

HEADING TIME OF SUBSTITUTION AND NEAR-ISOGENIC LINES OF COMMON WHEAT WITH DOMINANT ALLELES *Vrn-B1a* AND *Vrn-B1c*

M.V. Emtseva, T.T. Efremova, V.S. Arbuzova

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

Summary

Heading time of substitution and near-isogenic lines (NILs) with *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles was studied without vernalization and after 30-day vernalization in a greenhouse and in the field. Without vernalization, both in a greenhouse and in the field, plants with the *Vrn-B1c* allele headed several days earlier than plants with *Vrn-B1a*. However, plants with *Vrn-B1a* responded to vernalization by more pronounced heading acceleration than *Vrn-B1*c plants. The weak *Vrn-B1a* allele dominated in F_1 hybrids from the cross between two NILs with the *Vrn-B1c* and *Vrn-B1a* alleles. These observations confirm the multiple allelism of the *Vrn-B1* gene, responsible for the spring growth habit in wheat.

Key words: substitution and near-isogenic lines of common wheat, dominant *Vrn-B1a* and *Vrn-B1c* alleles, heading time.

УДК 575.162

КОМБИНАЦИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Ppd* И *Vrn* ОПРЕДЕЛЯЕТ СРОКИ КОЛОШЕНИЯ У СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Е.К. Потокина[1], В.А. Кошкин[1], Е.А. Алексеева[1], И.И. Матвиенко[1], В.А. Филобок[2], Л.А. Беспалова[2]**

[1] Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: e.potokina@yahoo.com;
[2] Краснодарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Комбинация аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* анализировалась с использованием аллель-специфичных праймеров у 56 сортов и линий мягкой пшеницы селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Установлено достоверное влияние комбинации этих аллелей на сроки начала колошения изученных сортов, которое по-разному проявляется в условиях длинного и короткого фотопериода, а также зависит от наличия или отсутствия яровизации. Молекулярное маркирование аллелей генов *Vrn* и *Ppd* пшеницы дает возможность селекционерам сознательно манипулировать исходным материалом, заранее располагая информацией об адаптационном потенциале растений, вовлеченных в селекционный процесс, а также выбрать сочетания аллелей, оптимальные для конкретных условий возделывания.

Ключевые слова: мягкая пшеница, молекулярные маркеры, аллели генов *Ppd* и *Vrn*, сроки колошения, маркер-вспомогательная селекция.

Введение

Конкурентоспособность отечественных сортов зерновых культур во многом определяется оптимальной комбинацией аллелей ключевых генов, детерминирующих основные хозяйственно ценные признаки. Такими ключевыми генами, в частности, являются локусы *Vrn* (vernalization response) и *Ppd* (photoperiod response), определяющие реакцию растения на яровизацию и длину дня. Комбинация аллелей *Vrn* и *Ppd* достоверно влияет на скорость развития растений, структуру урожая, морозо- и зимостойкость, потребность в яровизации, засухоустойчивость, «уход» от высоких летних температур, устойчивость к болезням (Стельмах и др.,1987; Мережко и др., 1997). Гены *Vrn* и *Ppd* клонированы в последние годы для пшеницы и ячменя, описано несколько их аллельных вариантов (Yan *et al*., 2003, 2004, 2006; Fu *et al*., 2005; Turner *et al*., 2005; Beales *et al*., 2007; Milec *et al*., 2011; Shcherban *et al*., 2011).

Ген *Ppd-D1*, локализованный в хромосоме 2D, рассматривается в качестве ключевого локуса, определяющего фотопериодическую чувствительность гексаплоидных пшениц (Beales *et al*., 2007). Ген относится к семейству генов PRR (Pseudo Response Regulator), известных регуляторов суточных ритмов у *Arabidopsis* (Turner *et al*., 2005). Доминантный аллель этого гена, обеспечивающий нейтральную реакцию на фотопериод, отличается от рецессивного аллеля делецией размером 2089 п.н., выявляемой с помощью полимеразной цепной реакции с аллель-специфичными праймерами (Beales *et al*., 2007).

Реакция на яровизацию у пшеницы контролируется по меньшей мере пятью генами *Vrn* (Goncharov, 2003; Yan *et al*., 2006; Yoshida *et al*., 2010), из которых три основных, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*, локализованы соответственно в хромосомах 5A, 5B и 5D. Озимый тип развития растения проявляется в том случае если три основных гена представлены рецессивными аллелями. При этом присутствие только одного

доминантного аллеля гена *Vrn-A1* обеспечивает полную нечувствительность растения к яровизации, доминантные аллели генов *Vrn-B1* и *Vrn-D1* лишь частично снижают потребность в ней (Pugsley, 1971, 1972). Клонирование генов *Vrn* у мягкой пшеницы позволило разработать геноспецифичные маркеры, эффективные для диагностики реакции растений на яровизацию в лабораторных условиях (Yan *et al*., 2004; Fu *et al*., 2005).

Эффективность маркирования аллелей генов *Vrn* и *Ppd* для ранней диагностики реакции растений на яровизацию и фотопериод показана в многочисленных зарубежных публикациях (Yang *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2008; Cockram *et al*., 2009), однако в практической селекции пшеницы и ячменя Российской Федерации эти маркеры пока не используются. Отечественные селекционеры, создавая сорта для разнообразных климатических зон РФ, имеют дело с мозаикой яровых и озимых форм, а также двуручек, отличающихся между собой по чувствительности к яровизирующим температурам и реакции на короткий день. Селекционерам необходима информация о генетической изменчивости, детерминирующей это разнообразие, а также реальный инструмент, позволяющий диагностировать адаптивный потенциал растения на ранней стадии развития. В задачи нашего исследования входило охарактеризовать с помощью аллель-специфичных маркеров, разработанных на сегодняшний день для *Vrn* и *Ppd*, аллельное разнообразие этих генов у сортов и линий мягкой пшеницы Краснодарского края, – ведущего по возделыванию пшеницы региона РФ, с тем чтобы установить, какие сочетания аллелей могут рассматриваться как наиболее оптимальные для конкретных условий возделывания.

Материалы и методы

Молекулярное тестирование аллелей генов *Vrn* и *Ppd* сортов мягкой пшеницы производилось на материале 54 сортов и линий Краснодарского научно-исследовательского института сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко (КНИИСХ) с известными параметрами вегетационного периода, полученными в результате наблюдений 2009–2010 гг. в ВИР. Кроме селекционного материала КНИИСХ, в анализ были взяты также сорта Ленинградка и Фотон, несущий доминантные аллели генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1*и *Vrn-D1* (Кошкин и др., 1998). Сорт Фотон был использован в качестве стандарта, по отношению к которому оценивалась продолжительность периода всходы–колошение сортов и линий, проанализированных в 2009 и 2010 гг. Для определения влияния яровизации на скорость развития растений семена образцов яровизировали при температуре 2 ºС в течение 60 сут. Чувствительность сорта пшеницы к длине дня определялась задержкой по срокам колошения на естественном длинном (17 ч 30 мин – 18 ч 50 мин) и коротком (12 ч) фотопериодах. Коэффициент фотопериодической чувствительности растения определялся соотношением двух этих величин (Кошкин и др., 1998).

Для молекулярно-генетического анализа геномную ДНК выделяли из 3-дневных проростков CTAB-методом по A. Graner с соавт. (1991). Для выявления доминантных и рецессивных аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* использовались опубликованные аллель-специфичные праймеры (табл. 1). Протоколы приготовления реакционной смеси и условия ПЦР, использованные для выявления аллелей генов *Ppd* и *Vrn*, подробно описаны в оригинальных публикациях, ссылки на них также приведены в табл. 1.

Рестрикционный анализ проводили в общем объеме пробы 15 мкл, содержащем 5 мкл продукта ПЦР, 1,5 мкл 10 × буфера SE, 1 ед. активности эндонуклеазы *Mbo*II.

Результаты и обсуждение

Аллель-специфичные праймеры для гена *Ppd-D1* ранее были эффективно использованы для прогнозирования фотопериодической чувствительности почти изогенных линий яровой мягкой пшеницы (Кошкин и др., 2009), а также сортов и линий селекции КНИИСХ (Беспалова и др., 2010). В проведенных экспериментах была установлена достоверная корреляция между присутствием доминантного аллеля гена *Ppd-D1* и слабой чувствительностью генотипов к фотопериоду. Однако сроки колошения гексаплоидных пшениц на коротком и длинном дне

Таблица 1

Аллель-специфичные праймеры, опубликованные для генов *Ppd-D1* и *Vrn* мягкой пшеницы, использованные в анализе

Тестируемый аллель гена	Аллель-специфичные праймеры, использованные в ПЦР	Температура отжига, t°	Время элонгации, с	Ожидаемый размер ДНК-фрагмента, п.н.	Литературный источник
Ppd-D1a	**Ppd1_F** ACGCCTCCCACTACACTG **Ppd1_R1** GTTGGTTCAAACAGAGAGC **Ppd1_R2** CACTGGTGGTAGCTGAGATT	54	60	288	Beales *et al*., 2007
Ppd-D1b	**Ppd1_F** ACGCCTCCCACTACACTG **Ppd1_R1** GTTGGTTCAAACAGAGAGC **Ppd1_R2** CACTGGTGGTAGCTGAGATT	54	60	414	Beales *et al*., 2007
Vrn-A1a *Vrn-A1b*	**VRN1AF** GAAAGGAAAAATTCTGCTCG **VRN1-INT1R** GCAGGAAATCGAAATCGAAG	50	60	965 + 876 714	Yan *et al*., 2004 Zhang *et al*., 2008
vrn-A1	**VRN1AF** GAAAGGAAAAATTCTGCTCG **VRN1-INT1R** GCAGGAAATCGAAATCGAAG	50	60	734	Yan *et al*., 2004 Zhang *et al*., 2008
Vrn-B1	**Intr1/B/F** CAAGTGGAACGGTTAGGACA **Intr1/B/R3** CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	63	43	709	Fu *et al*., 2005
vrn-B1	**Intr1/B/F** CAAGTGGAACGGTTAGGACA **Intr1/B/R4** CAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	58	69	1149	Fu *et al*., 2005
Vrn-D1	**Intr1/D/F** GTTGTCTGCCTCATCAAATCC **Intr1/D/R3** GGTCACTGGTGGTCTGTGC	65	90	1671	Fu *et al*., 2005
vrn-D1	**Intr1/D/F** GTTGTCTGCCTCATCAAATCC **Intr1/D/R4** AAATGAAAAGGAACGAGAGCG	63	60	997	Fu *et al*., 2005

зависят не только от унаследованных аллелей генов *Ppd*, но и от аллелей генов *Vrn*, определяющих потребность в яровизации. Известно, что от чувствительности растения к длине дня зависят процессы удлинения стебля и сроки развития соцветия, однако сам момент перехода от вегетативной к генеративной фазе определяется тем, насколько удовлетворена потребность растения в яровизации (Purvis *et al*., 1937; Gott *et al*., 1955). В настоящей работе мы останавливаемся подробнее на маркировании аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*.

Молекулярное тестирование аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*

В геноме гексаплоидных пшениц *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* являются ортологами гена *Vrn-1*, кодирующего транскрипционный фактор (MADS box) у диплоидного вида *Triticum monococcum* L. (Yan *et al*., 2003). Известно, что воздействие низких температур активирует экспрессию *Vrn-1*, высокий уровень транскриптов которого в верхушечной меристеме необходим для того, чтобы началось развитие соцветия и растение перешло к генеративной фазе (Yan *et al*., 2003; Sasani *et al*., 2009). В отсутствие яровизации у озимых пшениц экспрессия гена *Vrn-1* блокирована. Предполагается, что успешной транскрипции гена может препятствовать репрессорный белок, распознающий специфичную для себя «посадочную» нуклеотидную последовательность (binding site) в промоторном участке гена (Trevaskis, 2010). Альтернативная гипотеза заключается в том, что у неяровизированных растений ген инактивируется, благодаря специфической гистонной модификации, неактивному состоянию хроматина в локусе *Vrn-1* (Oliver *et al*., 2009). Низкие температуры, вероятно, устраняют воздействие гипотетических репрессоров, активируя транскрипцию гена.

Яровые пшеницы отличаются от озимых существенными изменениями нуклеотидной последовательности промотора или первого интрона гена *Vrn-A1*, исключающими воздействие репрессоров. Чтобы выявить эти изменения L. Yan с соавт. (2004) разработали аллель-специфичные праймеры, которые позволяют амплифицировать последовательность, включающую 5′-нетранскрибируемый участок гена, первый экзон и участок первого интрона. С использованием этих праймеров ожидаемый размер амплифицированного фрагмента ПЦР для «не нарушенного» делециями или вставками рецессивного аллеля *vrn-A1* составляет 734 п.н. (рис. 1, а). Наиболее распространенный доминантный аллель *Vrn-A1a* отличается вставками повторяющихся последовательностей в участке промотора, в результате чего продукт ПЦР представлен двумя фрагментами 965 и 876 п.н. (рис. 1, б). Доминантный аллель *Vrn-A1b* отличается от рецессивного аллеля *vrn-A1* делецией размером 20 п.н. в промоторном участке гена, соответственно, ожидаемый размер ПЦР-фрагмента – 714 п.н. Среди проанализированных генотипов алллель *Vrn-A1b* обнаружить не удалось. Использование агарозного геля не всегда позволяет с уверенностью распознавать фрагменты в 714 (*Vrn-A1b*) и 734 (*vrn-A1*) п.н., различающиеся делецией в 20 п.н. В таких случаях обработка ПЦР продукта эндонуклеазой *Mbo*II, имеющей сайт рестрикции в районе делеции, достоверно подтверждает присутствие рецессивного аллеля *vrn-A1*. Ожидаемые размеры фрагментов после обработки эндонуклеазой рестрикции составили для *Vrn-A1b* 576 и 138 п.н.; для *vrn-A1* – 315, 281 и 138 п.н. (рис. 1, в).

Известные на сегодняшний день доминантные аллели *Vrn-B1* и *Vrn-D1* отличаются от соответствующих рецессивных аллелей этих генов обширными делециями в первом интроне и эффективно выявляются с использованием аллель-специфичных праймеров, опубликованных D. Fu с соавт. (2005) (рис. 2). А. Щербань с соавт. недавно выявили и описали новый доминантный аллель *Vrn-B1c*, также отличающийся

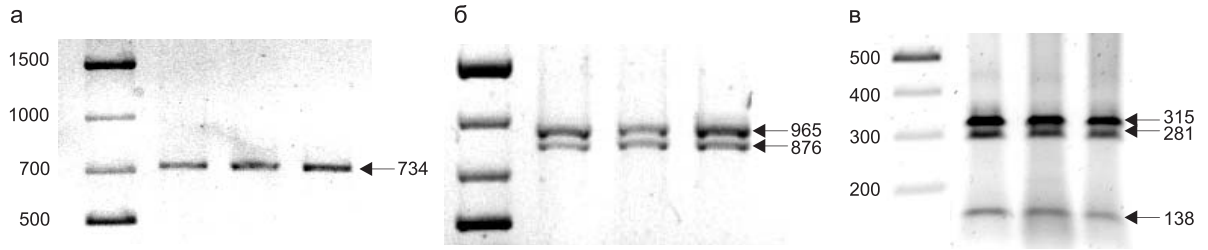


Рис. 1. Выявление аллелей гена *Vrn-A1* с помощью специфичных праймеров.

а – рецессивный (734 п.н.) аллель *vrn-A1* у линий Л.1120я1633-7, Л.1120я16к27 и Л.1120я16к7; б – доминантный аллель *Vrn-A1a* (965 и 867 п.н.) у сортов Фотон, Ленинградка, Курьер; в – рестрикция фрагмента 734 п.н. (*vrn-A1*) эндонуклеазой *Mbo*II.

существенными изменениями в последовательности первого интрона и широко встречающийся среди российских сортов мягкой пшеницы, в частности у сорта Саратовская 29 (Shcherban *et al*., 2011). Предположить наличие *Vrn-B1c* у анализируемых сортов можно при отсутствии амплификации с аллель-специфичными праймерами, описанными D. Fu с соавт. (2005) для доминантного *Vrn-B1a* (табл. 1). У проанализированного материала наличие рецессивного аллеля *vrn-B1* подтверждалось контрольной ПЦР во всех случаях, когда с праймерами Intr1/B/F и Intr1/B/R3, специфичными для аллеля *Vrn-B1a*, не удавалось получить ПЦР-продукта (рис. 2).

Влияние комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на сроки колошения сортов мягкой пшеницы

Ранее сообщалось, что гены *Vrn* по-разному влияют на сроки колошения, высоту растений и структуру урожая у пшеницы. Высказывались предположения о том, что генотипы, несущие доминантные аллели в двух генах *Vrn*, характеризуются более ранним созреванием и более высоким потенциалом урожайности (Stelmakh, 1998). Три доминантных аллеля в локусах *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* ассоциированы с повышенной скороспелостью, сопровождающейся, однако, снижением урожайности. Чтобы выяснить, каким образом комбинация аллелей этих генов может влиять на сроки начала колошения сортов мягких пшениц в условиях короткого и длинного дня, мы идентифицировали аллели генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* у 56 генотипов мягкой пшеницы, взятых в анализ.

Для этого даты начала колошения 23 генотипов, проанализированных в 2009 г. и 32 генотипов, изученных в 2010 г., были соотнесены со стандартом – сортом Фотон. Нормализованная таким образом выборка из 56 генотипов пшеницы была распределена на 8 групп по 2–16 генотипов в каждой, несущих сходную аллельную комбинацию. В табл. 2 суммированы результаты выявления аллельных комбинаций генов *Vrn* и *Ppd* у проанализированных сортов и линий, а также предоставлена информация о сроках начала колошения генотипов пшеницы в условиях естественного (T_1) и короткого (T_2) дня.

Степень и достоверность влияния комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на скорость развития растений оценивались с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (Factorial ANOVA, программное обеспечение Statistica 5.0.). Анализ показал, что сроки колошения у проанализированных сортов и линий мягкой пшеницы достоверно зависят от определенной комбинации аллелей генов *Ppd* и *Vrn* ($p < 0{,}00001$), а также от длины фотопериода ($p < 0{,}00001$). Достоверным является также и взаимодействие этих двух факторов ($p < 0{,}00001$), т. е. каждая комбинация аллелей по-разному влияет на скорость выколашивания растений, в зависимости от условий выращивания (рис. 3).

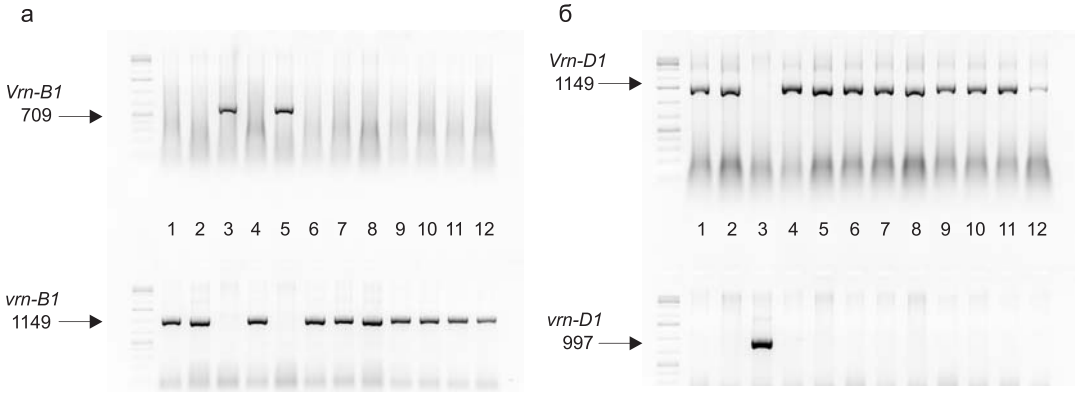


Рис. 2. Выявление доминантного (709 п.н.) и рецессивного (1149 п.н.) аллелей гена *Vrn-B1* (а), а также доминантного (1671 п.н.) и рецессивного (997 п.н.) аллелей гена *Vrn-D1* (б) у линий селекции КНИИСХ по результатам амплификации с аллель-специфичными праймерами.

Линии 1–12: Л.479-02яоС3, Л.481-02я8, Л.481-02я13, Л.481-02яоС22, Л.481-02яоС24, Л.481-02яоС28, Л.481-02яоС43, Л.483-02я6, Л.484-02я9, Л.484-02я15, Л.484-02я36, Л.489-02я6.

Таблица 2

Выявленные аллельные комбинации генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* у проанализированных сортов и линий мягкой пшеницы

Сорта, линии	Год	Яровизация		Контроль (без яровизации)		*Ppd-D1*	*Vrn-A1*	*Vrn-B1*	*Vrn-D1*	Обозначение в анализе
		T_1	T_2	T_1	T_2					
Фотон	2009	“	“	34,6 ± 0,16	38,2 ± 0,13	D	D	D	D	D-DDD
Фотон	2010	“	“	36,0 ± 0,00	37,5 ± 0,17	D	D	D	D	D-DDD
Л.1120я1633-7	2009	44,1 ± 0,79	46,8 ± 0,16	54,8 ± 0,76	74,1 ± 1,04	D	R	D	D	D-RDD
Л.1120я16к27	2009	41,9 ± 0,48	47,9 ± 0,62	65,1 ± 0,59	74,2 ± 1,04	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1120я16к7	2009	43,5 ± 0,56	46,7 ± 0,42	66,2 ± 0,65	76,7 ± 0,65	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1695я2	2009	40,2 ± 0,49	42,9 ± 0,38	65,1 ± 1,66	75,7 ± 1,01	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1761я13	2009	42,8 ± 0,74	47,0 ± 0,62	68,3 ± 0,40	75,1 ± 0,59	D	R	D/R	D	D-RDD
Л.1707я5	2009	38,3 ± 0,15	42,8 ± 0,38	43,8 ± 0,52	51,6 ± 1,09	D	R	D/R	R	D-RDR
Л.1710я2	2009	44,7 ± 0,62	49,3 ± 0,30	53,6 ± 0,34	61,6 ± 1,00	D	R	D	R	D-RDR
Паллада озим.	2009	42,7 ± 0,15	49,9 ± 0,73	59,6 ± 0,54	69,0 ± 0,42	D	R	D	R	D-RDR
Паллада яр.	2009	42,0 ± 0,26	47,0 ± 0,29	61,3 ± 0,45	70,9 ± 0,23	D	R	D	R	D-RDR
Афина озим.	2009	42,5 ± 0,27	45,5 ± 0,17	59,2 ± 0,81	71,3 ± 1,14	D	R	R	D	D-RRD
Афина яр.	2009	42,6 ± 0,42	47,1 ± 0,35	61,2 ± 1,14	71,1 ± 0,71	D	R	R	D	D-RRD
Л.1707я2	2009	53,9 ± 2,35	57,9 ± 4,35	69,0 ± 1,00	76,7 ± 1,76	D	R	R	D/R	D-RRD
Л.241-02я1	2010	37,0 ± 0.00	40,1 ± 0,31	49,0 ± 0,83	60,3 ± 0,70	D	R	R	D/R	D-RRD
Л.262-02я6	2010	37,7 ± 0,29	42,6 ± 0,54	49,9 ± 0,53	62,2 ± 0,83	D	R	R	D	D-RRD
Л.322-02я10	2010	43,8 ± 0,95	47,5 ± 2,29	54,8 ± 2,22	62,4 ± 0,98	D	R	R	D	D-RRD
Л.323-02я3	2010	38,7 ± 0,24	41,2 ± 0,13	58,9 ± 0,72	79,1 ± 3,22	D	R	R	D	D-RRD
Л.330-02я3	2010	39,1 ± 0,51	42,7 ± 0,53	52,5 ± 1,05	65,1 ± 1,34	D	R	R	D	D-RRD
Л 483-02я6	2010	35,9 ± 0,20	49,4 ± 0,22	45,9 ± 0,71	76,6 ± 0,79	D/R	R	R	D	D-RRD
Л.484-02я15	2010	41,0 ± 0,52	43,2 ± 0,20	57,8 ± 1,10	68,2 ± 1,09	D	R	R	D	D-RRD
Л.484-02я9	2010	39,7 ± 0,33	44,3 ± 0,47	55,9 ± 0,85	68,7 ± 1,11	D	R	R	D	D-RRD
Л.512-02я18	2010	39,1 ± 0,18	42,2 ± 0,20	56,5 ± 2,13	67,2 ± 1,33	D/R	R	R	D	D-RRD
Л.538-02яоС5	2010	39,0 ± 0,00	41,5 ± 0,17	52,3 ± 1,51	63,6 ± 1,18	D	R	R	D	D-RRD
Л.538-02яоС51	2010	39,5 ± 0,64	42,3 ± 0,15	54,2 ± 2,01	61,5 ± 0,95	D	R	R	D	D-RRD
Л.94-03я12	2010	40,8 ± 0,13	44,5 ± 0,17	56,6 ± 1,07	65,9 ± 0,77	D	R	R	D	D-RRD
Lupo	2009	39,7 ± 0,15	42,8 ± 0,13	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Безостая 1	2009	43,6 ± 0,73	47,5 ± 0,54	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.1120я16к12	2009	38,3 ± 0,33	40,0 ± 0,15	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Нота	2009	41,3 ± 0,25	46,3 ± 1,34	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.339-02яС23	2010	43,3 ± 0,15	50,8 ± 0,76	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Л.339-02яС24	2010	49,0 ± 0,76	59,7 ± 0,76	–	–	D	R	R	R	D-RRR
Курьер	2009	43,7 ± 0,37	66,2 ± 1,48	43,0 ± 0,24	62,7 ± 0,54	R	D	D	R	R-DDR
Ленинградка	2009	43,6 ± 0,60	76,6 ± 1,51	43,6 ± 0,19	77,8 ± 1,20	R	D	D	R	R-DDR
Л.99-01яв5	2009	43,0 ± 0,00	55,0 ± 1,15	58,6 ± 0,50	108,2 ± 0,70	R	R	D/R	D	R-RDD
Ласточка озим.	2009	39,5 ± 0,27	54,6 ± 0,34	61,1 ± 1,58	94,0 ± 3,29	R	R	D	D	R-RDD
Ласточка яр.	2009	39,9 ± 0,47	55,4 ± 0,34	56,9 ± 1,38	93,3 ± 4,22	R	R	D	D	R-RDD
Эр1685я13	2009	43,1 ± 0,95	58,1 ± 0,48	61,9 ± 1,13	90,9 ± 1,13	R	R	D/R	D	R-RDD
Л.481-02яоС24	2010	36,2 ± 0,20	54,9 ± 0,69	43,9 ± 0,26	76,4 ± 1,72	R	R	D	D	R-RDD

Окончание таблицы 2

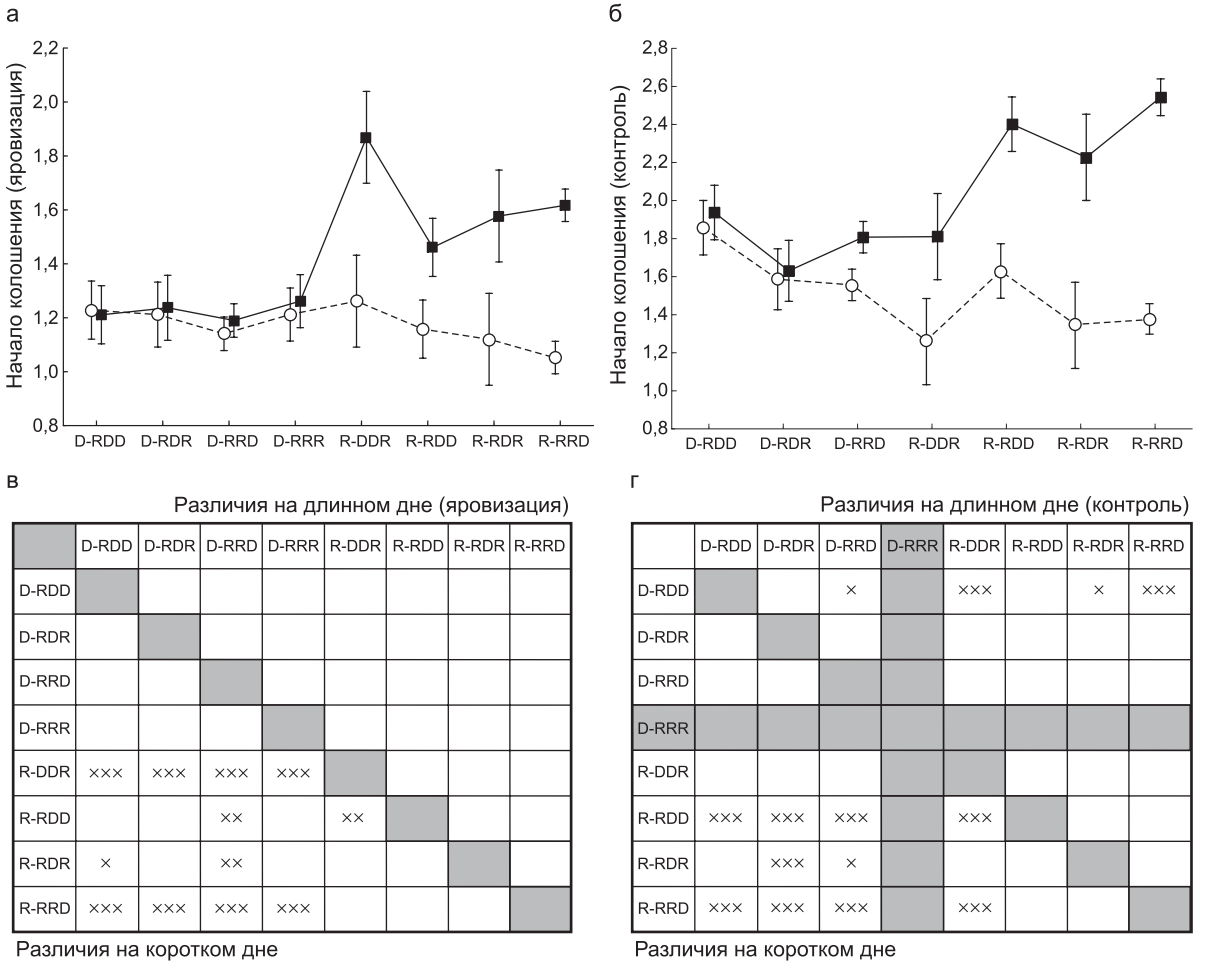
Сорта, линии	Год	Яровизация		Контроль (без яровизации)		*Ppd-D1*	*Vrn-A1*	*Vrn-B1*	*Vrn-D1*	Обозначение в анализе
		T_1	T_2	T_1	T_2					
Л.1762я15	2009	40,9 ± 0,23	60,5 ± 0,87	49,2 ± 0,35	83,9 ± 0,82	R	R	D	R	R-RDR
Л.481-02я13	2010	38,1 ± 0,14	58,9 ± 1,29	45,4 ± 0,27	85,5 ± 1,23	R	R	D	R	R-RDR
Л.115-03я35	2010	38,1 ± 0,31	56,3 ± 0,70	50,2 ± 1,11	95,8 ± 2,95	R	R	R	D	R-RRD
Л.327-02я9	2010	38,1 ± 0,28	56,1 ± 2,42	46,1 ± 0,69	92,1 ± 1,83	R	R	R	D	R-RRD
Л.339-02яС30	2010	38,1 ± 0,10	59,5 ± 1,01	48,1 ± 0,86	95,0 ± 2,45	R	R	R	D	R-RRD
Л.455-02я11	2010	37,1 ± 0,18	56,3 ± 0,99	49,4 ± 0,72	93,9 ± 2,10	R	R	R	D	R-RRD
Л.455-02я5	2010	36,2 ± 0,53	56,2 ± 0,17	46,7 ± 0,79	97,0 ± 1,84	R	R	R	D	R-RRD
Л.479-02яоС3	2010	35,2 ± 0,44	54,9 ± 0,59	46,7 ± 0,83	94,8 ± 1,88	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02я8	2010	36,4 ± 0,22	53,1 ± 0,53	50,1 ± 0,72	93,3 ± 8,67	R	R	R	D	R-RRD
Л.484-02я36	2010	37,6 ± 0,34	65,6 ± 0,73	47,2 ± 0,57	99,8 ± 0,45	R	R	R	D	R-RRD
Л.507-02яоС15	2010	41,7 ± 0,45	59,5 ± 0,81	57,4 ± 0,81	96,8 ± 1,97	R	R	R	D	R-RRD
Л.512-02я39	2010	38,2 ± 0,20	57,7 ± 0,70	49,2 ± 0,55	99,5 ± 1,50	R	R	R	D	R-RRD
Л.70-03яБ8	2010	37,6 ± 0,52	58,7 ± 0,80	46,0 ± 0,60	85,4 ± 6,03	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС22	2010	38,0 ± 0,10	79,3 ± 3,93	48,1 ± 0,75	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС28	2010	36,9 ± 0,20	54,0 ± 0,82	49,4 ± 0,43	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.481-02яоС43	2010	37,9 ± 0,51	63,7 ± 0,92	56,8 ± 1,05	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.99-01яв.5	2010	37,7 ± 0,15	70,6 ± 0,64	49,3 ± 1,00	–	R	R	R	D	R-RRD
Л.489-02я6	2010	41,4 ± 0,31	68,7 ± 0,56	55,3 ± 0,82	–	R	R	R	D	R-RRD

Примечание. Год – год наблюдений срока выколашивания в вегетационном опыте на фотопериодической площадке Пушкинского филиала ВИР. T_1, T_2 –продолжительность периода всходы–колошение в условиях естественного (17 ч 30 мин – 18 ч 50 мин) и короткого (12 ч) фотопериода соответственно. D – доминантный аллель, R – рецессивный аллель, D/R – выявлена гетерозиготность по соответствующему локусу. «–» – растения не выколосились. «“» – яровизация не проводилась.

После того как с помощью дисперсионного анализа была установлена общая достоверность влияния аллельной комбинации генов *Ppd* и *Vrn* на скорость развития растений в условиях длинного и короткого светового дня, был использован тест значимых различий (Post Hoc Test) с целью выяснить, для каких именно комбинаций аллелей генов *Ppd* и *Vrn* различие между средними значениями сроков выколашивания было значимым. На рис. 3, в, г приведены значения критерия Тьюки (Tukey HSD test), достоверные для попарных сравнений средних значений сроков выколашивания разных генотипов при 5-, 1- и 0,1 %-м уровне значимости.

Общая картина скорости развития генотипов с разными аллельными комбинациями *Ppd* и *Vrn* под воздействием яровизации и без нее (рис. 3, а, б) относительно сходна. Все изученные генотипы несут рецессивный аллель хотя бы одного гена *Vrn*, поэтому почти у всех генотипов в отсутствие яровизации сроки начала колошения увеличиваются. Отсутствие колошения без яровизации отмечено для генотипов D-RRR (рецессивные аллели всех генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*), что является ожидаемым фактом. Наиболее чувствительными к яровизации оказались генотипы с комбинацией R-RRD: в отсутствие яровизации на коротком дне колошение начинается на 85–99-й день или не начинается вообще (табл. 2). Абсолютным «чемпионом» по скорости выколашивания остается сорт Фотон, сочетающий доминантные аллели во всех четырех проанализированных генах (D-DDD), на рис. 3 сроки его колошения принимаются за единицу.

Ожидаемыми являются также достоверные различия по скорости выколашивания у носителей рецессивного и доминантного аллелей гена *Ppd-D1* на коротком дне (рис. 3). Однако эти раз-



	D-RDD	D-RDR	D-RRD	D-RRR	R-DDR	R-RDD	R-RDR	R-RRD
D-RDD								
D-RDR								
D-RRD								
D-RRR								
R-DDR	×××	×××	×××	×××				
R-RDD			××		××			
R-RDR	×		××					
R-RRD	×××	×××	×××	×××				

	D-RDD	D-RDR	D-RRD	D-RRR	R-DDR	R-RDD	R-RDR	R-RRD
D-RDD			×		×××		×	×××
D-RDR								
D-RRD								
D-RRR								
R-DDR								
R-RDD	×××	×××	×××		×××			
R-RDR		×××	×					
R-RRD	×××	×××	×××		×××			

Рис. 3. Изменчивость сроков колошения генотипов пшеницы (среднее значение и ошибка средней) в зависимости от комбинации аллелей генов *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1* на коротком (■) и длинном (○) дне, после яровизации (а) и без нее (б). Сроки начала колошения по оси Y определены по отношению к сорту Фотон, использованному в качестве стандарта. в, г – достоверные различия, выявленные при попарных сравнениях средних значений сроков выколашивания разных генотипов при 5 %-м (×), 1 %-м (××) и 0,1 %-м (×××) уровнях значимости.

личия проявляются в зависимости от конкретных условий: например, в условиях яровизации на коротком дне носители R-DDR остаются самой «медлительной» группой по срокам колошения, но при отсутствии яровизации генотипы R-DDR опережают по скорости развития остальные сорта, практически не уступая генотипам с доминантным аллелем *Ppd-D1* (D-RDR, D-RDD, D-RRR). В условиях Краснодарского края при продолжительной теплой осени и зиме такие генотипы могут переходить в репродуктивную фазу развития, вымерзая от возвратных морозов. Поэтому сорта-двуручки должны быть слабочувствительными к яровизации, но достаточно сильно реагировать на короткий день, ограничивая развитие (Беспалова и др., 2010). С этой точки зрения генотипы R-RRD, R-RDR и R-RDD относятся к группе пшениц-двуручек, возделывание которых в условиях Краснодарского края может быть оптимальным.

Располагая сравнительной картиной темпов развития носителей различных аллелей генов *Ppd-Vrn* в разных условиях возделывания (короткий/длинный день, наличие/отсутствие яровизации), селекционеры могут обратить внимание на генотипы с наиболее подходящей для конкретного региона аллельной комбинацией. Разработанные лабораторные протоколы,

позволяющие идентифицировать аллельные комбинации генов *Vrn* и *Ppd* в любом селекционном материале, предоставляют селекционерам возможность сознательно манипулировать исходным материалом, заранее располагая информацией об адаптационном потенциале растений, вовлеченных в селекционный процесс.

Работа выполнена при поддержке грантов межгосударственной целевой программы ЕврАзЭС «Инновационные биотехнологии» (2011-16-МЦП/16) и гранта РФФИ № 09-04-00326-а.

Литература

Беспалова Л.А., Кошкин В.А., Потокина Е.К. и др. Фотопериодическая чувствительность и молекулярное маркирование генов *Ppd* и *Vrn* в связи с селекцией сортов пшеницы альтернативного образа жизни // Докл. РАСХН. 2010. № 6. С. 3–6.

Кошкин В.А., Матвиенко Н.И., Егорова Е.М. и др. Использование аллель-специфичных маркеров гена *Ppd-D1* для анализа изогенных линий яровой мягкой пшеницы // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 2009. Т. 166. С. 151–156.

Кошкин В.А., Мережко А.Ф., Матвиенко И.И. Влияние фотопериода и генов *Ppd* на морфофизиологические признаки гомозиготных линий пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Докл. РАСХН. 1998. № 4. С. 8–10.

Мережко А.Ф., Кошкин В.А., Матвиенко И.И. Исходный материал для создания серии почти изогенных линий мягкой пшеницы с различной фотопериодической чувствительностью // Генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 384–393.

Стельмах А.Ф., Авсенин В.И., Кучеров В.А., Воронин А.И. Изучение роли генетических систем *Vrn* и *Ppd* у мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ. Одесса (СССР). НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). 1987.Вып. 3. С. 125–132.

Beales J., Turner A., Griffiths S. *et al*. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. No 5. P. 721–733.

Cockram J., Norris C., O'Sullivan D.M. PCR-based markers diagnostic for spring and winter seasonal growth habit in barley // Crop. Sci. 2009. V. 49. P. 403–410.

Fu D., Szucs P., Yan L. *et al*. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // Mol. Genet. Genomics. 2005. V. 273. P. 54–65.

Goncharov N.P. Genetics of growth habit (spring vs winter) in common wheat: confirmation of the existence of dominant gene *Vrn4* // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 768–772.

Gott M.B., Gregory F.G., Purvis O.N. Studies in vernalization of cereals VIII. Photoperiodic control of stage inflowering between initiation and ear formation in vernalised and unvernalised petkus winter rye // Ann. Bot. 1955. V. 21. P. 87–126.

Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J. *et al*. Construction of an RFLP map of barley // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 83. P. 250–256.

Milec Z., Tomková L., Sumíková T., Pánková K. A new multiplex PCR test for the determination of *Vrn-B1* alleles in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Mol. Breeding. Publ. online: August 14, 2011.

Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S. *et al*. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the VERNALIZATION1 gene // Proc.Natl Acad. Sci. 2009. V. 106. P. 8386–8391.

Pugsley A.T. A genetic analysis of the spring-winter habit of growth in wheat // Aust. J. Agr. Res. 1971. V. 22. P. 21–23.

Pugsley A.T. Additional genes inhibiting winter habit in wheat // Euphytica. 1972. V. 21. P. 547–552.

Purvis O.N., Gregory F.G. Studies in vernalisation of cereals: I. A comparative study of vernalisation of winter rye by low temperature and by short days // Ann. Bot. 1937. V. 1. No 4. P. 569–591.

Sasani S., Hemming M.N., Oliver S. *et al*. The influence of vernalization and daylength cues on the expression of flowering-time genes in the leaves and shoot apex of barley (*Hordeum vulgare*) // J. Exptl. Bot. 2009. V. 60. P. 2169–2178.

Shcherban A.B., Efremova T.T., Salina E.A. Identification of a new *Vrn-B1* allele using two near-isogenic wheat lines with difference in heading time // Mol. Breeding. Publ. online: April 21, 2011.

Stelmakh A.F. Genetic systems regulating flowering response in wheat // Euphytica. 1998. V. 100. P. 359–369.

Trevaskis B. The central role of the VERNALIZATION1 gene in the vernalization response of cereals // Funct. Plant Biol. 2010. V. 37. P. 479–487.

Turner A., Beales J., Faure S. *et al*. The pseudo response regulator *Ppd-H1* provides adaptation to photoperiod in barley // Sci. 2005. V. 310. P. 1031–1033.

Yan L., Fu D., Li C. *et al*. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of FT // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19581–19586.

Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. *et al.* Positional cloning of the weat vernalization gene *VRN1* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 6263–6268.

Yan L.D., Helguera M., Kato K. *et al*. Allelic variation at the *VRN1* promoter region in polyploid weat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1677–1686.

Yang F.P., Zhang X.K., Xia X.C. *et al*. Distribution of the photoperiod insensitive *Ppd-D1a* allele in Chinese wheat cultivars // Euphytica. 2008. V. 165. P. 445–483.

Yoshida T., Nishida H., Zhu J. *et al. Vrn-D4* is a vernalization gene located on the centromeric region of chromosome 5D in hexaploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 120. P. 543–552.

Zhang X.K., Xiao Y.G., Zhang Y. *et al*. Allelic variation at the vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, and *Vrn-B3* in Chinese wheat cultivars and their association with growth habit // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 458–470.

COMBINATIONS OF ALLELES OF THE Ppd AND Vrn GENES DETERMINE THE HEADING TIME IN COMMON WHEAT VARIETIES

E.K. Potokina[1], V.A. Koshkin[1], E.A. Alekseeva[1], I.I. Matvienko[1], L.A. Bespalova[2], V.A. Filobok[2]

[1] Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Peterburg, Russia,
e-mail: e.potokina@yahoo.com;
[2] Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Summary

Allele combinations of the *Ppd-D1*, *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* genes have been investigated with allele-specific primers in 56 wheat cultivars and breeding lines raised at the Lukyanenko Krasnodar Research Institute of Agriculture. A significant association between the allele combinations and heading dates has been detected, as well as an interaction between the genotype and day length. Allele-specific markers allow breeders to manipulate plant material and to choose allele combinations most suitable for particular growth conditions.

Key words: common wheat, molecular markers, Ppd and Vrn alleles, heading date, marker-assisted breeding.

УДК 633.11:577.21

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ЛОКУСОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ХЛЕБОПЕКАРНОЕ КАЧЕСТВО УКРАИНСКИХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **С.В. Чеботарь[1], Е.М. Благодарова[2], Е.А. Куракина[3], И.В. Семенюк[1], А.М. Полищук[1], Н.А. Козуб[4], И.А. Созинов[4], А.Н. Хохлов[2], А.И. Рыбалка[2], Ю.М. Сиволап[1]**

[1] Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН, Одесса, Украина, e-mail: s.v.chebotar@gmail.com;
[2] Селекционно-генетический институт–Национальный центр семеноводства и сортоизучения НААН, Одесса,Украина;
[3] Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, кафедра генетики и молекулярной биологии, Одесса, Украина;
[4] Институт защиты растений НААН, Киев, Украина

Поступила в редакцию 21 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 декабря 2011 г.

Представлен обзор исследований генетического полиморфизма локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы, с помощью электрофореза запасных белков глиадинов и глютенинов, а также ПЦР-анализа. Представлены результаты анализа полиморфизма в локусах *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* и аллельного состава генов пуроиндолинов *Pina-D1* и *Pinb-D1*, контролирующих показатель «твердозерность», а также генов *Wx*, определяющих содержание амилозы в крахмале эндосперма. Сравнение результатов изучения генетического полиморфизма методом ПЦР с аллель-специфичными праймерами к локусам γ-глиадинов с методом электрофореза запасных белков показало возможность идентификации некоторых аллелей генов запасных белков методом ПЦР, однако в целом уровень полиморфизма в γ-глиадиновых локусах, выявленный при использовании ПЦР, был ниже, чем при анализе с помощью электрофореза запасных белков. В локусах *Pin* у большинства сортов выявлены ПЦР-аллели, характерные для твердозерных пшениц, лишь у трех сортов обнаружены аллели, свойственные мягкозерным пшеницам. Отмечены различия по уровню твердозерности у сортов из различных селекционных центров Украины. ПЦР-анализ не выявил в изученной выборке украинских сортов нуль-аллелей генов *Wx*, однако позволил отобрать исходный материал для дальнейшего создания сортов с низким содержанием амилозы.

Ключевые слова: мягкая пшеница, ПЦР, электрофорез, глиадины, глютенины, твердозерность, гены пуроиндолинов, гены *Wx*.

Известны три основные генетические системы, контролирующие хлебопекарное качество мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) как сложный полигенный признак. Это гены *Glu*, определяющие компонентный состав высокомолекулярных (HMW) и низкомолекулярных (LMW) запасных белков глютенинов; гены *Gli*, кодирующие спирторастворимые белки глиадины и локус *Ha*, детерминирующий консистенцию эндосперма (Созинов, 1985; Попереля, 1996).

Каждый из локусов запасных белков (кроме *Gli-3*) является полигенным, кластерным и кодирует по несколько полипептидов, кроме того, каждый локус является полиморфным и представлен серией из 3–40 аллельных вариантов (Payne *et al*., 1984; Попереля, Собко, 1987).

В настоящее время известны 7 основных глиадинкодирующих локусов (*Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Gli-A2*, *Gli-B2*, *Gli-D2* и *Gli-3* (*Gli-A3*)), а также 4 дополнительных локуса (*Gli-A5*, *Gli-B5*, *Gli-6* (*Gli-A6*), *Gli-7* (*Gli-D7*)), которые тесно сцеплены (0–5 % рекомбинации) с основными (Попереля, Собко, 1987; McIntosh *et al*., 2008). Описаны 4 локуса, кодирующие низкомолекулярные (LMW) субъединицы глютенинов

(*Glu-B2*, *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-D3*) и 3 локуса высокомолекулярных (HMW) глютенинов (*Glu-A1*, *Glu-B1*, *Glu-D1*) (Payne *et al*., 1984).

Гены HMW-субъединиц глютенинов локализованы в длинных плечах хромосом 1A, 1B и 1D. Они кодируют высокомолекулярные полипептиды, которые за счет межмолекулярных дисульфидных связей формируют основной каркас клейковины и характеризуются меньшим, чем глиадины, полиморфизмом (Payne *et al*., 1984). Локусы низкомолекулярных (LMW) глютенинов *Glu-A3*, *Glu-B3* и *Glu-D3* расположены в коротких плечах хромосом первой группы рядом с глиадиновыми локусами *Gli-1*, и рекомбинации между ними не наблюдается (Попереля, 1996; Ma *et al*., 2009).

Изучение полиморфизма глютенинов проводится двумя методами: электрофорезом в SDS-геле по модифицированной методике Леммли (Payne *et al*., 1984) и с помощью кислого электрофореза, который был разработан в Селекционно-генетическом институте (СГИ, Одесса). Последний метод позволяет разделять полипептиды не только по молекулярной массе, но и по заряду молекулы (Попереля, 1996). В настоящее время при анализе глиадинов в полиакриламидном геле (ПАА) активно используются две номенклатуры аллелей: по Метаковскому (Metakovsky, 1991) – с обозначением каждого блока компонентов буквами и по Попереле (1996) – с использованием числовых обозначений (например, *Gli A1b* и *Gld 1A 4* – два обозначения аллеля глиадинкодирующего локуса у сорта Безостая 1). Таблица соответствия обоих систем идентификации аллелей приведена в работе С.Ф. Коваля (2005), однако, по нашему мнению, приводимое автором соответствие все же содержит ряд неточностей. Сложность такого сопоставления состоит в том, что состав геля для электрофореза, а следовательно, и подвижность компонентов запасных белков при использовании каждой методики различаются, при этом компоненты могут меняться местами на геле, объединяться и т. д., поэтому в своей статье мы используем обе номенклатуры.

Исторически сложилось так, что в СГИ применялась собственная номенклатура для запасных белков (Попереля, 1996), так как здесь была разработана первая методика для электрофореза глиадинов в крахмальном, а потом и в полиакриламидном геле, в середине 1970-х гг. был сконструирован прибор для электрофореза. Таким образом, практически весь селекционный материал, создаваемый в СГИ, анализировался именно по этой методике на протяжении более 30 лет. Кроме того, данную номенклатуру активно использовали ученые из стран-членов СЭВ. Это делает, на наш взгляд, возможным и оправданным применение в настоящее время наряду со стандартной методикой (Metakovsky, 1991) системы Ф.А. Поперели. Чтобы было понятно, о какой системе идет речь в каждом конкретном случае, мы и используем обозначение *Gld* для записи генотипа по системе Ф.А. Поперели и *Gli* – по стандартной методике Метаковского (1991).

Анализ распространения аллелей глиадин- и глютенинкодирующих локусов у 85 сортов озимой мягкой пшеницы современной селекции среди различных селекционных центров Украины показал, что каждый центр селекции имеет набор сортов с близким составом запасных белков. На состав запасных белков в сортах пшеницы различных селекционных центров влияют климатические условия, приоритет требований к сорту, источники исходных форм, история селекции в данном центре. Так, частота аллеля *Gld 1A 2*, связанного с повышенной влаголюбивостью, была выше в зоне лесостепи, являясь при этом очень низкой в степной зоне (Благодарова и др., 2004). Аллель *Gld 1A 8* присутствует только у сортов селекции Института растениеводства им. В.Я. Юрьева, а *Gld 1A 10* – только у сортов СГИ. Согласно приведенным исследованиям у украинских сортов встречается 6 аллелей по локусу *Gli-A1*, 5 – по *Gli-B1*; 6 – по *Gli-D1* (при этом фактически локус *Gli-D1* представлен двумя семействами аллелей, различающимися внутри себя только минорными компонентами), 3 – в локусе *Gli-A2*; 4 – в *Gli-B2*; 4 – в *Gli-D2* и 3 в *Gli-A3*. У сортов, выращиваемых в степной зоне, формула алелей, определяемых по компонентам блоков запасных белков, приближается к формуле сорта Альбатрос одесский. В то же время показано, что некоторые сорта Украины имеют «новые» гены запасных белков, введенные в генофонд с 90-х годов 20-го века, связанные с повышенным уровнем хлебопекарного качества: *Gld 1 A10* (*Gli-A1g*), *Gld 1 B15* (*Gli-B1c*) и *Glt 1B5* (*Glu-B1 77+8*).

Полиморфизм глютенинов, выявляемый в украинских сортах пшеницы, не столь значителен. По локусам *Glu* в хромосомах 1А и 1В детектируется по 3 аллеля, а 98 % украинских сортов не различаются по аллельному составу *Glu-D1* локуса и имеют блок *5+10* (по Payne *et al*., 1984). Судя по многочисленным публикациям, этот аллель связан с самым высоким уровнем хлебопекарного качества и по 4-балльной шкале оценивается в 4 балла (Payne *et al*., 1981; Созинов, 1985; Попереля, 1996).

Достоверные различия, подтверждающие вклад «новых» аллелей запасных белков в определение наследственно обусловленного уровня хлебопекарного качества зерна, были получены при анализе 2 тыс. гибридных линий F_4–F_6 от скрещивания сортов Одом и Одесская красноколосая (табл. 1) (Poperelya *et al*., 1998; Попереля, Благодарова, 1998).

Из табл. 1 следует, что наибольший вклад в определение хлебопекарного качества вносят локус *Glt 1D* (*Glu-D1*) и новый для сортов Украины аллель *Glt 1 B5*, (*Glu-B1 77+8*), наличие которого может существенно повысить хлебопекарное качество. Позднее было показано, что этот аллель возник в результате мутации – дупликации генов одного из двух полипептидов, кодируемых этим локусом. По международной номенклатуре, из аллеля *Glu-B1 7+8* возник аллель *Glu-B1 77+8* (Butow *et al*., 2003). В настоящее время этот аллель вводится в генотипы сортов СГИ, и его имеют многие районированные сорта, например, Селянка, Куяльник и др.

В СГИ применяется разработанная Ф.А. Поперелей (1996) классификация сортов пшеницы по качеству зерна в соответствии с их генетическими формулами, согласно которой все сорта делятся на 8 классов, от сверхсильной пшеницы (SA) до пшеницы с очень низким хлебопекарным качеством (F).

В настоящее время в работу по изучению генетического полиморфизма локусов, определяющих генетически обусловленное качество зерна сортов мягкой пшеницы, в Одессе привлекаются новые методы исследования. С одной стороны, это вызвано тем, что были открыты новые гены, определяющие показатели качества зерна, например, гены *Wx*, которые вовлечены в контроль синтеза амилозы, входящей в состав крахмала эндосперма (Graybosch *et al.*, 1998), созданы трансгенные формы пшеницы с увеличенными дозами генов, кодирующих HMW глютенины (Barro *et al*., 2003; Butow *et al*., 2003). С другой стороны, появились новые молекулярные методы изучения генетического полиморфизма не только по продуктам генов (запасным белкам), но и по нуклеотидной последовательности генов, контролирующих качественные показатели зерна пшеницы, с использованием ПЦР для идентификации аллелей (Zhao *et al*., 2006, 2007; Wang *et al*., 2009; Reynolds *et al*., 2010).

Твердозерность мягкой пшеницы также является одной из важнейших характеристик качества зерна и имеет отношение к размолу зерна, замесу теста и изготовлению хлебобулочных изделий. В зависимости от выраженности этого признака зерно пшеницы может быть отнесено к хлебопекарному или кондитерскому типу, а уже в рамках данных типов ценность зерна определяется такими показателями, как содержание белка, качество клейковины, амилолитическая способность и др. Твердозерность

Таблица 1

Вклад аллелей локусов запасных белков в определение хлебопекарного качества зерна, согласно Poperelya с соавт. (1998), Попереля, Благодарова (1998) с дополнениями

Сравниваемые аллели Poperelya *et al*., 1998	Сравниваемые аллели по стандартным методикам	«Сила» муки, е.а.	Объем хлеба, $см^3$
Gld 1A 10 – Gld 1A 4	*Gli -A1g – Gli- A1b*	+6	+23
Gld 1B 15 – Gld 1B 1	*Gli-B1c – Gli- B b*	+19	+23
Glt 1B 5 – Glt 1B 1	*Glu –B1* 77+8 – 7+8	+53***	+71**
Glt 1D 4 – Glt 1D 1	*Glu-D1* 2+12 –5+10	–81***	–92***

** $p < 0{,}01$; *** $p < 0{,}001$.

рассматривается как особенность структуры эндосперма, определяющая способность зерна противостоять разрушению в процессе размола и влияющая, таким образом, на гранулометрический состав зерна (Хохлов, 2002). При размоле эндосперм твердозерных сортов раскалывается на крупные частицы – фрагменты белкового матрикса с плотно встроенными крахмальными гранулами, многие из которых разрушаются по линии раскола. Поэтому мука таких пшениц является рассыпчатой. Слишком высокая твердость иногда считается недостатком, так как приводит к чрезмерным затратам энергии во время помола. В противоположность твердозерным сортам эндосперм мягкозерных сортов во время размола рассыпается на мелкие фрагменты, поэтому мука заметно тоньше, «мягче». Она содержит большее количество свободных частиц белкового матрикса и индивидуальных крахмальных гранул. Поверхность последних гладкая и чистая, степень их разрушения значительно меньше, чем у твердозерных сортов. Разница в структуре муки определяет ее поведение при замесе теста. Имея вдвое меньшую удельную поверхность, мука твердозерных сортов, тем не менее, имеет значительно большую водопоглощающую способность, обусловленную примерно вдвое большей степенью повреждения крахмальных гранул в сравнении с мукой мягких сортов. «Открытость» крахмальных гранул для действия амилаз проявляется также в большей газообразующей силе при брожении. «Липкие» поверхности сколотых крахмальных гранул, очевидно, придают механическую жесткость макроструктуре теста. Все эти особенности желательны для сортов пшеницы, используемых для выпечки из обычного дрожжевого теста при условии достаточного количества сильной клейковины (Финни, Ямазаки, 1970; Беркутова, Швецова, 1984; Wrigley, 1994).

Мука наиболее мягкозерных типов («very soft» и «extra soft») хотя и создает некоторые проблемы при размоле, может быть востребованной при изготовлении кондитерских изделий и в других специальных применениях (Хохлов, 2002).

Твердозерность контролируется несколькими тесно сцепленными генами, которые локализованы в коротком плече 5D-хромосомы в локусе *Ha* (*Hardness*). В этом локусе находятся гены, кодирующие три полипептида, составляющие белок фриабилин: пуроиндолины *a* (*Pina-D1*) и *b* (*Pinb-D1*), а также Grain Softness Protein (*GSP1*) (Jolly *et al*., 1996; Sourdille *et al*., 1996; Giroux, Morris, 1998). Белок фриабилин имеет размер около 15 кДа и локализуется на поверхности крахмальных гранул у пшеницы с мягкой текстурой эндосперма (Capparelli *et al*., 2003). Взаимодействие фриабилина с крахмальными гранулами происходит за счет как гидрофобных, так и ионных связей. Пуроиндолины и GSP1 найдены как у твердо- так и у мягкозерных сортов пшеницы, но степень их адгезии на поверхности крахмальных гранул варьирует в зависимости от генотипа пшеницы (Turner *et al*., 1999). При этом уровень адгезии фриабилина на поверхности крахмальных зерен коррелирует с твердозерностью пшеницы (Ikeda *et al*., 2005). У сортов твердой пшеницы (*T. durum*) этот белок отсутствует (Greenwell, Schofield, 1986). Пуроиндолины *a* и *b* взаимодействуют как гетеродимеры и связывают гранулы крахмала с мембранными липидами амилопластов. Эти полипептиды являются представителями специфической группы низкомолекулярных белков злаков, характеризующихся высоким содержанием аминокислотных остатков цистеина и триптофана (Morris, 2002).

По данным M. Giroux и C. Morris (1997), в геноме гексаплоидной пшеницы существует 3 локуса с генами *GSP*. Эти гены расположены в дистальных концах гомеологичных хромосом 5-й группы, при этом локус *GSP1* в хромосоме 5D тесно сцеплен с пуроиндолинкодирующими генами.

Однако исследования мутаций и делеций в локусе *Ha*, а также работы по созданию трансгенных форм пшеницы показывают, что за разницу в текстуре зерна отвечают в основном гены, кодирующие пуроиндолины. Градация признака «твердозерность» в значительной мере обусловлена комбинациями аллелей генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* (Giroux, Morris, 1997; Morris *et al*., 2001; Ikeda *et al*., 2005; Ram *et al*., 2005; Xia *et al*., 2005; Chen *et al*., 2006; Чеботар и др., 2012). Дикий тип пшеницы *T. aestivum* имеет мягкую текстуру эндосперма, которая контролируется аллелями *Pina-D1a* и *Pinb-D1a*. У твердозерных сортов *T. aestivum* гены *Pina-D1* и *Pinb-D1*

несут (оба или один из них) мутации. Первая обнаруженная мутация, влияющая на твердозерность, приводит к замене глицина на серин в позиции 46 у пуроиндолина, кодируемого геном *Pinb-D1b* (Giroux, Morris, 1997). Также был описан еще ряд аллельных состояний *Pina-D1* и *Pinb-D1* генов: мутации гена *Pina-D1* (Giroux, Morris, 1997; Chen *et al*., 2006), различные точечные мутации в гене *Pinb-D1*, вызывающие аминокислотные замены, три мутации с образованием стоп кодонов в гене *Pinb-D1*: аллели *e*, *f*, *g* (Morris *et al*., 2001), делеция обоих генов *Pina-D1* и *Pinb-D1* (Ikeda *et al*., 2005) и мутации, которые приводят к сдвигу рамки считывания в *Pinb-D1* – аллели *i*, *p*, *r*, *s* (Ikeda *et al*., 2005; Ram *et al*., 2005; Xia *et al*., 2005).

Физический показатель твердости зерна сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, исследованный на выборке 85 сортов и линий озимой мягкой пшеницы преимущественно украинского происхождения с помощью NIR (near infrared reflectance) анализа, сопоставляли с данными ПЦР-анализа аллельного состава пуроиндолиновых генов (Чеботар и др., 2012). Из общего количества исследованных 85 сортов и линий пшеницы 3 имели аллельный состав генов пуроиндолинов, характерный для мягкозерных сортов *Pina-D1a* и *Pinb-D1a.* Их физический показатель твердости зерна находился в пределах 20–39 ед., т. е. был типичным для группы мягкозерных пшениц. У 56 сортов генотип был определен как *Pina-D1a*, *Pinb-D1b*, т. е. характерный для твердозерных сортов. Диапазон твердости зерна в этой группе составил 51–85 ед., характерный для подгрупп «средней твердозерности», «твердозерные», «очень твердозерные». Сорт Цыганка, по данным Zlatska (2010), имеет генотип *Pina-D1a*, *Pinb-D1c*, фактическая твердость его зерна была 89 ед. (твердозерный, группа «очень твердые»).

Широкий диапазон показателя твердозерности вызвал предположение о присутствии других генетических факторов, сказывающихся на твердозерности, отличных от системы пуроиндолиновых генов. Для проверки предположения нами был проведен анализ характера результатов. Он оказался близким к бимодальному «мягкозерные»/«твердозерные». При этом распределение в группе твердозерных пшениц было близким к нормальному ($\chi^2 = 5{,}59$, df = 7, $p = 0{,}588$). Плавный одновершинный характер кривой распределения не дал оснований далее предполагать наличие главных генов (так называемых major genes), отличных от генов пуроиндолинов. Из-за малой выборки группы мягкозерных пшениц проверить соответствие данных нормальному распределению не представилось возможным. Полученные данные (Чеботар и др., 2012) говорят в пользу наличия системы так называемых минорных генов (minor genes), которые совместным действием «растягивают» диапазон изменчивости в пределах групп «мягкозерные» и «твердозерные». Обращает на себя внимание значительная разница в твердости зерна сортов пшеницы различных селекцентров. Так, твердозерность сортов селекции Одесского СГИ была заметно ниже, чем у сортов Мироновского и Донского селекцентров. Не исключено, что эта разница обусловлена различным характером налива и созревания зерна у сортов различных экологических групп в условиях южной степи.

В связи с растущим интересом к созданию сортов мягкой пшеницы специальных групп качества, в том числе с пониженным содержанием амилозы в крахмале зерна, был изучен аллельный состав локусов *Wx* у 46 сортов озимой мягкой пшеницы, занесенных в «Государственный реестр сортов растений, рекомендованных для распространения в Украине», и отработаны методы ПЦР-анализа генетического полиморфизма по генам *Wx* с целью дальнейшего привлечения молекулярных маркеров в селекционный процесс в СГИ (Семенюк и др., 2011).

Как известно, основным компонентом эндосперма зерна пшеницы является крахмал, который состоит на 20–30 % из амилозы и 70–80 % из амилопектина. Оба полисахарида являются полимерами глюкозы, при этом амилоза имеет линейную структуру, а амилопектин – разветвляющуюся (Graybosch *et al*., 1998). Процентное содержание амилозы используется как один из параметров характеристики крахмала муки. У обычных сортов мягкой пшеницы диапазон варьирования амилозы в содержании крахмала ограниченный (20–30 %), в то время как у риса этот показатель варьирует от 0 до 30 % (Nakagahra *et al*., 1986). В Японии были созданы так называемые «восковые» (Waxy) сорта пшеницы (без амилозы), мука которых

используется для производства традиционной высококачественной японской соленой лапши (Nakamura *et al*., 1995). В селекции пшеницы в Украине также проявляется интерес к созданию «восковых» сортов мягкой пшеницы на основе местных адаптированных сортов.

Ключевым ферментом синтеза амилозы в крахмальных гранулах является гранулосвязывающая крахмалсинтаза (GBSS1) или белок Waxy (молекулярный вес 60 кДа), который кодируется генами *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1*, локализованными в хромосомах 7AS, 4AL и 7DS (Nakamura *et al*., 1993).

Для локусов *Wx* установлено наличие функциональных и нефункциональных аллелей. Так, для локуса *Wx-A1* функциональными являются аллели *Wx-A1a*, *Wx-A1c*, нефункциональным – нуль-аллель *Wx-A1b*. Для локуса *Wx-B1* также выявлен нуль-аллель *Wx-B1b* и варианты функциональных аллелей *Wx-B1a*, *Wx-B1c*, *Wx-B1d* и *Wx-B1f*. Для локуса *Wx-D1* показаны два варианта нуль-аллелей *Wx-D1b*, *Wx-D1e* и серия функциональных алелей: *Wx-D1a*, *Wx-D1c*, *Wx-D1d* и *Wx-D1f* (McIntosh *et al*., 2003). Различное сочетание нуль-аллелей и функциональных аллелей в *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* локусах приводит к различиям по содержанию амилозы в крахмале зерна пшеницы. А объединение в одном генотипе трех нуль-аллелей по *Wx*-локусам ведет к формированию «восковых» пшениц с нулевым содержанием амилозы в крахмале (Nakamura *et al*., 1995).

Нами проанализировано 46 сортов пшеницы и 2 линии, Wx-15 и Wx-12, с помощью аллель-специфичных праймеров к генам *Wx-A1a*, *Wx-B1* и *Wx-D1* (Петрова и др., 2006). В локусе *Wx-A1* у всех сортов выявлен алель *Wx-A1a*, нуль-аллели *Wx-B1b* и *Wx-D1b* не обнаружены. У линий Wx-15 и Wx-12 выявлены аллели *Wx-B1b* и *Wx-D1b*, специфический продукт амплификации для *Wx-A1a* у данных линий не выявлялся (Петрова и др., 2006). Полученные данные согласуются с тем, что украинские сорта мягкой пшеницы имеют нормальное содержание амилозы (20–30 %). В то же время проведенные исследования являются необходимым этапом для введения маркерной селекции по генам *Wx* в селекционные программы СГИ. Так, в СГИ уже были созданы популяции F_4–F_5-рекомбинантных инбредных линий от скрещивания сорта Куяльник (*Wx-A1aWx-A1a Wx-B1aWx-B1a Wx-D1aWx-D1a*) с линией Wx-15 (*Wx-A1bWx-A1b Wx-B1bWx-B1b Wx-D1bWx-D1b*). Аллель-специфичные праймеры были применены нами для гибридологического анализа популяции F_5, из которой отобрано 10 селекционных форм-носителей аллелей *Wx-A1bWx-A1b Wx-B1bWx-B1b Wx-D1bWx-D1b* (Петрова и др., 2008). Отобранные формы предлагаются для дальнейшего использования при создании отечественных сортов с низким содержанием амилозы.

Система молекулярных маркеров, разработанная Zhang с соавт. (2003, 2004) на основе анализа полиморфизма единичных нуклеотидов (SNPs) в γ-глиадиновых генах локусов *Gli-A1*, *Gli-B1* и *Gli-D1*, была применена для идентификации аллелей генов запасных белков с целью сравнения эффективности ПЦР-маркерной системы для дифференциации генотипов по отношению к используемому методу электрофореза запасных белков, а также с целью подбора более простой маркерной системы с высокой разрешающей способностью, применение которой может быть автоматизировано. Такая постановка задачи вызвана тем, что белковые спектры достаточно сложны и содержат одновременно продукты экспрессии многих локусов, что делает их прочтение сложным, а перевод их идентификации в автоматический режим невозможным.

Проводилось сравнение результатов идентификации аллелей генных кластеров *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1* и *Glu-A3* методами электрофореза запасных белков и электрофореза продуктов ПЦР, полученных с использованием аллель-специфичных праймеров, предложенных Zhang с соавт. (2003, 2004), у 14 сортов одесской селекции и 6 почти изогенных линий (Поліщук и др., 2010). При этом для каждого сорта/линии изучались по 3 зерновки, половинка с зародышем проращивалась для выделения ДНК, а из второй половинки выполнялся электрофорез запасных белков по методике Ф.А. Поперели (1989) с идентификацией по Метаковскому (Metakovsky, 1991). В работе были использованы сорта одесской селекции: Лузановка, Зустрич, Струмок, Одесская 267, Знахидка, Любава, Фантазия, Прима, Лада, Застава, Виктория, Альбатрос и созданные М.М. Копусем на основе сорта Безостая 1 почти изогенные

линии (GLI-D1-5,GLI-B1-3,GLI-B1-4,GLI-A1-1, GLI-D1-4, GLI-B1-12), различающиеся только аллелями глиадинов.

По результатам выполненного ПЦР-анализа все изученные сорта разделились на 4 группы (табл. 2), однако по данным электрофореза запасных белков полиморфизм изученных сортов оказался выше.

Так, по локусу *Gli-A1* выявлено 4 аллеля глиадина, которым соответствовали 2 варианта аллелей, согласно результатам ПЦР-анализа. Однако при анализе каталога аллелей глиадинов (Metakovsky, 1991) видно, что по каждому локусу существуют группы блоков, различающихся между собой только 1–2 компонентами. По нашему мнению, чем меньше различаются аллели белков по количеству и подвижности компонентов, тем они ближе друг к другу генетически – по нуклеотидной последовательности.

Аллели *Gli-A1b* и *Gli-A1c* представлены блоками компонентов белков, близких по подвижности при электрофорезе в ПААГ, а аллели *Gli-A1f* и *Gli-A1o* являются очень отличающимися блоками компонентов белков друг от друга и от *Gli-A1b* и *Gli-A1c*. Таким образом, у исследованной группы сортов с помощью ПЦР-анализа можно идентифицировать только аллель глиадинов *Gli-A1o* (ПЦР-аллель *Gli A1.2*), а генотипы с блоками глиадинов *Gli-A1f*, *Gli-A1b* и *Gli-A1c* характеризуются единым аллелем *Gli A1.1* по ПЦР.

По результатам ПЦР-анализа для локуса *Glu-A3* варианты *a*, *c* встречались с ПЦР-аллелем *Gli-A1.1* (табл. 3).

Аллель *Glu-A3d* четко соответствует аллелю глиадина *Gli-A1o* и ПЦР-аллелю *Gli-A1.2*. Это дает возможность идентифицировать аллель *Gli-A1o*. Аллель *Glu-A3f* представлен только у сорта Зустрич одесская (аллель глиадинов *Gli-A1f*), который не отличается от всех других сортов, кроме сортов Струмок и Лада по ПЦР-анализу локуса *Gli-A1* (Поліщук и др., 2010).

При анализе электрофореграмм глиадинов по локусу *Gli-B1* у исследованных сортов выявлено 3 аллельных варианта – *Gli-B1b*, *Gli-B1d*, *Gli-B1e*. Согласно результатам ПЦР-анализа первым двум вариантам соответствует аллель *Gli-B1.1*, а третьему – *Gli-B1.2* (Поліщук и др., 2010). Так как аллель *Gli-B1e* существенно влияет на качество муки, возможность его идентификации с помощью ПЦР-анализа должна быть подтверждена на бульшем наборе сортов.

Таблица 2

Аллельный состав локусов *Gli-A1*, *Gli-B1* и *Gli-D1* в генотипах сортов пшеницы по данным ПЦР-анализа и электрофореза запасных белков (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Группа	Сорт	Аллели по данным ПЦР-анализа			Аллели по данним электрофореза запасных белков		
		Gli-A1	*Gli-B1*	*Gli-D1*	*Gli-A1*	*Gli-B1*	*Gli-D1*
1	Лузановка од.*	1	1	2	*b*	*d*	*g*
	Зустрич од.	1	1	2	*f*	*b*	*x* (10)
	Знахидка од.	1	1	2	*b*	*b*	*j*
	Любава од.	1	1	2	*b*	*b*, *d*	*b*, *j*
	Фантазия од.	1	1	2	*b*	*b*	*j*
	Альбатрос од.	1	1	2	*b*	*b*	*j*
2	Одесская 267	1	1	1	*b*	*b*	*g*
	Виктория	1	1	1	*b*	*b*	*j*
3	Прима од.	1	2	1	*c*	*e*	*f*
	Застава од.	1	2	1	*b*	*e*	*j*
4	Струмок	2	1	2	*o*	*d*	*b*
	Лада од.	2	1	2	*o*	*b*	*j*

* Од. – одесская.

Таблица 3

Аллели локуса *Glu-A3* в генотипах мягкой пшеницы
по данным ПЦР-анализа (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт	Аллели локуса *Glu-A3*	Наличие продуктов амплификации с аллель-специфическими праймерами к локусу *Glu-A3*						
		a	abc	ac	d	e	f	g
Лузановка од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Зустрич од.	*f*	–	–	–	–	–	+	–
Струмок	*d*	–	–	–	+	–	–	–
Одесская 267	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Знахидка од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Любава од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Фантазия од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Прима од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Лада од.	*d*	–	–	–	+	–	–	–
Застава од.	*a*	+	+	+	–	–	–	–
Виктория	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Альбатрос од.	*c*	–	+	+	–	–	–	–

* Од. – одесская.

По локусу *Gli-D1* не удалось обнаружить соответствия между аллелями глиадинов на электрофорезе белков и продуктов ПЦР (Поліщук и др., 2010). Возможно, праймеры, разработанные Zhang с соавт. (2003, 2004), тестировали полиморфизм в нуклеотидной последовательности, оказавшейся неполиморфной на исследуемой выборке сортов, т. е. все изученные здесь аллели глиадинов по локусу *Gli-D1* имели общий γ-глиадиновый компонент, в то время как электрофорез белков отражает весь спектр полиморфизма, определяемый последовательностью локуса *Gli-D1*.

Методами электрофореза белков и ПЦР был изучен также аллельный состав запасных белков у почти изогенных линий, созданных на основе сорта Безостая 1, а также у линии Б16 и сорта Одесская красноколосая (Поліщук и др., 2010) (табл. 4, 5).

ПЦР-методом с праймерами к *Gli-B1.1* обнаружен новый, еще не описанный в литературе аллель у линии GLI-B1-12 (аллель глиадинов *Gli-B1o*). Он соответствовал продукту амплификации размером 399 п.н., полученному с парой праймеров Gli-gAF1/Gli-gAR1 (Поліщук и др., 2010), тогда как в исследованиях Zhang с соавт. (2003) данная пара праймеров выявляла продукты амплификации размером 369 п.н. (аллель *Gli-B1.1*) или не давала продуктов амплификации (аллель *Gli-B1.2*).

При ПЦР-анализе линий с пшенично-ржаной транслокацией 1BL.1RS продуктов амплификации не выявлено, что согласуется с данными электрофореза запасных белков (Поліщук и др., 2010).

В результате молекулярно-генетического анализа локуса *Glu-A3* почти у всех линий, кроме GLI-A1-1, показано наличие аллеля *Glu-A3c*. Полученные результаты согласуются с данными о наличии ПЦР-аллеля *Gli A1.2* у этой линии. По Zhang с соавт. (2003), присутствие этого аллеля совпадает с присутствием аллелей *Glu-A3d* и *Glu-A3e* для локуса *Glu-A3*. Следует обратить внимание на наличие у этой линии блока компонентов глиадинов *Gli-A1m* по электрофорезу запасных белков (Поліщук и др., 2010).

Таким образом, нами показана возможность идентифицировать некоторые аллели глиадинов и низкомолекулярных глютенинов украинских сортов пшеницы с помощью ПЦР-анализа, проанализировано соответствие генетического полиморфизма глиадинкодирующих локусов, выявляемого с помощью молекулярных маркеров (Zhang *et al*., 2003) по полиморфизму,

Таблица 4

Аллельное состояние Gli-локусов по данным ПЦР и электрофореза глиадинов в почти изогенных линиях мягкой пшеницы (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт/Линия	*Gli-A1*		*Gli-B1*		*Gli-D1*	
	ПЦР	Электрофорез белков	ПЦР	Электрофорез белков	ПЦР	Электрофорез белков
Б-16	*GliA1.1*	*x*	–	*l*	*GliD1.2*	*j*
Одесская красноколосая	*GliA1.1*	*g*	*GliB1.2*	*c*	*GliD1.2*	*f*
Безостая 1	*GliA1.1*	*b*	*GliB1.1*	*b*	*GliD1.2*	*b*
GLI-D1-5	*GliA1.1*	*b*	*GliB1.1*	*b*	*GliD1.1*	*g*
GLI-B1-3	*GliA1.1*	*b*	–	*l*	*GliD1.2*	*b*
GLI-B1-4	*GliA1.1*	*b*	*GliB1.2*	*g*	*GliD1.2*	*b*
GLI-A1-1	*GliA1.2*	*m*	*GliB1.1*	*b*	*GliD1.2*	*b*
GLI-D1-4	*GliA1.1*	*b*	*GliB1.1*	*b*	*GliD1.2*	*j*
GLI-B1-12	*GliA1.1*	*b*	Новый алель	*o*	*GliD1.2*	*b*

Таблица 5

Аллельный состав локуса Glu-A3 в генотипах почти изогенных линий мягкой пшеницы по ПЦР-анализу (цит. по: Поліщук и др., 2010)

Сорт/Линия	Аллели *Glu-A3* локуса	Наличие аллель-специфичных продуктов амплификации по локусу *Glu-A3*						
		a	abc	ac	d	e	f	g
Б-16	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Одесская красноколосая	*c*	–	+	+	–	–	–	–
Безостая 1	*c*	–	+	+	–	–	–	–
GLI-D1-5	*c*	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-3	*c*	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-4	*c*	–	+	+	–	–	–	–
GLI-A1-1	*e*	–	–	–	–	+	–	–
GLI-D1-4	*c*	–	+	+	–	–	–	–
GLI-B1-12	*c*	–	+	+	–	–	–	–

наблюдаемому при электрофорезе запасных белков. Показана возможность дифференцировать генотипы мягкой пшеницы с аллелями глиадинов *Gli-A1m* и *Gli-A1o*, которые имеют ПЦР-аллель *Gli-A1.2*, от генотипов с аллелями глиадинов *Gli-A1f,* глиадинов *Gli-A1b*, *Gli-A1c*, *Gli-A1x*, *Gli-A1g*, а также генотипы с вариантами глиадинов *Gli-B1e*, *Gli-B1g* и *Gli-B1c* и с ПЦР-аллелем *Gli-B1.2* от генотипов с аллелями *Gli-B1b* и *Gli-B1d* и с ПЦР-аллелем *Gli-B1.1*. Также выделен новый аллель с ПЦР-праймерами к локусу *Gli-B1* (Поліщук и др., 2010).

Заключение

В целом в данной работе охвачены такие основные системы определения генетически обусловленного уровня хлебопекарного качества, как гены запасных белков глиадинов и глютенинов, гены твердозерности, а также гены *Wx*, связанные с пониженным содержанием амилозы в зерне, изучен полиморфизм по этим системам у украинских сортов.

Поскольку, по данным литературы, твердозерность определяется главным образом

свойствами пуроиндолинов, аллельный состав их генов был изучен с помощью ПЦР-анализа и сопоставлен с уровнем этого признака для целой группы украинских сортов. Показано, что распределение сортов между группами «твердозерные» и «мягкозерные» действительно определялось полиморфизмом в локусах, кодирующих пуроиндолины, а внутри этих групп – другой генетической системой, так называемыми минорными генами. Таким образом, отмечено наличие других генетических факторов, определяющих твердозерность украинских сортов, а также выявлены различия по уровню твердозерности между селекционными центрами Украины.

В связи с потребностью пищевой промышленности в сортах специального назначения, в частности, с пониженным содержанием амилозы, для 46 сортов, внесенных в Реестр сортов Украины, и двух линий с нулевым содержанием амилозы в крахмале эндосперма методом ПЦР был изучен полиморфизм по генам *Wx*. Нуль-аллели по локусам *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* не были обнаружены в выборке сортов, что согласуется с наличием нормального уровня амилозы в украинских сортах. Поэтому для внедрения генов, контролирующих низкое содержание амилозы, в генотипы украинских сортов был специально создан материал – гибридная комбинация F_5 от скрещивания сорта Куяльник с источником данных генов – линией Wx-15, из которого с помощью ПЦР-маркеров к локусам *Wx-A1*, *Wx-B1* и *Wx-D1* были отобраны 10 гомозиготных линий, несущих нуль-аллели по всем трем локусам *Wx*.

Сравнение подходов к изучению полиморфизма запасных белков по локусам *Gli-1* и тесно сцепленного *Glu-A3*, основанных на электрофорезе запасных белков и на ПЦР, показало, что уровень полиморфизма глиадинов и LMW-глютенинов у сортов и линий одесской селекции был выше при анализе электрофореграмм белков. Это может объясняться тем, что электрофореграммы запасных белков отражают весь спектр глиадинов, тогда как аллель-специфичные праймеры (Zhang *et al*., 2003, 2004) позволяют получить информацию только по γ-глиадинам. Тем не менее показана возможность идентификации некоторых аллельных вариантов запасных белков с помощью ПЦР.

Проведенные исследования и выявленные аллельные характеристики генотипов сортов могут быть использованы в селекции мягкой пшеницы для создания сортов с определенным уровнем хлебопекарного качества, а также сортов специального назначения – для кондитерских целей, с низким содержанием амилозы в крахмале – для приготовления изделий из замороженного теста и др.

Литература

Беркутова Н.С., Швецова И.А. Технологические свойства пшеницы и качество продуктов ее переработки. М.: Колос, 1984. 223 с.

Благодарова О.М., Литвиненко М.А., Голуб Є.А. Геногеографія алелів гліадин- і глютенінкодуючих локусів українських сортів озимої м'якої пшениці // Зб. наук. праць СГІ-НАЦ НАІС. Одеса, 2004. Вип. 6 (46). Ч. 2. С. 179–193.

Коваль С.Ф., Коваль В.С., Чернаков В.М. и др. Что такое модель сорта. Омск: ФГОУ ВПО ОМГАУ, 2005. 280 с.

Петрова И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Контроль *Wx*-генов в процессе селекции при создании форм мягкой пшеницы с низким содержанием амилозы // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: Зб. наук. пр. К.: ЛОГОС, 2007. Т. 2. С. 162–164.

Петрова І.В., Чеботар С.В., Рибалка О.І., Сиволап Ю.М. ПЛР-аналіз алельного стану *Wx*-генів у сортів пшениці // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. / Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. Вавилова / За ред. М.В. Роїка. К.: ЛОГОС, 2006. Т. 3. С. 127–132.

Петрова І.В., Чеботар С.В., Рибалка О.І., Сиволап Ю.М. SSR-аналіз селекційних форм м'якої пшениці з нульовим вмістом амілози у крохмалі // «Геном рослин»: Зб. наук. ст. Одеса, 2008. С. 110–115.

Поліщук А.М., Чеботар С.В., Благодарова О.М. и др. Аналіз сортів та майже-ізогенних ліній м'якої пшениці за допомогою ПЛР-аналізу з алель-специфічними праймерами до *Gli*- та *Glu*-локусів // Цитологія і генетика. 2010. № 6. С. 22–31.

Попереля Ф.О. Три основні генетичні системи якості зерна озимої м'якої пшениці // Реалізація потенційних можливостей сортів та гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України. Зб. наук. праць СГІ. Одеса, 1996. С. 117–132.

Попереля Ф.А., Благодарова О.М Генетика якості зерна перших генотипів надсильної пшениці України // Цитологія і генетика. 1998. Т. 32. № 6. С. 11–19.

Попереля Ф.А., Собко Т.Я. Генетика глиадина озимой мягкой пшеницы // Вопросы генетики и селекции зерновых культур. КОЦ СЭВ, Одесса (СССР), НИИР Прага-Рузыне (ЧССР). 1987. Вып. 3. С. 231–242.

Попереля Ф.А. Полиморфизм глиадина и его связь с качеством зерна, продуктивностью и адаптивними свойствами сортов мягкой озимой пшеницы // Селекция, семеноводство и интенсивная технология

возделывания озимой пшеницы. Агропромиздат, 1989. С. 138–150.

Семенюк И.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Молекулярно-генетический анализ селекционных линий мягкой пшеницы с крахмалом амилопектинового типа // Цитология и генетика. 2011. Т. 45. № 5. С. 17–22.

Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985.

Финни К.Ф., Ямазаки У.Т. Качество твердозерной, мягкой и дурум пшениц // Пшеница и ее улучшение. М.: Колос, 1970. С. 469–497.

Хохлов О.М. Генетично обумовлена твердість зерна м'якої пшениці (*T. aestivum*): стан та перспективи досліджень в Україні // Зб. наук. праць СГІ. Одеса, 2002. Вип. 2 (42). С. 9–29.

Чеботар С.В., Куракіна К.О., Хохлов О.М. и др. Фенотипічні прояви алелів пуроіндолінових генів м'якої пшениці // Цитологія та генетика. 2012. В печати.

Barro F., Barcelo P., Lazzeri P. *et al*. Functional properties of flours from field grown transgenic wheat lines expressing the HMW glutenin subunits 1Ax1 and 1Dx5 genes // Mol. Breeding. 2003. V. 14. P. 223–229.

Butow B., Ma W., Gale K. *et al*. Molecular discrimination of *Bx7* alleles demonstrates that a highly expressed high-molecular-weight glutenin allele has a major impact on wheat flour dough strength // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 1524–1532.

Capparelli R., Boriello G., Giroux M.J., Amoroso M.G. Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindolines to starch // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 1463–1468.

Chen F., He Z.H., Xia X.C. *et al*. A new puroindoline и mutation present in Chinese winter wheat cultivar Jingdong 11 // J. Cereal Sci. 2005. No 42. P. 267–269.

Chen F., He Z.H., Xia X.C. *et al*. Molecular and biochemical characterization of puroindoline a and b alleles in Chinese landraces and historical cultivars // Theor. Appl. Genet. 2006. No 112. P. 400–409.

Giroux M.J., Morris C.F. A glycine to serine change in puroindoline b is associated with great hardness and low levels of starch-surface friabilin // Theor. Appl. Genet. 1997. No 95. P. 857–864.

Giroux M.J., Morris C.F. Wheat grain hardness results from highly conserved mutations in the friabilin components puroindoline a and b // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. No 95. P. 6262–6266.

Graybosch R., Peterson C., Hansen L. *et al*. Identification and characterization of U.S. wheats carrying null alleles at the *waxy* loci // Cereal Chem. J. 1998. V. 75. P. 162–165.

Greenwell P., Schofield J.D. A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat // Cereal Chem. 1986. No 63. P. 379–380.

Ikeda T.M., Ohnishi N., Nagamine T. *et al.* Identification of new puroindoline genotypes and their relationship to flour texture among wheat cultivars // J. Cereal Sci. 2005. No 41. P. 1–6.

Ma W., Anderson O., Kuchel H. *et al*. Genomics of Quality Traits // Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Genetics and Genomics of the Triticeae / Eds C. Feuillet, G.J. Muehlbauer. Springer Science + Business Media, LLC, 2009. P. 611–652.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M. *et al.* MacGene 2003. Catalogue of Gene Symbols for Wheat / 10IWGS, Paestum, Italy, 2003.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M., Dubkowsky J., Rogers J., Appels R. MacGene 2008. Catalogue of Gene Symbols for Wheat / http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes.

Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat // J. Genet. Breed. 1991. V. 45. P. 325–344.

Morris C.F. Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness // Plant Mol. Biol. 2002. No 48. P. 633–647.

Morris C.F., Lillemo M., Simeone M.C. *et al*. Prevalence of puroindoline grain hardness genotypes among historically significant North American spring and winter wheats // Crop. Sci. 2001. V. 41. No 1. P. 218–228.

Nakagahra M., Nagamine T., Okuno K. Spontaneous occurrence of low amylose genes and geographycal distribution of amylose content in Asian rice // Rice Genet. Newslett. 1986. V. 3. P. 46–48.

Nakamura T., Hoshino H., Hidaka S. Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Biochem. Genet. 1993. V. 31. P. 75–86.

Nakamura T., Yamamori M., Hirano H. *et al*. Production of waxy (amylose-free) wheats // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 248. No 3. P. 253–259.

Payne P., Corfield K., Holt L., Blackman J. Correlations between the inheritance of certain high-molecular-weight glutenin subunits and bread-making quality in progenies of six crosses of bread wheat // J. Sci. Fd. Agric. 1981. V. 32. P. 51–60.

Payne P.I., Holt L.M., Jacson E.A., Law C.N. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1984. V. 304. P. 359–371.

Poperelya F.A., Blagodarova E.M., Stelmakh A.F. Genetic systems regulating grain quality in winter dread wheat // Proc. of the 9th Intern. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, 1998. V. 4. P. 251–253.

Ram S., Jain N., Shoran J., Singh R. New frame shift mutation in puroindoline b in Indian wheat cultivars Hyb65 and NI5439 // J. Plant Biochem. Biotech. 2005. No 14. P. 45–48.

Reynolds N.P., Martin J.M., Giroux M.J. Novel *Ha* locus, *Pin-D1c/Pinb-D1h*, affects soft white spring wheat milling and baking // Cereal Chem. J. 2010. V. 87. No 3. P. 237–242.

Sourdille P., Perretant M.R., Charmet G. *et al*. Linkage between RFLP markers and genes affecting kernel hardness in wheat // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 93. P. 580–586.

Turner M., Mukai Y., Leroy P. *et al*. The *Ha* locus of wheat: identification of a polymorphic region for tracing grain hardness in crosses // Genome. 1999. No 42. P. 1242–1250.

Wang L.H., Zhao X.L., He Z.H. *et al*. Characterization of low-molecular-weight glutenin subunit *Glu-B3* genes and development of STS markers in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. No 3. P. 525–539.

Wrigley C.W. Developing better strategies to improve grain quality for wheat // Aust. J. Agric. Res. 1994. V. 45. P. 1–17.

Xia L.Q., Chen F., He Z.H. *et al.* Occurrence of puroindoline alleles in Chinese winter wheats // Cereal Chem. J. 2005. V. 82. P. 38–43.

Zhang W., Gianibelli M.C., Ma W. *et al.* Identification of SNPs and development of allele-specific PCR markers for γ-gliadin alleles in *Triticum aestivum* // Theor. Appl. Genet. 2003. V. 107. P. 130–138.

Zhang W., Gianibelli M.C., Rampling L.R. Characterisation and marker development for low molecular weight glutenin genes from *Glu-A3* alleles of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 108. P. 1409–1419.

Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. *et al.* Characterization of three low-molecular-weight Glu-D3 subunit genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113(7). P. 1247–1259.

Zhao X.L., Xia X.C., He Z.H. *et al.* Novel DNA variations to characterize low molecular weight glutenin *Glu-D3* genes and develop STS markers in common wheat// Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. No 3. P. 451–460.

Zlatska A.V. Allele composition of *Pina* and *Pinb* loci of eastern Europian common wheat varieties and their impact on the bread-making quality characteristics // Intern. Conf. «Plant genetics, genomics, and biotechnology». Novosibirsk, 2010. P. 90.

GENETIC POLYMORPHISM OF LOCI DETERMINING BREAD MAKING QUALITY IN UKRAINIAN WHEAT VARIETIES

S.V. Chebotar[1], E.M. Blagodarova[2], E.A. Kurakina[3], I.V. Semenyuk[1], A.M. Polishchuk[1], N.A. Kozub[3], I.A. Sozinov[3], A.N. Khokhlov[2], A.I. Ribalka[2], Yu. M. Sivolap[1]

[1] South Plant Biotechnology Center, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Odessa, Ukraine, e-mail: sabina-chebotar@rambler.ru;
[2] Plant Breeding and Genetics Institute – National Center of Seed and Cultivar Investigation, Odessa, Ukraine;
[3] Odessa National State University, Department of Genetics and Molecular Biology, Odessa, Ukraine;
[4] Institute of Plant Protection UAAS, Kiev, Ukraine

Summary

The paper presents an overview of studies of genetic polymorphism of loci determining bread-making quality among Ukrainian wheat varieties by means of electrophoretic analysis of storage proteins (*Gli* and *Glu*) and PCR. The results of analysis of polymorphism in the *Gli-A1*, *Gli-B1*, *Gli-D1*, *Glu-A3* loci, as well as the allelic compositions of the *Pina-D1* and *Pinb-D1* genes, determining grain hardness, and *Wx* genes, controlling amylose content in the starch of the endosperm, are presented. Comparison of the results obtained with allele-specific primers to the γ gliadin loci and by storage protein electrophoresis shows that the former method can identify some alleles, but the level of polymorphism revealed by this method is lower than that revealed by electrophoresis of storage proteins. Most of the varieties under consideration have PCR alleles characteristic for hard wheat, and only three varieties have alleles specific for soft wheat. Varieties originating from different Ukrainian breeding-centers differ in grain hardness. PCR analysis has not revealed the presence of null alleles of *Wx* genes in the studied Ukrainian genetic pool but allowed selection of breeding material for further development of low-amylose varieties.

Key words: bread wheat, PCR, electrophoresis, gliadins, glutenins, grain hardness, puroindoline genes, *Wx* genes.

УДК 575.113/117:631.547.4:633.11’324:633.16’324

МОДЕЛЬ ГЕННОЙ СЕТИ РЕГУЛЯЦИИ ВРЕМЕНИ ЦВЕТЕНИЯ У ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ И ЯЧМЕНЯ

© 2012 г. **И.Л. Степаненко, О.Г. Смирнова, И.И. Титов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: stepan@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 1 февраля 2012 г. Принята к публикации 8 февраля 2012 г.

Переход от вегетативной к репродуктивной стадии развития растений зависит от фотопериода и яровизации. Предложена простая логическая модель генной сети, регулирующей время цветения озимой пшеницы. У озимых сортов злаков чувствительность к яровизации контролируется генами *VRN1*, *VRN2* и *VRN3*. После яровизации продукт гена *VRN1* подавляет ген *VRN2*, кодирующий репрессор цветения. В результате уровень экспрессии *VRN3* возрастает и стимулирует дальнейшее увеличение уровня транскрипции гена *VRN1*. Гены образуют петлю с положительной обратной связью, что усиливает транскрипцию *VRN1* до уровня, необходимого для инициации цветения. В условиях длинного дня экспрессию *VRN3* усиливают продукты генов *PPD1* и *CO2*, определяющие чувствительность к фотопериоду. Сезонные изменения длины дня через фоторецепторы передаются циркадным часам, которые модулируют время цветения. Данные о генах ячменя и пшеницы, контролирующих чувствительность к яровизации и фотопериоду, интегрированы в генную сеть. С помощью синхронной булевой модели воспроизведена динамика генной сети. Расширенная модель генной сети может быть использована для проверки согласованности экспериментальных данных и выдвижения новых гипотез о взаимодействии генов.

Ключевые слова: пшеница, ячмень, *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*, яровизация, фотопериод, длина дня, циркадный ритм, цветение, генная сеть, синхронная булева модель.

Введение

Яровизация – длительная экспозиция на холоде, необходима для перехода растений озимой пшеницы от вегетативной к репродуктивной стадии развития. Реакция растений на данное воздействие регулируется генами *VRN1*, *VRN2* и *VRN3* (*VERNALIZATION*). Ген *VRN1* кодирует MADS-box транскрипционный фактор. Локус *VRN2* содержит 2 тандемно дуплицированных гена, кодирующих подавляющий цветение фактор ZCCT, а *VRN3* кодирует белок, схожий с ингибиторами Raf-киназ (Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Гены *VRN* регулируют не только чувствительность к яровизации, но и время цветения на длинном дне (Trevaskis *et al*., 2007). Для изучения процесса адаптации к сезонным изменениям, влияющим на время цветения у пшеницы, как модельный объект используют *Arabidopsis thaliana*. *VRN1* является гомологом гена *AP1* (*APENTALA 1*) *A. thaliana*, ген *VRN3* – гомологом гена *FT* (*FLOWERING LOCUS T*) *A. thaliana* (Yan *et al.*, 2003; Yan *et al.*, 2004; Yan *et al.*, 2006). Ген *VRN2* не имеет гомологов у *A. thaliana*, но подавляет цветение аналогично гену *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*) *A. thaliana*. Несмотря на то что ответ на яровизацию контролируется у злаков и *A. thaliana* различными генами, механизмы регуляции времени цветения у них весьма консервативны (Greenup *et al*., 2009). Филогенетический анализ выявил гомологичные гены у пшеницы, ячменя, овса, риса, *A. thaliana* и *Brachypodium distachyon*, дикорастущей травы, которую в настоящее время также используют как модель для изучения регуляции времени цветения у злаковых (Higgins *et al.*, 2010).

Генные сети (группы координированно функционирующих генов) включают регуляторные сети, пути передачи сигналов, метаболические

сети (Ananko *et al*., 2005; Papin *et al*., 2005). Компьютерные технологии реконструкции и анализа генных сетей на базе экспериментальных данных применяют для изучения механизмов развития и функционирования различных организмов. Системный подход при реконструкции генных сетей позволяет применять математические методы для их анализа и построения моделей (Papin *et al*., 2005). В нашей работе из большого числа существующих динамических моделей генных сетей мы используем простейшую – синхронную булеву сеть (Kaufmann *et al*., 2004), которая с успехом используется уже более 40 лет. При математическом анализе динамики генных сетей особое значение имеет вычисление стационарных состояний. Каждое стационарное состояние соответствует своему режиму функционирования сети. Стационарные состояния генных регуляторных сетей были использованы для описания морфогенеза *A. thaliana* (Mendoza *et al.*, 1999) и могут иметь практическое применение в патофизиологии и генной инженерии.

В данной работе на основании современных экспериментальных данных реконструирована генная сеть регуляции времени цветения у злаков в зависимости от сезонных изменений. Рассмотрены некоторые модели регуляции времени цветения у озимой формы ячменя *Hordeum vulgare*, яровой формы диплоидной пшеницы *Triticum monococcum* и озимой гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum*, созданные на основе реконструкции генной сети.

Материалы и методы

Для расчета динамики генной сети регуляции времени цветения была использована синхронная булева модель (Mendoza *et al.*, 1999; Kaufmann *et al*., 2004). Узлам графа было присвоено бинарное значение 1 или 0 в зависимости от того, активен или нет соответствующий ген. Тогда состояние сети в каждый момент времени описывается вектором, компоненты которого характеризуют состояния отдельных узлов.

Взаимодействия между генами представлены направленными связями между узлами. Состояние любого узла в момент времени t + 1 определяется состояниями узлов, которые действуют на этот узел в момент времени t. Если в момент времени t на узел поступает хотя бы один ингибирующий сигнал из входящих взаимодействий, в момент времени t + 1 его состояние равно 0. Если в момент времени t на узел не поступает ингибирующих сигналов, в момент времени t + 1 его состояние равно 1.

Расчет динамики сети состоял из последовательного анализа ее состояний в следующем порядке. Задается вектор состояний сети. Для каждого узла рассматриваются входящие сигналы и обновляется его состояние в соответствии с логическими правилами, которые описаны выше. В результате получаем новый вектор состояний. Если текущий вектор совпадает с предыдущим, то мы нашли неподвижную точку (стационарное состояние) в динамическом портрете нашей генной сети.

Для сети из N узлов мы перебираем все 2^N состояний сети и строим полный фазовый портрет, т. е. глобальную картину динамики сети для любых начальных условий. Очевидно, что при описании простой модели не учитывались различия как в силах взаимодействий, так и в их временных шкалах, однако такая модель оказалась полезной при анализе целого ряда генных сетей.

Для внешних факторов значения 1 и 0 были присвоены следующим образом: для длинного дня – 1, для короткого дня – 0, для дня – 1, для ночи – 0, для холода – 1, для тепла – 0. Этот принцип был использован и в других булевых моделях (Mendoza *et al*., 1999; Davidich *et al*., 2008).

Генные сети построены на основании опубликованных экспериментальных данных (Zhao *et al*., 2005; Kane *et al*., 2007; Li, Dubcovsky, 2008; Shimada *et al*., 2009; Li *et al.*, 2011), для визуализации был использован пакет Pajek (http://pajek.imfm.si/doku.php?id=pajek).

Результаты и обсуждение

Транскрипционный фактор VRN1 является ключевым регулятором, который индуцируется при яровизации и ускоряет переход к репродуктивной стадии развития растений. Пшеница – растение длинного дня. Озимые сорта пшеницы высевают осенью, они яровизируются при низкой температуре и коротком дне зимой и зацветают весной при длинном дне. Осенью цветению пшеницы препятствует

репрессор цветения VRN2, который подавляет транскрипцию гена *VRN3*. Яровизация индуцирует экспрессию гена *VRN1*, кодирующего MADS-box транскрипционный фактор VRN1. VRN1 является репрессором гена *VRN2*, продукт которого репрессирует *VRN3*. В результате возрастание экспрессии гена *VRN1* увеличивает уровень VRN3. Весной, при длинном дне, VRN3 усиливает транскрипцию *VRN1*, что инициирует цветение (Trevaskis *et al*., 2007).

Мы рассмотрели логическую модель сети, состоящей из регуляторного контура генов VRN2-VRN3-VRN1 и внешних факторов – длительной экспозиции на холоде и длины дня (табл. 1).

Всего возможны $2^5 = 1024$ состояния этой сети: 00000, 00001, … , 11111. Было проведено компьютерное моделирование динамики сети регуляции времени цветения. После старта из начального состояния, соответствующего осени, 00100, сеть проходит через состояние «зима», 11001, и оказывается в состоянии 01011. Это состояние активности генов *VRN1* и *VRN3* соответствует весне и репродуктивной фазе развития растений – цветению, и является единственным стационарным состоянием сети.

Ответ на яровизацию хорошо изучен на таком диплоидном злаке, как ячмень (*H. vulgare*). При яровизации изменяется состояние хроматина гена *VRN1, что приводит к значительному усилению уровня транскрипции этого гена* (Oliver *et al.*, 2009). У ячменя подавление транскрипции *VRN1* до яровизации связано с высоким уровнем метилирования гистона 3 по лизину 27.

Помимо *VRN2,* в ответе на яровизацию у злаковых участвует и другой репрессор цветения, ген *ODDSOC2* (*OS2*), кодирующий транскрипционный фактор MADS-box (Greenup *et al.*, 2010). На рис. 1 представлена генная сеть регуляции времени цветения у ячменя, которая включает гены *VRN1, OS2* и *FPF1* и два пути регуляции. В графе генной сети присутствуют два входа внешних сигналов: холод, вызывающий яровизацию, и длина дня. На выходе генной сети – цветение. Ген *OS2* ячменя экспрессируется в листьях и меристеме. Трансгенные растения ячменя со сверхэкспрессией гена *OS2* имеют меньшие высоту и длину листьев (Greenup *et al*., 2010). Экспрессия *OS2* подавляет транскрипцию гена *FPF1*, гомологичного гену *FPF1* (*FLOWERING PROMOTING FACTOR1*) *A. thaliana*. Холод и активация транскрипции *VRN1* приводят к подавлению экспрессии *OS2* и, как следствие, дерепрессии *FPF1*, экспрессия которого, в свою очередь, ускоряет цветение и усиливает элонгацию клеток. Кроме того, VRN1 подавляет транскрипцию *VRN2* (*ZCCTb*), что приводит к активации *VRN3* (Trevaskis *et al*., 2007), дальнейшему усилению экспрессии генов *FPF1* и переходу к репродуктивной стадии развития растений. VRN1 ингибирует *OS2* и объединяет два пути регуляции времени цветения (рис. 1).

По данным анализа транскрипции генов ячменя с помощью микрочипов, после длительной обработки холодом (49 дней при 4 °С) в листьях яровизированных растений изменялся уровень экспрессии 14 генов, при этом экспрессия 6 генов возрастала, а 8 – снижалась (Greenup *et al*., 2011). Среди генов, чувствительных к длительному воздействию холодом, были *VRN1* и *OS2*, а также жасмонат-индуцируемый ген, кодирующий белок (JIP; 23кД), участвующий в синтезе полисахаридов клеточной стенки; ген, кодирующий кальций-связывающий белок (CaBP); ген, кодирующий белок, сходный с РНКазой S (RNaseS); и ген, кодирующий секреторный белок PR17d (рис. 1).

Таблица 1

Экспрессия генов *VRN* озимой пшеницы в зависимости от яровизации и длины дня

Сезон года	Холод	Длинный день	*VRN2*	*VRN3*	*VRN1*	Состояние сети	Цветение
Осень	0	1	1	0	0	01100	0
Зима	1	0	0	0	1	10001	0
Весна	0	1	0	1	1	01011	1

Примечание. Длинный день – 1, короткий день – 0, отсутствие холода – 0. Ген имеет значение 1, когда экспрессируется на высоком уровне, и 0 – когда неактивен.

Экспрессия *VRN1* у ячменя зависит от яровизации и стадии развития растений, но не от длины дня (Trevaskis *et al*., 2006). Гены *ZCCTa* и *ZCCTb* локуса *VRN2* активны только на длинном дне (16 ч освещения/8 ч темноты) и осенью подавляют цветение растений, не подвергнувшихся яровизации (Trevaskis *et al*., 2006). После яровизации на длинном дне *VRN1* индуцируется, а экспрессия *ZCCTb* ингибируется (рис. 1).

Кроме того, у ячменя VRN2 подавляет экспрессию гена *PPD2* (*PHOTOPERIOD 2*), влияющего на время цветения в условиях короткого дня. У сортов ячменя с делециями локуса *VRN2* экспрессия *PPD2* наблюдается и на длинном дне, но на более низком уровне, чем на коротком дне (Casao *et al*., 2011). Яровые сорта ячменя, несущие доминантный ген фотопериода *PPD1*, зацветают при длинном дне, при этом происходит активация транскрипции *VRN3* (Hemming *et al.*, 2008) через транскрипционный фактор CO (CONSTANS) (Turner *et al*., 2005).

На основании экспериментальных данных (Zhao *et al*., 2005; Kane *et al*., 2007; Li, Dubcovsky, 2008; Shimada *et al*., 2009; Li *et al.*, 2011), полученных на озимой форме гексаплоидной пшеницы *T. aestivum* и яровой форме диплоидной пшеницы *T. monococcum*, реконструирована генная сеть регуляции времени цветения в зависимости от продолжительного действия холода и длины дня (рис. 2). MADS-box транскрипционный фактор озимой пшеницы VRT2 (VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2) связан с процессом яровизации, он действует как репрессор гена *VRN1* (Kane *et al*., 2007). При длинном дне у неяровизированных растений экспрессия *VRT2* усиливается, яровизация ингибирует *VRT2*. Экспрессия *VRN3* (*FT*) усиливается на длинном дне. Белок VRN3 (названный флориген) движется из листьев в апикальную меристему и ускоряет цветение у различных видов растений (Corbesier *et al*., 2007). У пшеницы VRN3 в меристеме взаимодействует с bZIP-белком FDL2 (FD-like), который непосредственно связывается с промотором гена *VRN1*, активируя его транскрипцию (Li, Dubcovsky, 2008). Экспрессия *VRN3* приводит к дальнейшему увеличению уровня транскрипции *VRN1*, таким образом, образуется петля с положительной обратной

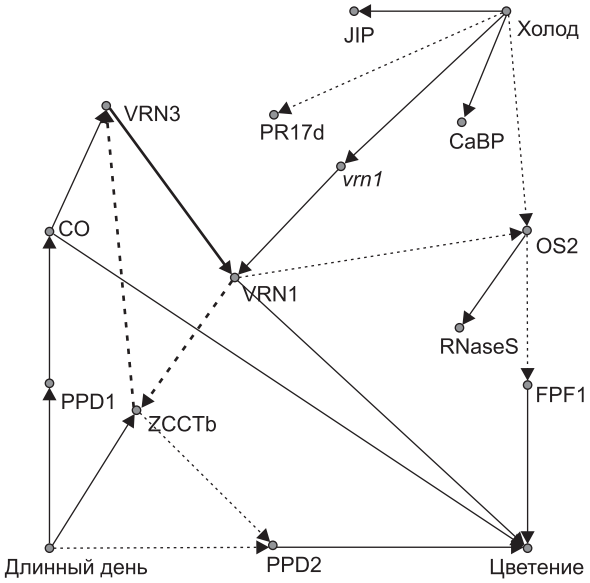


Рис. 1. Генная сеть регуляции времени цветения у ячменя.

Сплошные стрелки обозначают активацию, пунктирные – ингибирование гена. В генной сети выявлен один контур с положительной обратной связью VRN1-ZCCTb-VRN3-VRN1. VRN – VERNALIZATION; *vrn1* – рецессивный аллель гена *VRN1*; ZCCTb – VRN2; PPD – PHOTOPERIOD; CO – CONSTANS; JIP – 23 kD JASMONATE INDUCED PROTEIN; CaBP – CALCIUM BINDING EF HAND PROTEIN; PR17d – SECRETORY PROTEIN; RNaseS – RNaseS-like; OS2 – MADS-BOX GENE; FPF1 – FLOWERING PROMOTING FACTOR 1.

связью, что усиливает транскрипцию *VRN1* до уровня, необходимого для инициации цветения (Distelfeld *et al*., 2009).

Ген *VRN3* функционирует как интегратор сигнальных путей в ответ на яровизацию и фотопериод у злаковых (Yan *et al.*, 2006; Hemming *et al.*, 2008). Консервативное семейство белков NF-Y индуцируется в ответ на засуху и осмотический стресс (Stephenson *et al*., 2007). Взаимодействие между белками, имеющими CCT домены (CO, CO-like and TIMING OF CAB1 EXPRESSION1), и транскрипционными факторами NF-Y/HAP (NUCLEAR FACTOR-Y) играет важную роль в интеграции путей передачи сигналов при яровизации и изменении длины дня (Li *et al.*, 2011). CCT-белками являются ZCCT1 и ZCCT2, гены которых расположены в локусе *VRN2*, и CO2, которые взаимодействуют с одним семейством NF-Y-белков (рис. 2). Гены *PPD1* и *CO2*, участвующие в ответе на фотопериод, усиливают экспрессию *VRN3* при

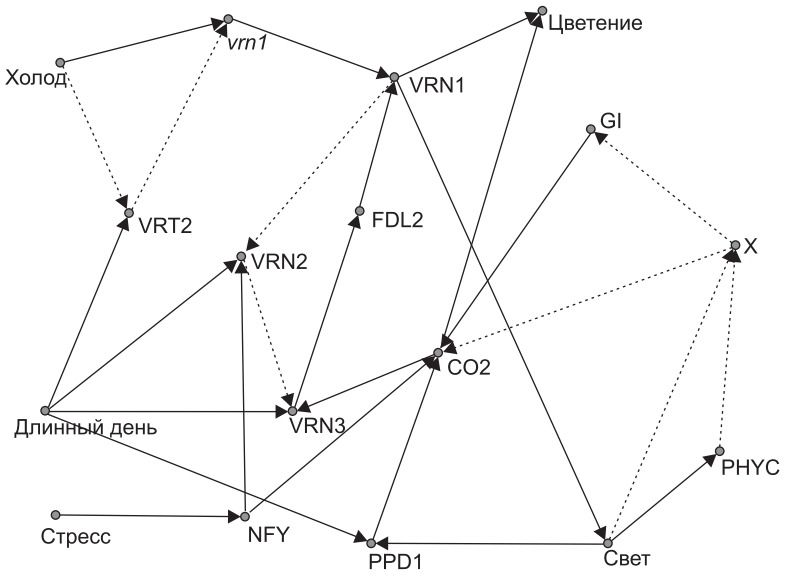


Рис. 2. Генная сеть регуляции времени цветения пшеницы в зависимости от яровизации, фотопериода, стресса и циркадного ритма.

Сплошные стрелки обозначают активацию, пунктирные – ингибирование гена.
VRN – VERNALIZATION; *vrn1* – рецессивный аллель гена VRN1; VRT2 – VEGETATIVE TO REPRODUCTIVE TRANSITION 2; FDL2 – FD-like 2, PPD1 – PHOTOPERIOD 1; PHYC – PHYTOCHROME C; NF-Y – NUCLEAR FACTOR-Y; CO2 – CONSTANS 2; GI – GIGANTEA; X – гипотетический белок.

длинном дне, тогда как *VRN2* является репрессором цветения (Turner *et al*., 2005). Регуляция цветения происходит в результате конкуренции репрессора цветения VRN2 (*ZCCT1*) и активатора CO2 за взаимодействие с NF-Y комплексом (Li *et al.*, 2011).

Сигнал о сезонных изменениях длины дня, получаемый через фоторецепторы, передается циркадным часам, которые также регулируют время цветения (Imaizumi, 2010). У *A. thaliana* фактор GI (GIGANTEA) активирует транскрипцию гена *TOC1*, тогда как TOC1 ингибирует транскрипцию гена *GI*. Регуляторы циркадного ритма TOC1, PRR5, PRR7, PRR9, CCA1 и LHY образуют контур с отрицательными обратными связями, определяющий осцилляцию экспрессии генов. GI активирует транскрипцию гена *CO* в составе белкового комплекса (Sawa *et al*., 2007). Выявлен ген пшеницы, который является ортологом гена *GI A. thaliana* (Zhao *et al*., 2005). CO является позитивным регулятором цветения при длинном дне, активируя транскрипцию гена *FT* (*VRN3*), запускающего цветение (Tiwari *et al.*, 2010). COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1) является ключевым регулятором фотоморфогенеза растений (Smirnova *et al*., 2011). В темноте COP1 способствует деградации светорегулируемых транскрипционных факторов и подавляет экспрессию генов фотоморфогенеза. У *A. thaliana* COP1 обеспечивает протеолиз ELF3, GI и CO в темноте (Yu *et al*., 2008). ELF3 действует как белковый адаптер, способствуя взаимодействию COP1 с GI. Механизмы регуляции циркадного ритма консервативны у многих видов растений (Song *et al*., 2010). Поскольку COP1 является очень консервативным белком, можно предположить участие E3-убиквитинлигазы в регуляции циркадного ритма у пшеницы (рис. 2). На схеме генной сети предполагаемый нами гипотетический белок обозначен символом X. Этот белок может иметь активность убиквитинлигазы. Белок X подавляет экспрессию GI ночью, в отсутствие света, формируя циркадный ритм.

На проростках ярового сорта диплоидной пшеницы *T. monococcum* была изучена динамика экспрессии генов *GI, CO1, VRN3* (*FT*) и *VRN1* в зависимости от фотопериода и суточного ритма (Shimada *et al*., 2009). Была

предложена альтернативная модель регуляции контура VRN3--||VRN2--||VRN1→ VRN3, в которой VRN3 является репрессором *VRN2* и активируется на длинном дне через путь передачи светового сигнала PPD1→GI→CO (Shimada *et al*., 2009). Модель была построена при изучении мутантных линий пшеницы *mvp* (*maintained vegetative phase*), несущих мутацию гена *VRN1*. В дальнейшем было показано, что эти линии несут большие делеции, включающие гены *AGLG1*, *CYS*, *PHYC* и *VRN1* (Distelfeld, Dubcovsky, 2010). Авторы этой статьи предполагают, что поскольку экспрессия *VRN2* и *FT* регулируется светом, снижение экспрессии *VRN2* у мутантов *mvp* может быть связано с делецией гена *PHYC*, кодирующего фоторецептор фитохром С, поэтому пока нет оснований предлагать альтернативную модель регуляции цветения генами *VRN*.

Экспрессия генов *GI*, *CO1*, *VRN3* (*FT*) и *VRN1* регулировалась циркадным 24-часовым ритмом. Максимальная экспрессия *VRN1* наблюдалась утром. Суточный ритм *VRN1* не зависел от длины дня, тогда как *VRN3* не экспрессировался в условиях короткого дня (10 ч освещения/14 ч темноты). В условиях длинного дня (16 ч освещения/8 ч темноты) пик экспрессии *VRN3* наблюдался днем. Максимальная экспрессия мРНК *CO1* наблюдалась ночью и не зависела от длины дня. В табл. 2 данные по экспрессии генов, полученные в эксперименте Shimada с соавт. (2009), представлены в бинарном виде.

Данные, представленные в табл. 2, согласуются с динамикой экспрессии генов циркадного ритма, рассчитанной нами на основании экспериментальных данных и архитектуры генной сети (табл. 3). Исключение составил лишь паттерн циркадного ритма гена *CO1*, на который, как показано (Shimada *et al*., 2009), влияла мутация гена *PPD1*. На коротком дне у растений яровой пшеницы с мутантным аллелем *ppd1* пик активности гена *CO1* наблюдался вечером. Возможно, сдвиг во времени суточного ритма *CO2* относительно *CO1* связан с его регуляцией GI и белком X, который экспрессируется в темноте и ингибирует гены *CO* и *GI*.

Таблица 2

Изменения экспрессии генов яровой пшеницы, несущих доминантный аллель гена *PPD1*, в зависимости от длины дня и суточного ритма (по данным Shimada *et al*., 2009)

Длина дня	Время суток	*CO1*	*GI*	*VRN1*	*FT* (*VRN3*)
Короткий	ночь	1	0	0	0
Короткий	день	0	1	1	0
Длинный	ночь	1	0	0	0
Длинный	день	0	1	1	1

Примечание. Ген имеет значение 1, когда экспрессируется на высоком уровне и 0, когда неактивен.

В норме PPD1 принимает опосредованное участие в активации *VRN3* в ответ на длину дня. Возможно, это определяет отсутствие экспрессии гена *VRN3* на коротком дне как у яровой, так и озимой пшеницы. Экспрессия *VRN3* в условиях длинного дня и в дневное время суток определяется активными генами *PPD1* и *VRN1*, таким образом, у озимой пшеницы транскрипционный фактор VRN1 является ключевым регулятором времени цветения.

В данной работе мы интегрировали в генную сеть данные по генам, контролирующим чувствительность к яровизации и фотопериоду.

Таблица 3

Циркадные изменения экспрессии генов озимой пшеницы, рассчитанные на основании топологии генной сети регуляции времени цветения у озимой пшеницы

Длина дня	Время суток	*PPD1*	*CO2*	*GI*	*X*	*VRN1*	*VRN3*	*VRN2*
Короткий	ночь	0	0	0	1	0	0	0
Короткий	день	0	1	1	0	1	0	0
Длинный	ночь	0	0	0	1	0	0	1
Длинный	день	1	1	1	0	1	1	0

Примечание. Ген имеет значение 1, когда экспрессируется на высоком уровне и 0, когда неактивен.

Предложена простая логическая модель генной сети, регулирующей время цветения озимой пшеницы. С использованием синхронной булевой модели воспроизведена динамика генной сети и выявлено ее стационарное состояние. Модель регуляции времени цветения в зависимости от циркадного ритма включает гипотетический белок, не выявленный у пшеницы, предположительно гомологичный COP1 *A. thaliana*. Расширенная модель генной сети может быть использована для проверки согласованности экспериментальных данных и выдвижения новых гипотез о взаимодействии генов.

Благодарности

Работа частично поддержана: Госконтрактом № 07.514.11.4023 Минобрнауки РФ «Проектирование и разработка RESTful-веб-сервисов для создания распределенной инфраструктуры, ориентированной на решения задач реконструкции и анализа генных сетей»; грантом Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.» (07.514.11.4052); интеграционным проектом СО РАН; программой РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Литература

Ananko E.A., Podkolodny N.L., Stepanenko I.L. *et al*. GeneNet in 2005 // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. D425–427.

Casao M.C., Igartua E., Karsai I. *et al*. Expression analysis of vernalization and day-length response genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) indicates that VRNH2 is a repressor of PPDH2 (HvFT3) under long days // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 1939–1949.

Corbesier L., Vincent C., Jang S.H. *et al*. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* // Sci. 2007. V. 316. P. 1030–1033.

Davidich M., Bornholdt S. Boolean network model predicts cell cycle sequence of fission yeast // PLoS ONE. 2008. V. 3. P. e1672.

Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 178–184.

Distelfeld A., Dubcovsky J. Characterization of the maintained vegetative phase deletions from diploid wheat and their effect on VRN2 and FT transcript levels // Mol. Genet. Genomics. 2010. V. 283. P. 223–232.

Greenup A., Peacock W.J., Dennis E.S., Trevaskis B. The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals // Ann. Bot. 2009. V. 103. P. 1165–1172.

Greenup A.G., Sasani S., Oliver S.N. *et al*. ODDSOC2 is a MADS box floral repressor that is down-regulated by vernalization in temperate cereals // Plant Physiol. 2010. V. 153. P. 1062–1073.

Greenup A.G., Sasani S., Oliver S.N. *et al*. Transcriptome analysis of the vernalization response in barley (*Hordeum vulgare*) seedlings // PLoS One. 2011. V. 6. P. e17900.

Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis, E.S., Trevaskis B. Low-temperature and daylength cues are integrated to regulate *FLOWERING LOCUS T* in barley // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 355–366.

Higgins J.A., Bailey P.C., Laurie D.A. Comparative genomics of flowering time pathways using *Brachypodium distachyon* as a model for the temperate grasses // PLoS One. 2010. V. 19. P. e10065.

Imaizumi T. Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: Time to think about location // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. V. 13. P. 83–89.

Kauffman S., Peterson C., Samuelsson B. *et al.* Genetic networks with canalyzing Boolean rules are always stable // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. P. 17102–17107.

Kane N.A., Agharbaoui Z., Diallo A.O. *et al.* TaVRT2 represses transcription of the wheat vernalization gene *TaVRN1* // Plant J. 2007. V. 51. P. 670–680.

Li C., Distelfeld A., Comis A., Dubcovsky J. Wheat flowering repressor VRN2 and promoter CO2 compete for interactions with NUCLEAR FACTOR-Y complexes // Plant J. 2011. V. 67. P. 763–773.

Li C., Dubcovsky J. Wheat FT protein regulates VRN1 transcription through interactions with FDL2 // Plant J. 2008. V. 55. P. 543–554.

Mendoza L., Thieffry D., Alvarez-Buylla E. Genetic control of flower morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*: a logical analysis // Bioinformatics. 1999. V. 15. P. 593–606.

Oliver S.N., Finnegan E.J., Dennis E.S. *et al*. Vernalization-induced flowering in cereals is associated with changes in histone methylation at the *VERNALIZATION1* gene // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. P. 8386–8391.

Papin J.A., Hunter T., Palsson B.O., Subramaniam S. Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2005. V. 6. P. 99–111.

Sawa M., Nusinow D.A., Kay S.A., Imaizumi T. FKF1 and GIGANTEa complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis* // Sci. 2007. V. 318. P. 261–265.

Shimada S., Ogawa T., Kitagawa S. *et al*. A genetic network of flowering-time genes in wheat leaves, in which an APETALA1/FRUITFULL-like gene, *VRN1*, is upstream of FLOWERING LOCUS T // Plant J. 2009. V. 58. P. 668–681.

Smirnova O.G., Stepanenko I.L., Shumny V.K. The role of the COP1, SPA, and PIF proteins in plant photomorphogenesis // Biol. Bull. Rev. 2011. V. 1. No 4. P. 314–324.

Song Y.H., Ito S., Imaizumi T. Similarities in the circadian clock and photoperiodism in plants // Curr. Opin. Plant Biol. 2010. V. 13. P. 594–603.

Stephenson T.J., McIntyre C.L., Collet C. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the NF-Y family

of transcription factors in *Triticum aestivum* // Plant Mol. Biol. 2007. V. 65 P. 77–92.

Tiwari S.B., Shen Y., Chang H.C. *et al.* The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter *via* a unique *cis*-element // New Phytol. 2010. V. 187. P. 57–66.

Trevaskis B., Hemming M.N., Dennis E.S. *et al*. The molecular basis of vernalization-induced flowering in cereals // Trends Plant Sci. 2007. V. 12. P. 352–357.

Trevaskis B., Hemming M.N., Peacock W.J., Dennis E.S. *HvVRN2* responds to daylength, whereas *HvVRN1* is regulated by vernalization and developmental status // Plant Physiol. 2006. V. 140. P. 1397–1405.

Turner A., Beales J., Faure S. *et al.* The pseudo-response regulator Ppd-H1 provides adaptation to photoperiod in barley // Sci. 2005. V. 310. P. 1031–1034.

Yan L., Fu D., Li C., Blechl A. *et al.* The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 19581–19586.

Yan L., Loukoianov A., Blechl A. *et al.* The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization // Sci. 2004. V. 303. No 5664. P. 1640–1644.

Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G. *et al*. Positional cloning of wheat vernalization gene *VRN1* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 6263–6268.

Yu J.W., Rubio V., Lee N.Y. *et al*. COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability // Mol. Cell. 2008. V. 32. P. 617–630.

Zhao X.Y., Liu M.S., Li J.R. *et al*. The wheat TaGI1, involved in photoperiodic flowering, encodes an *Arabidopsis* GI ortholog // Plant Mol. Biol. 2005. V. 58. P. 53–64.

A GENE REGULATORY NETWORK MODEL FOR VERNALIZATION AND SEASONAL FLOWERING RESPONSE IN WINTER WHEAT AND BARLEY

I.L. Stepanenko, O.G. Smirnova, I.I. Titov

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

Summary

The transition from vegetative to reproductive development in wheat is regulated by seasonal cues, including vernalization and photoperiod. Here we present a simple logical model of the wheat development gene network. Vernalization accelerates flowering in winter cereals. It is regulated mainly by the vernalization genes *VRN1*, *VRN2*, and *VRN3*. After vernalization, *VRN1* downregulates the *VRN2* flowering repressor, thereby increasing the VRN3 level. The expression of VRN3 promotes further increases in the *VRN1* transcription level, generating a positive feedback loop, which enhances *VRN1* transcription to a threshold level required to initiate flowering. The products of the PPD1 and *CO2* photoperiod genes increase *VRN3* expression under long daylight conditions. Seasonal changes in day length are perceived by plant photoreceptors and transmitted to the circadian clock to modulate flowering time. Here we integrate data on vernalization and photoperiod genes in a gene network. Using a synchronous Boolean model, we have simulated the network dynamics. This model can be useful to test the coherence of experimental data and to hypothesize gene interactions that remain to be discovered.

Key words: wheat, barley, *VRN1*, *VRN2*, *VRN3*, vernalization, photoperiod, day length, circadian rhythm, flowering, gene network, synchronous Boolean model.

УДК 577.112:633.11

АНТИМИКРОБНЫЕ ПЕПТИДЫ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Т.И. Одинцова[1], Т.В. Коростылева[1], Л.Л. Уткина[1], Я.А. Андреев[2], А.А. Славохотова[1], Е.А. Истомина[1], В.А. Пухальский[1], Ц.А. Егоров[2]**

[1] Учреждение Российской академии наук Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия, e-mail: odintsova2005@rambler.ru;
[2] Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 11 ноября 2011 г. Принята к публикации 21 декабря 2011 г.

Антимикробные пептиды (АМП) представляют собой низкомолекулярные защитные полипептиды, которые образуются в клетках всех живых организмов постоянно или в ответ на атаку патогена. Они являются важнейшими компонентами защитной системы как животных, так и растений. АМП различаются по структуре и механизмам действия. Большинство из них относится к цистеин-богатым пептидам, содержащим четное число остатков цистеина, образующих дисульфидные связи, что придает их молекулам структурную стабильность. На основе гомологии аминокислотных последовательностей и пространственной структуры выделяют несколько семейств АМП растений. Гены АМП растений могут быть использованы для повышения устойчивости сельскохозяйственных растений путем генетической трансформации, а также для разработки на их основе новых антибактериальных и антигрибковых лекарственных препаратов. В настоящем обзоре кратко изложены свойства и структура генов основных исследованных авторами семейств антимикробных пептидов пшеницы *Triticum kiharae* – глицин-богатых пептидов, дефензинов, гевеиноподобных пептидов, а также семейства 4-Cys пептидов.

Ключевые слова: пшеница *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., антимикробные пептиды, секвенирование аминокислотных последовательностей, 3′- и 5′-RACE, иммунитет растений, регуляция экспрессии генов.

Введение

Пшеница является основной зерновой культурой для 35 % населения земного шара, под посевами которой занято 216 млн га (Vasil, 2007). Патогенные микроорганизмы и насекомые-вредители наносят существенный урон культивируемым сортам. Использование средств химической защиты растений требует значительных материальных затрат и наносит значительный ущерб экологии. Альтернативная стратегия повышения устойчивости предполагает укрепление защитной системы самих растений как за счет усиления экспрессии защитных генов, так и с помощью встраивания в геном чувствительных растений генов защитных белков из других, устойчивых, видов. По сравнению с другими подходами, генетическая трансформация имеет ряд преимуществ. Во-первых, данный метод позволяет использовать гены любого происхождения. Во-вторых, возможность введения в геном единичных генов и предварительного тестирования их продуктов на безопасность обусловливает высокую точность и надежность данного подхода. В-третьих, при использовании генетической трансформации чужеродные гены могут быть предварительно модифицированы с целью изменения их свойств.

Важнейшей группой защитных полипептидов являются антимикробные пептиды (АМП), обнаруженные у про- и эукариот. Они представляют собой древнейший механизм защиты от патогенов (Castro, Fontes, 2005; Manners, 2007; Farrokhi *et al*., 2008; Sels *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2008; Ajesh, Sreejith, 2009; Benko-Iseppon *et al.*, 2010; da Rocha Pitta *et al.*, 2010; Kido *et al.*, 2010; Padovan *et al*., 2010).

Представление об участии АМП в защите растений сформировалось исходя из комплекса экспериментальных фактов. Об этом свиде-

тельствовали: обнаруженная у них в системе *in vitro* антимикробная активность, усиление экспрессии их генов в ответ на биотический и абиотический стрессы, а также повышение устойчивости к патогенам трансгенных растений, конститутивно экспрессирующих гены антимикробных пептидов (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, 2001).

Несмотря на разнообразие аминокислотных последовательностей, АМП обладают общими физико-химическими свойствами: небольшим размером (менее 10 кДа) и положительным зарядом молекул, а также амфифильностью структуры. Эти свойства позволяют АМП взаимодействовать с клеточными стенками и мембранами микроорганизмов, нарушая их проницаемость, что и лежит в основе их антимикробного действия (Dubovskii *et al.*, 2011; Gao *et al*., 2001). Детально механизмы ингибирующего действия АМП растений на патогены не изучены. Большинство имеющихся данных свидетельствуют о вызванном ими повреждении целостности мембран патогенов, образовании пор и нарушении барьерной функции. Появились также данные о действии некоторых АМП на внутриклеточные мишени микроорганизмов (Lobo *et al.*, 2007; Van der Weerden *et al.*, 2008).

Интерес, проявляемый к АМП в последние годы, связан как с возможностью использования их генов для создания устойчивых форм сельскохозяйственных растений, так и с перспективностью их применения для разработки лекарственных препаратов нового поколения.

Большинство АМП растений относятся к цистеин-богатым пептидам, в молекулах которых содержится четное число остатков цистеина (2, 4, 6, 8 и 10), образующих дисульфидные связи, что придает их молекулам высокую структурную стабильность. По гомологии аминокислотных последовательностей, цистеинового мотива (расположения остатков цистеина в полипептидной цепи) и пространственной структуры различают несколько семейств АМП растений: тионины, дефензины, неспецифические липидпереносящие белки (ЛПБ), гевеино- и ноттиноподобные пептиды, а также макроциклические пептиды (циклотиды) (Broekaert *et al.*, 1997; Garcia-Olmedo *et al.*, 1998, 2001).

Начиная с 1990 г. АМП были выделены из ряда растений, однако многие аспекты, касающиеся самих пептидов (компонентного состава у отдельных видов растений, механизма их действия, специфичности в отношении патогенов), а также структуры их генов и регуляции экспрессии, оставались мало изученными. Наиболее детально был проведен анализ катионных АМП зерновок пшеницы вида *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. (Egorov *et al.*, 2005), кроме того, была установлена структура генов некоторых из них. Гексаплоидная пшеница *T. kiharae* Dorof. et Migusch. (геномная формула A^bGD) представляет собой синтетический аллополиплоид, полученный от скрещивания *Triticum timopheevii* с *Aegilops tauschii.* Этот вид обладает повышенной устойчивостью к патогенам.

Для выделения АМП из зерновок *T. kiharae* был разработан метод, сочетающий в себе различные типы высокоэффективной жидкостной хроматографии (аффинную, эксклюзионную и обращенно-фазовую) в комбинации с секвенированием аминокислотных последовательностей по Эдману и масс-спектрометрией (Egorov *et al*., 2005). В результате из семян *T. kiharae* было выделено и охарактеризовано 24 новых антимикробных пептида и показано, что в этом виде присутствуют практически все известные у растений семейства АМП: тионины, дефензины, ноттиноподобные пептиды и липидпереносящие белки. Кроме известных семейств, в этом виде были обнаружены новые семейства, ранее не описанные у растений. Так, были открыты семейство глицин-богатых пептидов, семейство четырехцистеиновых (4-Cys) пептидов, новое подсемейство дефензинов D и новый структурный тип гевеиноподобных пептидов. Эти новые АМП и будут рассмотрены ниже.

Глицин-богатые пептиды

В этом семействе обнаружено 4 структурно различающихся глицин-богатых пептида, не содержащих остатков цистеина в молекуле (Egorov *et al.*, 2005) (табл. 1).

Для этих пептидов, помимо высокого содержания глицина, характерно наличие повторяющихся олигопептидных мотивов, причем различных для разных членов семейства, таких, как G_nYPGH в пептидах Tk-AMP-G1 и Tk-AMP-G2 или G_nYP в пептидах Tk-AMP-G3 и Tk-AMP-G4, где n – переменное число. Наличие

Таблица 1

Глицин-богатые пептиды пшеницы *T. kiharae**

Пептид	N-концевая аминокислотная последовательность	Молекулярная масса, Да
Tk-AMP-G1	GGGGGGGGYHGGGGG**GYPGH**^{20}	4294
Tk-AMP-G2	GGGGAGG**GYPGH**GGG**GYPGH**GGGGGGG **GYPGH**GGGGGGGGGGGGGGGGGG^{50}	4375
Tk-AMP-G3	G**GYP**GGGGGG^{10}	4668
Tk-AMP-G4	G**GYP**GGGGAG^{10}	4750

* Повторяющиеся аминокислотные мотивы выделены жирным шрифтом.

повторов в аминокислотных последовательностях глицин-богатых пептидов может отражать происхождение кодирующих их генов путем многократных дупликаций предкового гена. Ранее пептиды такого типа в семенах растений описаны не были. Испытания антифунгальной активности этих пептидов в отношении ряда фитопатогенных грибов показали, что глицин-богатые пептиды вызывают морфологические изменения у грибов при концентрациях 100–150 мкг/мл (Egorov *et al*., 2005). Интересно, что глицин-богатые АМП широко распространены у насекомых (Bulet *et al*., 1999). Наши данные о наличии сходных пептидов в пшенице свидетельствуют о том, что они могут быть составной частью защитного арсенала также у растений.

Дефензины

Дефензины являются древнейшим семейством АМП, поскольку были обнаружены у всех живых существ. В семенах *T. kiharae* были частично охарактеризованы 11 дефензинов, которые по гомологии N-концевых последовательностей были подразделены на 3 структурные группы: Tk-AMP-D (группа I), Tk-AMP-γ1, Tk-AMP-γ2, Tk-AMP-γ3 (группа II), Tk-AMP-ω2 и ω3 (группа III). Большинство из них (пептиды Tk-AMP-D) представляют собой новый подкласс дефензинов пшеницы – дефензины группы I. Из семян *T. kiharae* в общей сложности было выделено 8 дефензинов этой группы (табл. 2) (Odintsova *et al.*, 2007).

Сравнение аминокислотных последовательностей дефензинов D показало, что исследованные пептиды высокогомологичны, т. е. представляют собой семейство близкородственных пептидов. Различия по длине молекул связаны с делециями аминокислотных остатков между позициями 35 и 42 полипептидной цепи (нумерация остатков приведена по D1). Дефензины D различаются также по заряду молекул. Как и большинство АМП, все дефензины D, кроме D1.1, положительно заряжены. Основные различия в аминокислотной последовательности наблюдаются в С-концевой области молекул. Тем не менее даже в этой области обнаруживаются определенные закономерности: перед остатком Cys6 всегда расположен остаток основной аминокислоты, остатки Cys6 и Cys7 разделены гидрофобным аминокислотным остатком, и в положении 47 всегда расположен остаток основного характера, (нумерация остатков приведена по последовательности D1) (Odintsova *et al.*, 2007).

Прослеживается также гомология с дефензинами других видов злаков. Сравнение аминокислотных последовательностей дефензинов D с дефензинами других злаков выявило наибольшую гомологию с TAD1, дефензиноподобным пептидом, экспрессирующимся в проростках пшеницы при холодовой адаптации (Koike *et al.*, 2002). В то же время гомология с дефензинами растений, принадлежащих к другим ботаническим семействам, довольно низкая (Odintsova *et al.*, 2007).

Помимо дефензинов *T. kiharae*, были также выделены гомологи дефензинов D из родственных видов злаков (Odintsova *et al.*, 2007). Для исследования были взяты ряд диплоидных, тетраплоидных и гексаплоидных видов родов *Triticum* и *Aegilops*, предполагаемых доноров геномов A, B и D полиплоидных пшениц. Дефензины D были обнаружены у всех исследо-

Таблица 2

Аминокислотные последовательности дефензинов *T. kiharae*

Пептид	Аминокислотная последовательность*
Tk-AMP-D1	RTCQSQSHKFKGACFSDTNCDSVCRTENFPRGQCNQHHVERKCYCERDC
Tk-AMP-D2	RTCESQSHKFKGPCFSDSNCATVCRTENFPRGQCNQHHVERKCYCERSC
Tk-AMP-D1.1	RDCESDSHKFHGACFSDTNCANVCQTEGFTAGKCVG--VQRHCHCTKDC
Tk-AMP-D5	RECRSESKKFVGLCVSDTNCASVCLTERFPGGKCDG--Y-RRCFCTKDC
Tk-AMP-D6	RDCRSQSKTFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDG--Y-RRCFCTKDC
Tk-AMP-D6.1	RECRSQSKQFVGLCVSDTNCASVCLTEHFPGGKCDG--Y-RRCFCTKDC
Tk-AMP-D3	RDCKSDSHKFHGACFSDTNCANVCQTEGFTRGKCDG--I--HCHCIKDC
Tk-AMP-D4	RDCTSQSHKFVGLCLSDRNCASVCLTEYFTGGKCD-H---RRCVCTKGC
Консенсусная последовательность	R-C-S-Sb-F-GhChSD-NC--VC-TE-F--G-C-------bChC-b-C

* Последовательности выровнены вручную и расположены по мере уменьшения молекулярной массы пептидов. Пропуски введены для достижения максимальной гомологии. Аминокислотные остатки, различающиеся у всех или некоторых последовательностей, выделены соответственно темно-серым и светло-серым цветом. В нижней строке приведена консенсусная последовательность, в которой консервативные остатки цистеина и некоторых других аминокислот выделены жирным шрифтом. «h» и «b» – гидрофобные и основные аминокислоты соответственно.

ванных видов, однако их набор у видов разного геномного состава различался. У диплоидных и тетраплоидных форм пшениц были выявлены только некоторые из дефензинов, обнаруженных у полиплоидных форм. У диплоидного вида *T. monococcum*, который является вероятным донором генома A, были идентифицированы дефензины D4 и D5. Вместо D1 у этого вида было обнаружено 2 пептида, гомологичных D1. У *Ae. speltoides*, вероятного донора генома B, в семенах были выявлены дефензины D2 и D6.1. Кроме того, был обнаружен новый дефензин, гомологичный D3 и названный D3.1. Этот дефензин не был обнаружен у других исследованных видов, по-видимому, он специфичен для *Ae. speltoides*. У *Ae. tauschii*, донора генома D пшеницы, были идентифицированы дефензины D2, D3 и D6. У двух тетраплоидных видов пшеницы *T. timopheevii* (геномная формула A^bG) и *T. militinae* (A^bG) наборы дефензинов были сходными: D1/D1.2, D2, D4, D5 и D6.1. Дефензины D3 и D6, кодируемые генами, локализованными в геноме D, у *T. timopheevii* и *T. militinae* отсутствовали. У гексаплоидных видов пшеницы *T. kiharae* и *T. aestivum* (сорта Хакасская и Родина) набор дефензинов был одинаков.

В целом из семян *T. kiharae*, а также родственных видов *Triticum* и *Aegilops* было выделено 10 новых дефензинов и установлены аминокислотные последовательности 9 из них. Показана высокая гомология первичной структуры дефензинов в пределах вида, особенно в N-концевой области молекулы. Установлено, что структура дефензинов D высококонсервативна в эволюции (Odintsova *et al.*, 2007). С использованием биохимических подходов высказано предположение о локализации генов, кодирующих дефензины, в геномах полиплоидной пшеницы: дефензины D1, D4 и D5 ассоциированы с геномом A, D2 и D6.1 – с геномом B, а D2, D3 и D6 – с геномом D (Odintsova *et al.*, 2007).

Гевеиноподобные пептиды WAMP

Из семян пшеницы *T. kiharae* было выделено два новых пептида WAMP-1a и WAMP-1b, различающихся по присутствию дополнительного C-концевого остатка аргинина у WAMP-1b (Odintsova *et al.*, 2009). Эти пептиды обладают гомологией с гевеиноподобными АМП. На основании этого они были отнесены к семейству гевеиноподобных АМП растений. (Гевеин – это лектин из латекса гевеи. Молекула этого пептида содержит 8 остатков цистеина, которые образуют характерный «цистеиновый мотив». Все АМП, которые похожи на гевеин по первичной структуре, в том числе и по «цистеиновому мотиву», относят к семейству гевеиноподобных

пептидов. Гевеиновый домен входит в состав всех хитин-связывающих белков, которым приписывается роль в защите растений от патогенных грибов и насекомых-вредителей.) Несмотря на сходство с гевеином, в пептидах WAMP-1 содержится 10 остатков цистеина, 2 из которых расположены уникальным образом, поэтому их можно выделить в особый структурный тип 10-Cys гевеиноподобных пептидов с новым цистеиновым мотивом (рис. 1). Обращает на себя внимание сходство пептидов WAMP с хитин-связывающими доменами хитиназ класса 1 (рис. 1).

До исследований пептидов пшеницы (Odintsova *et al.*, 2009) было известно лишь два 10-Cys гевеиноподобных пептида, выделенных из коры деревьев *Eucommia ulmoides* Oliv. (Huang *et al*., 2002) и *Eunymus europaeus* L. (Van den Bergh *et al*., 2002). Эти АМП хотя и имеют 10 остатков цистеина в молекуле, так же как пептиды WAMP, однако отличаются от них по их расположению (рис. 1) (Odintsova *et al.*, 2009).

В пептидах WAMP аминокислотные остатки хитин-связывающего центра, который участвует в связывании углеводов клеточной стенки грибов, заслуживают особого внимания. У всех изученных хитин-связывающих белков в этом сайте находятся несколько консервативных остатков: серин в 19 положении, два остатка глицина в положениях 22 и 25 и 3 ароматических аминокислотных остатка в положениях 21, 23 и 30 (нумерация приведена по аминокислотной последовательности гевеина). В пептидах WAMP консервативный остаток серина замещен на глицин. Однако несмотря на эту замену, пептиды WAMP обладают способностью связываться с хитином в системе *in vitro* (Odintsova *et al.*, 2009). Функциональную значимость этой замены еще предстоит выяснить.

Методами спектроскопии ЯМР была установлена пространственная структура пептида WAMP-1a (Dubovskii *et al*., 2011). Пептид представляет собой компактную глобулу, состоящую из четырех антипараллельных тяжей β-структуры, одного участка спирали 3_{10} и участка α-спирали. Структура стабилизирована 5 дисульфидными и 20 водородными связями. Расположение дисульфидных связей следующее: Cys4-Cys19, Cys13-Cys25, Cys18-Cys32, Cys37-Cys41. Дополнительная, пятая, дисульфидная связь образована Cys16 и Cys44. Замена серина на глицин в хитин-связывающем сайте увеличивает амфифильность молекулы, с которой, по всей видимости, и связана биологическая активность пептида, – способность ингибировать рост патогенов, содержащих и не содержащих хитин в клеточной стенке (см. ниже). Обращает на себя внимание сходство пространственной структуры пептида WAMP, включая расположение дисульфидных связей, с хитин-связывающим доменом хитиназ класса 1 злаковых. Эти данные свидетельствуют в пользу происхождения пептида WAMP-1a из

```
WAMP-la   AQRCGDQARGAKCPNCLCCGKYGECGSGDAYCGAG-SCQSQCRGC(R)
ChtBD     -EQCGSQAGGATCPNCLCCSKFGFCGTTSDYCGTG--CQSQCNGC
Ee-CBP    -QQCGRQAGNRRCANNLCCSQYGYCGRTNEYCCTSQGCQSQCRRCG
Гевеин    -EQCGRQAGGKLCPNNLCCSQWGWCGSTDEYCSPDHNCQSNCKD
Ar-AMP    AGECV-Q--G-RCPSGMCCSQFGYCGRGPKYCGR
Ac-AMPl   VGECVR---G-RCPSGMCCSQFGYCGKGPKYCG(R)
                          * * * *    *
```

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей пептида WAMP-1a с гевеиноподобными АМП растений и хитин-связывающим доменом хитиназы класса I.

Пропуски введены для достижения максимальной гомологии. Консервативные остатки цистеина выделены черными столбцами. Звездочками отмечены консервативные остатки хитин-связывающего сайта. Остаток глицина, заменяющий консервативный остаток серина в хитин-связывающем сайте пептида WAMP-1a, выделен серым. В скобках указан номер в GenBank для хитин-связывающего домена хитиназы класса 1 пшеницы *Triticum aestivum* (AAR11388), гевеина *Hevea brasiliensis* (P02877) и гевеиноподобных пептидов WAMP-1a *Triticum kiharae* (P85966), Ee-CBP *Euonymus europaeus* (AAP35270), Ar-AMP *Amaranthus retroflexus* (Q512B2) и Ac-AMP1 *Amaranthus caudatus* (P27275). Остаток аргинина, указанный в скобках, присутствует в пептидах WAMP-1b и Ac-AMP1 соответственно.

гена хитиназ класса 1 путем потери области каталитического домена.

Для того чтобы получить достаточное количество пептида WAMP-1a для функциональных исследований, была проведена гетерологическая экспрессия синтетического гена этого пептида в клетках *E. coli* (Odintsova *et al.*, 2009). Целевой пептид экспрессировали в составе гибридного белка с тиоредоксином, который обеспечивает правильный фолдинг и правильное замыкание дисульфидных связей рекомбинантных белков. Кроме того, он снимает токсическое действие АМП на клетки прокариот, в которых осуществляется гетерологическая экспрессия. При использовании данных по аминокислотной последовательности пептида WAMP-1a из синтетических олигонуклеотидов был сконструирован ген, кодирующий этот пептид, методом полимеразной цепной реакции (Odintsova *et al.*, 2009). Полученный ген был клонирован в экспрессионный вектор pET-32b, и образовавшаяся плазмида (pET-32-M-WAMP-1a) была использована для трансформации клеток *E. coli* BL21(DE3). Выход очищенного рекомбинантного пептида WAMP-1a составил около 8 мг/л культуры.

Определение биологической активности рекомбинантного пептида WAMP-1a в отношении ряда грибов, включая дейтеромицеты и аскомицеты, выявило существенное ингибирование прорастания спор при микромолярных концентрациях пептида. IC_{50} варьировала от 5 до 30 мкг/мл в зависимости от вида гриба (Odintsova *et al.*, 2009).

Наибольшей ингибирующей активностью пептид обладал по отношению к *F. solani*, *F. oxysporum* и *H. sativum*: IC_{50} для этих грибов составляла всего 5 мкМ. Помимо ингибирования прорастания спор грибов, исследовали также морфологические изменения, индуцированные пептидом. Под действием пептида WAMP-1a у гриба *F. oxysporum* наблюдались ингибирование роста и потемнение гиф. У *H. sativum* наблюдались разрушение и обесцвечивание спор. Изучали также влияние пептида WAMP-1a на развитие заболевания, вызванного оомицетом *Ph. infestans*. Оказалось, что пептид стабильно ингибирует развитие заболевания в течение 120 ч наблюдений. Пептид также протестировали на способность ингибировать рост фитопатогенных грамположительных (*C. michiganense*) и грамотрицательных (*P. syringae* и *E. carotovora*) бактерий, и была выявлена антибактериальная активность пептида. В случае грамположительных бактерий эффект был более выражен. Антифунгальные свойства пептида WAMP-1a, по всей видимости, связаны с его хитин-связывающей активностью, в то время как активность в отношении оомицета *Ph. infestans* и бактерий, которые лишены хитина, обусловлена реализацией какого-то иного механизма (Odintsova *et al.*, 2009).

Следующий этап нашей работы – установление полной нуклеотидной последовательности мРНК, кодирующей пептид WAMP. Методом 3′- и 5′-RACE с использованием вырожденных праймеров, подобранных по аминокислотной последовательности пептида WAMP-1a, была определена последовательность двух кДНК, кодирующих пептид WAMP-1a и его близкий гомолог WAMP-2. Обе кДНК имеют сходную структуру и кодируют предшественники пептидов WAMP, состоящие из сигнального пептида, последовательности зрелого пептида и С-концевого продомена (Неопубл. данные).

Исследования экспрессии генов пептидов WAMP показали, что она усиливается в ответ на заражение патогенами, причем величина индукции зависит от вида патогена, что подтверждает гипотезу о защитной роли этих пептидов в пшенице (Неопубл. данные).

4-Cys пептиды

Из семян *T. kiharae* было выделено 2 новых АМП, названных Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2, содержащих по 4 остатка цистеина в молекуле (Egorov *et al.*, 2005). Их аминокислотные последовательности следующие (Неопубл. данные):

Tk-AMP-X1 [1]**T**DDRC<u>ERM</u>CQ**H**YHDRREKKQC<u>MK**G**</u>CRYGESD[31]
Tk-AMP-X2 [1]**A**DDRC<u>ERM</u>CQ**R**YHDRREKKQC<u>MK**G**</u>CRYG[28].

Как видно, остатки цистеина Cys1 и Cys2, как и Cys3 и Cys4, разделены между собой тремя аминокислотами. Было установлено, что дисульфидные связи в пептидах следующие: Cys5-Cys25 и Cys9-Cys21, где цифрами обозначен порядковый номер аминокислотного остатка в полипептидной цепи.

Для характеристики вторичной структуры выделенных пептидов были получены спектры кругового дихроизма в области поглощения амидного хромофора. Результаты расчета содержания элементов вторичной структуры пептидов по программе CONTIN показали, что в пептидах α-спираль составляет 59,9 и 46,6 % для Tk-AMP-X1 и X2 соответственно; β-изгиб – 9,7 и 17,7 % для Tk-AMP-X1 и X2 соответственно, остальное – неупорядоченная структура (30 и 35% для X1 и X2 соответственно). Таким образом, по результатам анализа спектра КД выделенные пептиды отнесены к α-спиральному типу молекул. Можно предположить, что пептиды Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X1 имеют структуру шпильки, в которой два α-спиральных участка расположены параллельно друг другу и «скреплены» двумя дисульфидными связями. Такую структуру имеет 4-Cys пептид дикорастущего злака – ежовника обыкновенного (Nolde *et al.*, 2011). Была исследована способность выделенных АМП ингибировать прорастание спор некоторых фитопатогенных грибов. Было установлено, что они ингибируют тестированные грибы в микромолярных концентрациях. Выявлены различия в ингибирующей активности между пептидами, несмотря на то что в аминокислотных последовательностях присутствуют лишь единичные замены.

Определение структуры полноразмерных кДНК, кодирующих пептиды Tk-AMP-X1 и Tk-AMP-X2, проводили путем комбинации методов 3′- и 5′-RACE. Были получены несколько последовательностей кДНК, которые по длине подразделялись на 2 класса, условно названные «длинные» и «короткие» кДНК (Неопубл. данные). «Длинные» кДНК кодируют 7 гомологичных 4-Cys пептидов, а «короткие» – 5. При этом общая структура этих кДНК одинакова. Они состоят из 5′-нетранслируемой области, области, кодирующей сигнальный пептид, области, кодирующей 4-Cys пептиды и 3′-нетранслируемой области. Таким образом, впервые была установлена модульная структура генов, кодирующих 4-Cys пептиды АМП пшеницы (рис. 2).

Анализ геномной ДНК показал, что в геноме пшеницы *T. kiharae*, помимо генов «длинных» и «коротких» предшественников, присутствуют и гены, кодирующие предшественники, содержащие 6 пептидов («средние» предшественники) (Неопубл. данные). Надо отметить, что предшественники этого типа не были получены при амплификации с кДНК зачатков семян. Это может быть связано с тем, что полипептиды такого типа не экспрессируются при созревании семян.

В целом «длинные» предшественники отличаются от «коротких» предшественников наличием двух дополнительных пептидных доменов (пятого и шестого), а от «средних» предшественников – наличием дополнительного, шестого, пептидного домена.

По гомологии аминокислотных последовательностей 4-Cys пептиды *T. kiharae*, кодируемые обнаруженными предшественниками, можно объединить в 7 групп, при этом гомология внутри групп очень высокая (70–100 %), а между группами низкая.

Для исследования роли 4-Cys пептидов в защите от патогенов изучали изменения экспрессии кодирующих их генов при заражении фитопатогенными грибами, а также при биотическом и абиотическом стрессе. Оказалось, что, как и в случае пептидов WAMP, экспрессия генов 4-Cys пептидов усиливается при заражении, при этом реакция на заражение также зависит от вида гриба. Абиотический стресс (повышенные температуры и солевой стресс) также активировали экспрессию этих генов. Эти данные свидетельствуют об участии пептидов этого семейства в ответных реакциях растений пшеницы на стресс.

Таким образом, полученные к настоящему времени данные свидетельствуют о структурном и функциональном разнообразии АМП и кодирующих их генов у пшеницы.

Настоящая работа поддержана грантами РФФИ № 09-04-00250-а и 11-04-00190-а, программой Президиума РАН «Генофонды и генетическое разнообразие», а также Государственным контрактом Минобрнауки № 16.512.11.2156.

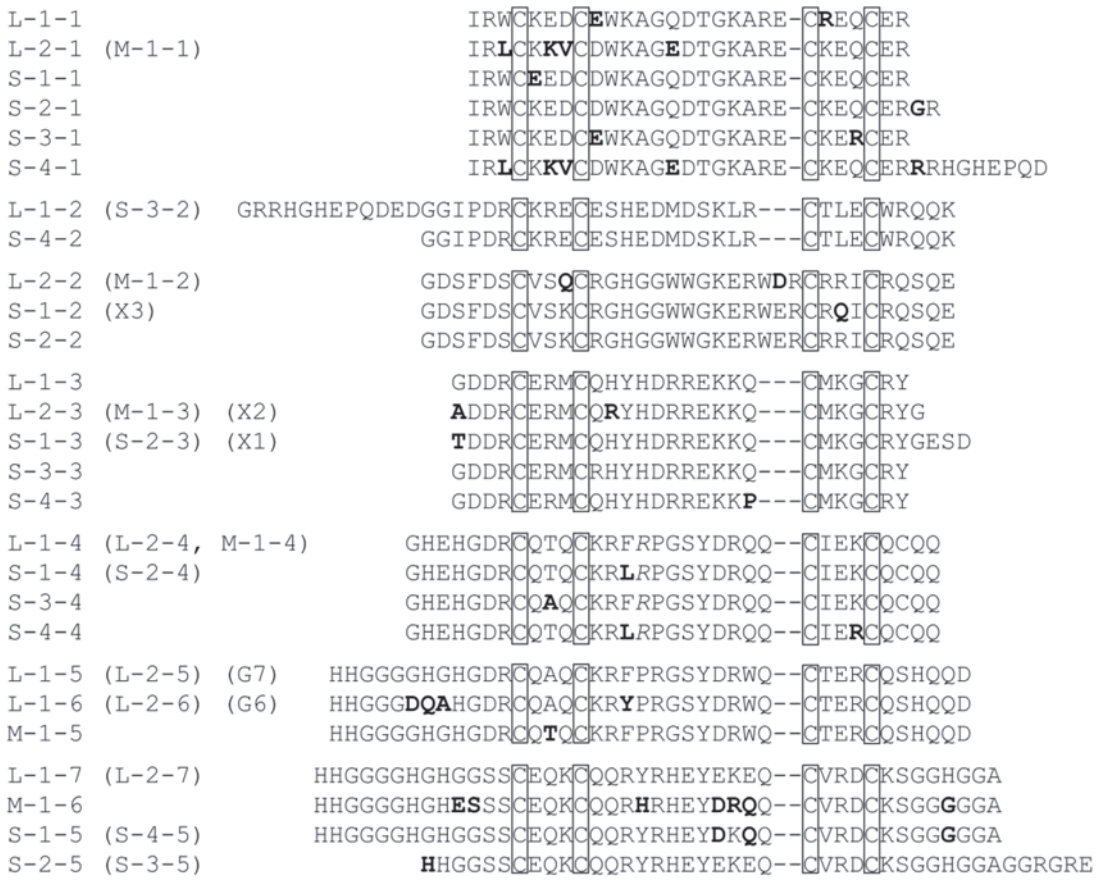


Рис. 2. Аминокислотные последовательности 4-Cys пептидов пшеницы.

Выравнивание выведенных аминокислотных последовательностей 4-Cys пептидов. S – «короткие» предшественники, L – «длинные» предшественники, M – «средние» предшественники.

Литература

Ajesh K., Sreejith K. Peptide antibiotics: an alternative and antimicrobial strategy to circumvent fungal infections // Peptides. 2009. V. 30. P. 999–1006.

Benko-Iseppon A.M., Galdino S.L., Calsa T. Jr. *et al.* Overview on plant antimicrobial peptides // Curr. Protein Pept. Sci. 2010. V. 11. P. 181–188.

Broekaert W.F., Cammue B.P.A., De Bolle M.F.C. *et al.* Antimicrobial peptides from plants // Crit. Rev. Plant Sci. 1997. V. 16. P. 297–323.

Bulet P., Hetru C., Dimarcq J.L., Hoffmann D. Antimicrobial peptides in insects, structure and function // Dev. Comp. Immunol. 1999. V. 23. No 4/5. P. 329–44.

Castro M.S., Fontes W. Plant defense and antimicrobial peptides // Protein Pept. 2005. V. 12. P. 13–18.

da Rocha Pitta M.G., da Rocha Pitta M.G., Galdino S.L. Development of novel therapeutic drugs in humans from plant antimicrobial peptides // Curr. Protein Pept. Sci. 2010. V. 11. P. 236–247.

Dubovskii P.V., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. *et al.* Solution structure of a defense peptide from wheat with a 10-cysteine motif // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 411. No 1. P. 14–18.

Egorov T.A., Odintsova T.I., Pukhalsky V.A., Grishin E.V. Diversity of wheat antimicrobial peptides // Peptides. 2005. V. 26. P. 2064–2073.

Gao G.H., Liu W., Dai J.X. *et al.* Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana* // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 10973–10978.

Garcia-Olmedo F., Molina A., Alamillo J.M., Rodriguez-Palenzuela P. Plant defense peptides // Biopolymers (Peptide Sci.). 1998. V. 47. P. 479–491.

Garcia-Olmedo F., Rodriguez-Palenzuela P., Molina A. *et al.* Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defence // FEBS Letters. 2001. V. 498. P. 219–222.

Farrokhi N., Whitelegge J.P., Brusslan J.A. Plant peptides and peptidomics // Plant Biotechnol. J. 2008. V. 6. P. 105–134.

Huang R-H., Xiang Y., Liu X-Z. *et al.* Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv // FEBS Lett. 2002. V. 521. P. 87–90.

Kido E.A., Pandolfi V., Houllou-Kido L.M. *et al.* Plant antimicrobial peptides: an overview of SuperSAGE transcriptional profile and a functional review // Curr. Protein Pept.

Sci. 2010. V. 11. P. 220–230.
Koike M., Okamoto T., Tsuda S., Imai R. A novel plant defensin-like gene of winter wheat is specifically induced during cold acclimation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 298. P. 46–53.
Lobo D.S., Pereira I.B., Fragel-Madeira L. *et al*. Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle // Biochemistry. 2007. V. 46. P. 987–996.
Manners J.M. Hidden weapons of microbial destruction in plant genomes // Genome Biol. 2007. V. 8. P. 225–234.
Nolde S.B., Vassilevski A.A., Rogozhin E.A. *et al.* Disulfide-stabilized helical hairpin structure of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*) // J. Biol. Chem. 2011. V. 286. No 28. P. 25145–25153.
Odintsova T.I., Egorov Ts.A., Musolyamov A.Kh. *et al.* Seed defensins from *T. kiharae* and related species: genome localization of defensin-encoding genes // Biochimie. 2007. V. 89. P. 605–612.
Odintsova T.I., Vassilevski A.A., Slavokhotova A.A. *et al.* A novel antifungal hevein-type peptide from *Triticum kiharae* seeds with a unique 10-cysteine motif // FEBS J. 2009. V. 276. P. 4266–4275.
Padovan L., Scocchi M., Tossi A. Structural aspects of plant antimicrobial peptides // Curr. Protein Pept. Sci. 2010. V. 11. P. 210–219.
Sels J., Mathys J., De Coninck B.M. *et al.* Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides // Plant Physiol. Biochem. 2008. V. 46. P. 941–950.
Tavares L.S., de Santos M., Viccini L.F. *et al.* Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers // Peptides. 2008. V. 29. P. 1842–1851.
Van den Bergh K.P.B., Proost P., Van Damme J. *et al.* Five disulfide bridges stabilize a hevein-type antimicrobial peptide from the bark of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) // FEBS Letters. 2002. V. 530. P. 181–185.
Van der Weerden N.L., Lay F.T., Anderson M.A. The plant defensin, NaD1, enters the cytoplasm of *Fusarium oxysporum* hyphae // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 14445–14452.
Vasil I.K. Molecular genetic improvement of cereals: transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Cell Rep. 2007. V. 26. P. 1133–1154.

WHEAT ANTIMICROBIAL PEPTIDES

T.I. Odintsova[1], T.V. Korostyleva[1], L.L. Utkina[2], Ya.A. Andreev[2], A.A. Slavokhotova[1], E.A. Istomina[1], V.A. Pukhal'skii[1], T.A. Egorov[2]

[1] Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: odintsova2005@rambler.ru;
[2] Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Summary

Antimicrobial peptides (AMPs) are low-molecular-weight defense polypeptides, produced in all living organisms either constitutively or upon perception of signals from pathogenic microorganisms. They are important components of the immune system in both animals and plants. AMPs differ in structure and mode of action. Most of them belong to cysteine-rich peptides; their molecules contain even numbers of cysteine residues involved in the formation of disulphide bonds, which stabilize the peptide structure. A number of families of plant AMPs have been isolated on the base of amino acid sequence similarity and 3D structure. Plant AMP genes can be used in the engineering of pest resistance in crops and development of novel antibiotics and antimycotics. We provide a concise review of properties and gene structures of major AMP families discovered by the authors in *Triticum kiharae* seeds, including glycine-rich peptides, defensins, hevein-like peptides and the so-called 4-Cys peptides.

Key words: wheat, *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch., antimicrobial peptides, amino acid sequencing, 3′- and 5′-RACE method, plant immunity, regulation of gene expression.

УДК 577.21:633.111.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ В ВИДАХ *AEGILOPS* L., СИНТЕТИЧЕСКИХ ФОРМАХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЯХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Э.Р. Давоян, Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, О.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, А.Н. Зинченко, А.М. Кравченко**

Краснодарский НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия,
e-mail: davayan@rambler.ru

Поступила в редакцию 11 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

С помощью диагностических молекулярных маркеров, сцепленных с известными генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*, был проведен скрининг образцов ДНК диких сородичей, синтетических форм и интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Ген *Lr9* был идентифицирован в геноме образцов вида *Aegilops umbellulata*, гены *Lr35* и *Lr47* – в *Ae. speltoides*. В синтетических формах Авролата и Авродес с замещением генома D пшеницы на геномы *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides* соответственно выявлены гены *Lr9* и *Lr35*. В геноме интрогрессивных линий, созданных с участием *Ae. umbellulata*, ген *Lr9* не идентифицирован. Присутствие гена *Lr35* установлено в одной линии, созданной на основе Авродес. Предполагается, что часть образцов диких видов и интрогрессивных линий имеет дополнительные гены устойчивости к листовой ржавчине.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Aegilops speltoides*, *Ae. umbellulata*, гены устойчивости к листовой ржавчине, синтетические формы, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, молекулярные маркеры.

Введение

Листовая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) является одной из самых распространенных и вредоносных болезней пшеницы. Поражение посевов приводит к значительным потерям урожая и снижению качества зерна. Для защиты сортов традиционно используется отдаленная гибридизация, которая позволяет обогащать генофонд мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) за счет ее дикорастущих сородичей.

Богатейший запас генов устойчивости к болезням сосредоточен в эгилопсах (Bell, Lupton, 1955; Pasquini, 1980). Широкая адаптация в разных эколого-географических зонах делает этот род источником большого генетического разнообразия.

Ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* был интрогрессирован в геном гексаплоидной пшеницы из *Aegilops umbellulata* (Sears, 1956). В настоящее время известно о передаче генов *Lr35*, *Lr36*, *Lr47* и *Lr51* от вида *Ae. speltoides* (McIntosh *et al*., 2005).

Для передачи пшенице от диких сородичей генов устойчивости к болезням и других положительных признаков в лаборатории цитогенетики Краснодарского НИИСХ был разработан подход по перестройке генома мягкой пшеницы. Путем замещения генома твердой пшеницы на геномы AABB мягкой пшеницы был получен тетраплоидный компонент сорта Аврора (Жиров, Терновская, 1984). С использованием полученного тетракомпонента были созданы синтетические геномно-замещенные формы Авролата и Авродес, у которых геном D мягкой пшеницы был замещен соответственно геномом U вида *Ae. umbellulata* и геномом S *Ae. speltoides*. При использовании этих форм были получены интрогрессивные линии озимой мягкой пшеницы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, высоким содержанием

белка и другими интересными для селекции морфо-биологическими признаками.

Настоящая работа была проведена с целью скрининга образцов ДНК видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides*, синтетических форм Авролата и Авродес, полученных на их основе интрогрессивных линий мягкой пшеницы, на присутствие маркеров, сцепленных с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*.

Материалы и методы

Объектами исследований служили образцы вида *Ae. umbellulata* (коллекционные номера 571148, 577973, 583165, 1626, 1628, 1461, 1283, 816, 849, 44, 2306, 1588, 916 и 2244), образцы вида *Ae. speltoides* (коллекционные номера 1595, 2036, 2274, 2280, 2716, 2717, 3256, 1000, 2912, 3282, C4 и C5), синтетические формы мягкой пшеницы Авролата (BAU) и Авродес (BAS), 96 линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала от *Ae. umbellulata* и 30 линий с генетическим материалом *Ae. speltoides*. Все образцы видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides*, за исключением C4 и C5 из коллекции лаборатории, были получены из ВИР. Синтетические формы и созданные на их основе интрогрессивные линии были получены в лаборатории биотехнологии Краснодарского НИИСХ.

Для оценки на устойчивость к листовой ржавчине использовали шкалу Мейнса и Джексона (Mains, Jakson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции на заражение между 0 и 1 обозначались «01».

ДНК пшеницы выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков по методу Плашке с соавт. (Plaschke *et al*., 1995). Идентификацию генов *Lr* осуществляли с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими гены *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*. Праймеры отбирали на основании литературных данных, их нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1.

Условия амплификации были незначительно модифицированы (табл. 2). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с 0,5× буфером TBE. Концентрация геля варьировала от 1,5 до 2,3 % в зависимости от размера амплифицированного фрагмента. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса «INFINITI 1000». В качестве маркера

Таблица 1

Происхождение генов устойчивости к листовой ржавчине и характеристика праймеров, используемых для идентификации соответствующих генов

Ген	Источник гена	Праймеры		Литературный источник
		название	нуклеотидная последовательность	
Lr9	*Ae. umbellulata*	*FJ13/1* *RJ`13/2*	CCACACTACCCCAAAGAGACG TCCTTTTATTCCGCACGCCGG	Schachermayer *et al*., 1994
Lr35	*Ae. speltoides*	*BCD260F1* *35R2*	GAAGTTAAAGAGGTCTTGAC TTTTGAGAATCAGTCATCAC	Seyfarth *et al*., 1999
Lr47	« »	*PS10R* *PS10L*	GCTGATGACCCTGACCGGT TCTTCATGCCCGGTCGGGT	Dubcovsky *et al*., 2000

Таблица 2

Условия ПЦР с праймерами, используемыми для идентификации генов *Lr*

Ген	Условия амплификации фрагментов	Размер фрагмента п.н.
Lr9	94 °C 6 мин; 30 циклов (92 °C 30 с, 68 °C 30 с, 72 °C 60 с); 72 °C 5 мин	1100
Lr35	94 °C 3 мин; 35 циклов (94 °C 45 с, 60 °C 45 с, 72 °C 60 с); 72 °C 7 мин	900
Lr47	94 °C 5 мин; 35 циклов (94 °C 45 с, 61 °C 30 с, 72 °C 30 с); 72 °C 7 мин	282

молекулярной массы использовали ДНК-маркер М 24 100 п.н. «СибЭнзим».

В качестве положительных контролей для определения известных генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* (TcLr9) и *Lr35* (TcLr35). За положительный контроль для гена *Lr47* принимали ДНК образца *Ae. speltoides* 3256. В качестве отрицательного контроля использовали восприимчивый к листовой ржавчине сорт Аврора.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день известно более 70 генов устойчивости к листовой ржавчине, *Lr*, с установленной локализацией на хромосомах пшеницы (McIntosh *et al*., 2005). Традиционные методы определения генов трудоемки и требуют больших затрат времени, однако известные гены *Lr* можно идентифицировать с помощью молекулярных маркеров, таких, как STS (sequence-tagged site), SCAR (sequence characterized amplified regions), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) или SSR (simple sequence repeat) (Урбанович и др., 2006). Использование ДНК-маркеров позволяет быстро и точно определять нужные генотипы растений.

Исходя из родословных полученных нами интрогрессивных линий можно сделать вывод о том, что они могут содержать известные гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* от *Ae. umbellulata* и *Lr35*, *Lr47* от *Ae. speltoides.* В связи с этим был проведен ПЦР-скрининг линий с помощью ДНК-маркеров, сцепленных с указанными выше генами. Предварительно анализировались доноры генов *Lr9*, *Lr35* и *Lr47* – образцы видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides*, а также синтетические формы Авролата и Авродес, на базе которых были созданы интрогрессивные линии.

На сегодняшний день ген *Lr9* пока является единственным известным геном устойчивости к листовой ржавчине, переданным в мягкую пшеницу от *Ae. umbellulata.* Данный ген является высокоэффективным в некоторых странах Европы, в том числе и в России (Zhemchuzina, Kurkova, 2010). Молекулярный маркер, сцепленный с *Lr9*, находится на расстоянии 8 сМ от гена; длина соответствующего ему фрагмента амплификации составляет 1100 п.н. (Schachermayer *et al*., 1994).

ДНК 12 иммунных к листовой ржавчине (тип реакции 0) образцов *Ae. umbellulata* анализировали с помощью маркера, сцепленного с геном *Lr9*. ПЦР-анализ показал присутствие характерного фрагмента амплификации во всех исследуемых образцах (рис. 1).

Выбранный маркер позволил выявлять характерный фрагмент амплификации в геномнозамещенной форме Авролата, служившей мостиком для передачи генетического материала от *Ae. umbellulata* в пшеницу (рис. 2).

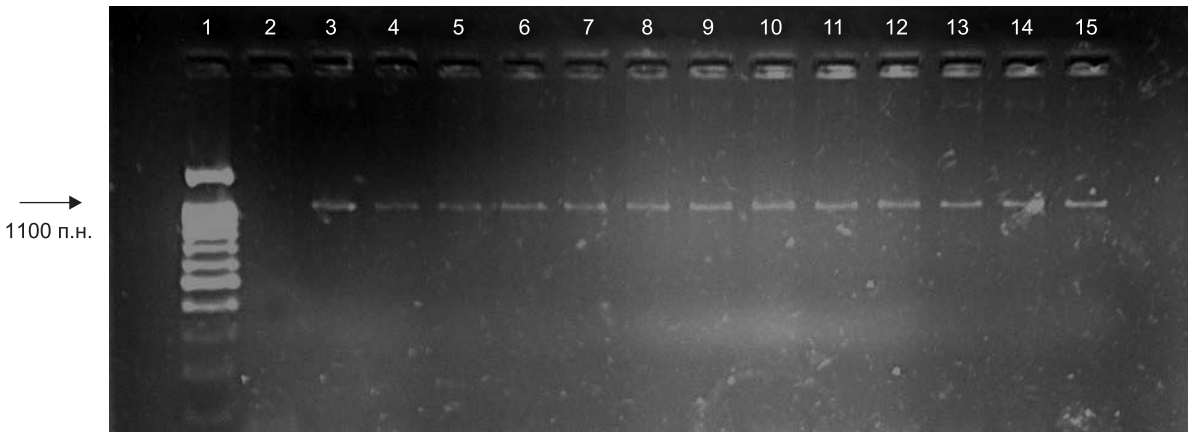


Рис. 1. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *FJ13/1* и *RJ13/2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr*9.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – линия TcLr9; 4–15 – образцы вида *Ae. umbellulata.*

Интрогресивные линии с генетическим материалом *Ae. umbellulata* были созданы путем скрещивания геномно-замещенной формы Авролата с исходным сортом пшеницы Аврора (Давоян и др., 2004). Для идентификации маркера, сцепленного с *Lr9*, были отобраны 96 линий. Все линии были устойчивы к листовой ржавчине, тип реакции некоторых из них представлен в табл. 3. В 96 проанализированных линиях маркера, сцепленного с геном *Lr9*, выявлено не было (рис. 2).

ДНК 12 иммунных к листовой ржавчине (тип реакции: 0) образцов диких видов *Ae. speltoides* различных эколого-географических групп анализировали с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и

Таблица 3

Устойчивость к листовой ржавчине линий с генетическим материалом *Ae. umbellulata*

Название линии	Тип реакции устойчивости к листовой ржавчине
Д581	2
Д597	2
Д603	2
Д611	2
Д617	1
Д625	1
Д627	01
Д631	1

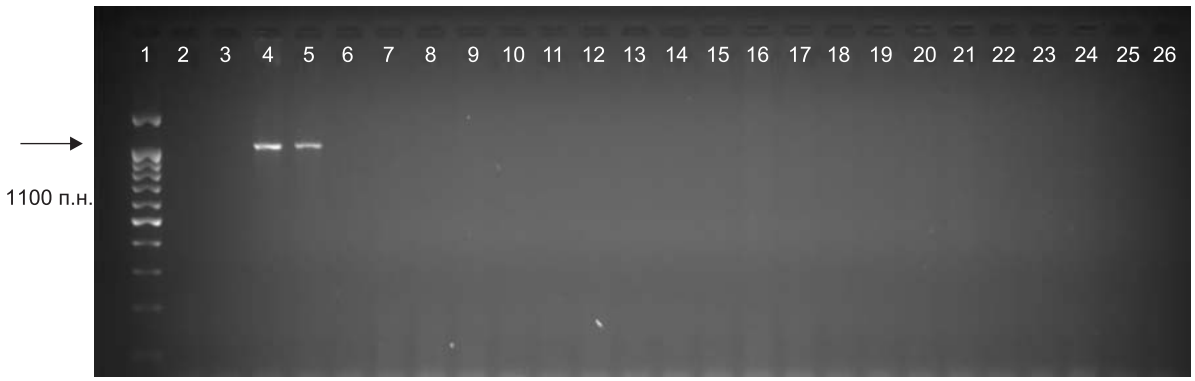


Рис. 2. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *FJ13/1* и *RJ13/2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr*9.

1 – маркер длины; 2 – Кавказ; 3 – Аврора; 4 – линия TcLr9; 5 – Авролата; 6–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. umbellulata*.

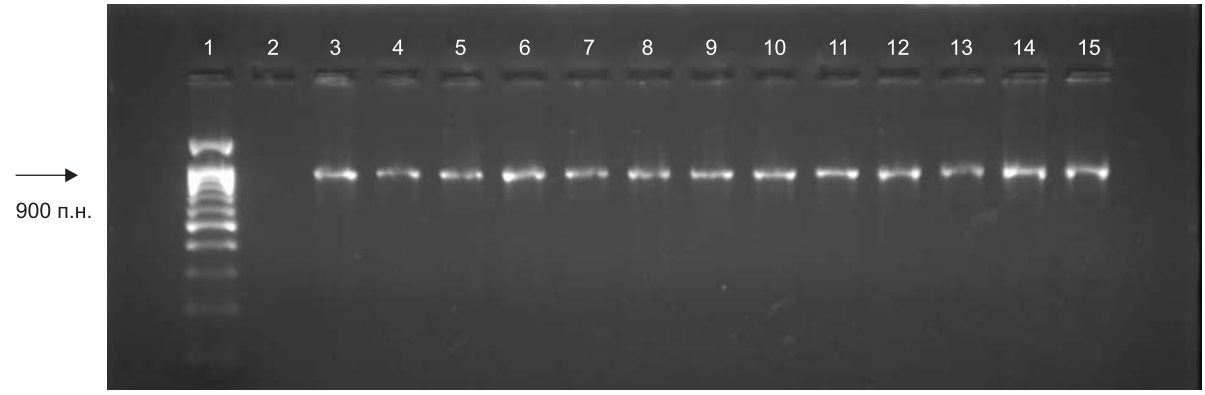


Рис. 3. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *BCD260F1* и *35R2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr35*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора, 3 – линия TcLr35; 4–15 – образцы вида *Ae. speltoides*.

Lr47. Ген *Lr35* идентифицировали во всех 12 исследуемых образцах (рис. 3). Наличие маркера, сцепленного с геном *Lr47*, было выявлено в образцах 3256 и 1000 (рис. 4).

Передача генетического материала из *Ae. speltoides* в линии пшеницы осуществлялась с помощью синтетической формы Авродес. В ДНК данной формы был выявлен маркер, сцепленный с геном *Lr35* (рис. 5), однако не был идентифицирован маркер, сцепленный с геном *Lr47* (рис. 6).

Для идентификации маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и *Lr47*, было отобрано 30 устойчивых к листовой ржавчине линий. Характеристи-

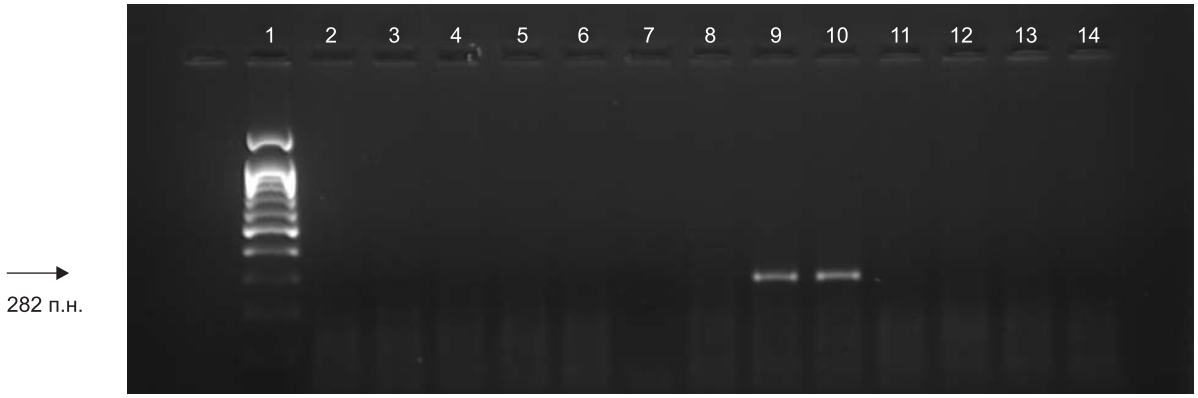


Рис. 4. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *PS10R* и *PS10L* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr47*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора, 3–14 – образцы вида *Ae. speltoides* (9 – образец 3256; 10 – образец 1000).

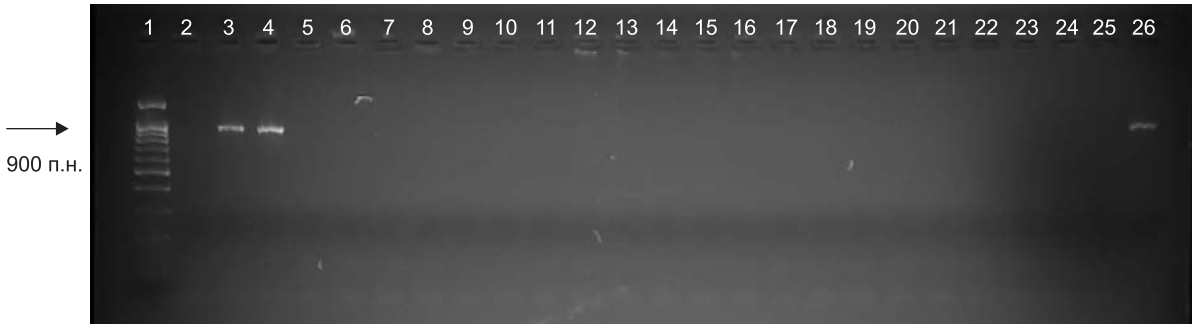


Рис. 5. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *BCD260F1* и *35R2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости *Lr35*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – линия TcLr35; 4 – Авродес; 5–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* (26 – линия Р771).

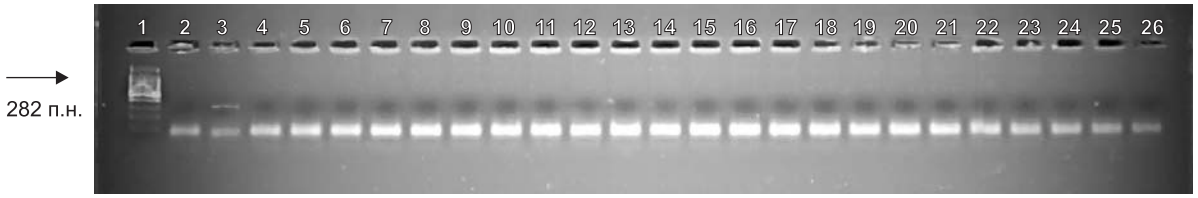


Рис. 6. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *PS10R* и *PS10L* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости *Lr47*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – образец № 3256; 4 – Авродес; 5–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Таблица 4

Устойчивость к листовой ржавчине линий с генетическим материалом *Ae. speltoides*

Название линии	Тип реакции устойчивости к листовой ржавчине
Р661	01
Р742	2
Р757	01
Р760	01
Р771	01
Р773	1
Р785	1
Р803	2

ка устойчивости некоторых из них представлена в табл. 4. Присутствие гена *Lr35* установлено в линии Р771, созданной на основе Авродес (рис. 5). ПЦР-анализ с праймерами к локусу, сцепленному с геном *Lr47*, не идентифицировал характерный фрагмент амплификации ни в одной из линий (рис. 6).

Отобранные нами для исследования образцы диких сородичей являются ценными источниками устойчивости к листовой ржавчине. Ген *Lr9* был идентифицирован в геноме образцов вида *Ae. umbellulata*, *Lr35* и *Lr47 – Ae. speltoides.*

В ДНК синтетических форм Авролата и Авродес, служивших генетическим мостиком для передачи ценных признаков в интрогрессивные линии, выявлены гены *Lr9* и *Lr35* соответственно. Маркер, сцепленный с геном *Lr47*, не был выявлен в ДНК синтетической формы Авродес, возможно, это связано с тем, что образец *Ae. speltoides*, использовавшийся для получения синтетика, не несет данный ген.

Высокоэффективный ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, переданный от *Ae. umbellulata*, не был выявлен в анализируемых, устойчивых к болезни, линиях, полученных на основе синтетика Авролата. Можно предположить, что данные линии несут новый(е) ген(ы) устойчивости к листовой ржавчине.

Присутствие гена *Lr35* установлено в линии Р771, созданной на основе формы Авродес. В остальных линиях с генетическим материалом *Ae. speltoides* маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и *Lr47*, не выявлено. В дальнейшем планируется анализ данных линий на присутствие известных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr36* и *Lr51*.

Не стоит исключать возможности потери маркеров, сцепленных с генами *Lr9*, *Lr35*, и *Lr47*, при рекомбинациях в процессе беккроссирования и самоопылений. Данная работа требует продолжения, в частности проведения фитопатологического теста, а также цитогенетического исследования передачи генетического материала от *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides* в созданные интрогрессивные линии. Вместе с тем изучаемый нами материал является ценным источником для селекции пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-96542).

Литература

Давоян Р.О., Бебякина И.В., Кекало Н.Ю. Получение и изучение замещенных по геному D линий мягкой пшеницы с хромосомами *Ae. umbellulata* // Наука Кубани. 2004. № 3. Ч. I. С. 48–51.

Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. наук. 1984. № 10. С. 58–66.

Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 675–683.

Bell D.G., Lupton F.G.H.Investigation of the Triticinae. Disease reactions species of *Triticum* and *Aegilops* and amphiploids between them // Can. J. Genet. Cytol. 1955. V. 5. P. 83–88.

Dubcovsky J., Helguera M., Khan I.A. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47* // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 625–631.

Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. P. 89–120.

McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat: Supplement // Ann. Wheat Newslett. 2005. V. 51. P. 251–285.

Pasquini M. Disease resistance in wheat. Behavior of Aegilops species with respect to *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*, and *Erusiphe gramines* f. sp. *tritici* // Genet. Agric. 1980. V. 34. P. 133–148.

Plaschke J., Ganal M.W., Roder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1001–1007.

Schachermayer G., Siedler H., Gale M.D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leafrust resistance gene of wheat // Theor. Appl. Genet. 1994.

V. 88. P. 110–115.
Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayer G. *et al*. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99. P. 554–560.
Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat // Brookhaven Symp. Biol. 1956. V. 9. P. 1–20.
Zhemchuzina A., Kurkova N. Structure of population of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006–2008 // Abstr. of 8th Intern. Wheat Conf. 1–4 June 2010. St. Petersburg, Russia. P. 279.

IDENTIFICATION OF LEAF RUST RESISTANCE GENES IN SPECIES OF *AEGILOPS* L., SYNTHETIC FORMS, AND INTROGRESSION LINES OF COMMON WHEAT

E.R. Davoyan, R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan, Yu.S. Zubanova, A.M. Kravchenko, A.N. Zinchenko

Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia,
e-mail: davayan@rambler.ru

Summary

DNA samples of wild relatives, synthetic forms and introgression lines of common wheat (*Triticum aestivum* L.) have been genotyped with diagnostic molecular markers linked to known leaf rust resistance genes *Lr9*, *Lr35* and *Lr47*. The *Lr9* gene is present identified in *Aegilops umbellulata*, and *Lr35* and *Lr47*, in *Ae. speltoides*. The synthetic forms Avrolata and Avrodes, with the substitution of the genomes of *Ae. umbellulata* and *Ae. speltoides*, respectively, for the wheat D-genome, possess *Lr9* and *Lr35* genes. The genomes of the introgression lines developed using *Ae. umbellulata* lack *Lr9*. The *Lr35* gene is present in one of the introgression lines derived from Avrodes. Some of the wild relatives and the introgression lines are suggested to have additional leaf rust resistance genes.

Key words: *Triticum aestivum*, *Aegilops speltoides*, *Aegilops umbellulata*, leaf rust resistance genes, synthetic, common wheat introgression lines, molecular markers.

УДК 632.938+[633.11:632.4]

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНОВ ВОЗРАСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ *Lr22b*, *Lr34*, *Lr37* В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА ИХ ДЕЙСТВИЯ

© 2012 г. **Л.Я. Плотникова, Т.Ю. Штубей**

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия,
e-mail lplotnikova@rambler.ru

Поступила в редакцию 18 ноября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Эффективность генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине изучали на юге Западной Сибири с использованием сорта Тэтчер (Tc), несущего ген *Lr22b*, и его почти изогенных линий *TcLr34* и *TcLr37*. Ген *Lr22b* был неэффективен, *Lr34* снижал скорость развития болезни при среднесуточной температуре ниже 16 ºС, но был мало эффективен при температуре выше 20 ºС. Ген *Lr37* обеспечивал высокую защиту от болезни независимо от внешних условий. На стадии колошения линии *TcLr34* и *TcL37* проявляли сходные компоненты частичной устойчивости: уменьшение количества и размеров пустул, подавление размножения гриба. Цитологические исследования показали, что на обеих линиях было частично подавлено образование структур *Puccinia triticina* на поверхности и в тканях (аппрессориев и гаусториев), но реакция сверхчувствительности (СВЧ) не проявлялась. Установлены механизмы устойчивости в форме окислительного взрыва при контакте аппрессориев с устьицами и каллозно-лигниновых отложений. Цвет автофлюоресценции лигнина отличался от свечения, характерного для взаимодействий, связанных с реакцией СВЧ. Гены *Lr34* и *Lr37* оказывали плейотропное действие на патогенез.

Ключевые слова: мягкая пшеница, бурая ржавчина, гены возрастной устойчивости, цитология, окислительный взрыв, каллоза, лигнин.

Введение

В Международном селекционном центре CIMMYT (Мексика) была разработана модель сортов с длительной устойчивостью к ржавчинным болезням. На этих сортах болезни развивались медленно, несмотря на восприимчивый тип реакции растений. Подобную устойчивость назвали частичной (partial) или устойчивостью по типу медленного развития (slow rusting). Parlevliet (1979) выделил компоненты частичной устойчивости, замедляющие развитие болезней и обеспечивающие длительную защиту сортов: уменьшение количества и размеров пятен болезни, увеличение латентного периода, подавление размножения патогенов. Сорта пшеницы, созданные в CIMMYT, сохраняли устойчивость к бурой ржавчине в различных регионах мира более 30 лет. Генетической основой сортов служили гены возрастной устойчивости *Lr13* и *Lr34*, дополненные 2–3 генами с аддитивным эффектом (Singh *et al*., 2003). Действие ряда генов возрастной устойчивости модифицируется условиями среды (Rubiales, Niks, 1995). В настоящее время сложилась парадоксальная ситуация: эмпирически подтверждена высокая эффективность сортов с частичной устойчивостью, но нет полной информации о механизмах действия их генов.

Эффективность генов возрастной устойчивости *Lr22b*, *Lr34* и *Lr37* против западносибирской популяции возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. до настоящего времени не изучалась. На цитологическом уровне проявление генов *Lr22b* и *Lr34* исследовано на примере взаимодействия с одним изолятом *P. triticina* (Rubiales, Niks, 1995), а действие гена *Lr37* не анализировалось. В связи с этим

задачами работы были оценка эффективности генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr22b*, *Lr34* и *Lr37* в Западной Сибири и выявление цитофизиологических аспектов их действия.

Материалы и методы

Объектами исследований служили образцы яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.: сорт Тэтчер (Тс) с геном возрастной устойчивости *Lr22b*, его почти изогенные линии Тс*Lr34* и Тс*Lr37* и восприимчивый сорт Саратовская 29 (контроль).

Развитие бурой ржавчины пшеницы в полевых условиях изучали на естественном инфекционном фоне на юге Западной Сибири (Омская область). В статье приведены данные о влиянии генов на развитие эпидемий 2005, 2006 и 2007 гг. Развитие болезни изучали с момента появления пустул (июль) до отмирания листьев (август). Тип реакции растений на заражение определяли по 5-балльной шкале: 0 – отсутствие симптомов болезни или мелкие некротические пятна; 1 – микроскопические пустулы, окруженные зоной некроза; 2 – мелкие пустулы, окруженные широкой зоной некроза; 3 – пустулы среднего размера, окруженные хлоротической тканью; 4 – крупные пустулы (Mains, Jackson, 1926). К устойчивым относят растения с типом реакции 0–2, к восприимчивым – 3–4 балла. Степень поражения оценивали в процентах по шкале Петерсона (Peterson *et al*., 1948). Учеты проводили в динамике с интервалом 5 сут. Для каждого варианта опыта оценивали степень поражения 15 растений. Для построения кривых развития болезни использовали средние значения по вариантам.

Цитологические исследования проводили на растениях в фазе колошения, выращенных в почве при оптимальной для проявления генов температуре 15–18 ºС. Флаговые листья срезали, укладывали в чашки Петри и заражали суспензией инокулюма моноспорового изолята 77 расы *P. triticina*, к которому растения были восприимчивы в стадии проростков (балл 4). Для поддержания жизнеспособности инфицированных листьев использовали 0,004 %-й раствор бензимидазола (Михайлова, Квитко, 1970). Развитие инфекционных структур гриба на поверхности и в тканях изучали с помощью модифицированного лактофенольного метода. Материал окрашивали 1 %-м красителем анилиновым синим в лактофеноле, затем дифференцировали окраску в насыщенном водном растворе хлоралгидрата (Плотникова, Мешкова, 2009). Структуры гриба окрашивались в синий цвет; неповрежденные клетки растений – в светло-голубой, погибшие в результате реакции сверхчувствительности (СВЧ) – в темно-синий. Для выявления окислительного взрыва через 12 ч после инокуляции проводили витальную окраску инфицированных листьев 0,1 %-м водным раствором нитросинего тетразолия. В присутствии супероксид-аниона O_2^- и дегидрогеназ образовывалось синее соединение, затем материал фиксировали в лактофеноле (Плотникова, Мешкова, 2009). Отложения каллозы на клеточных стенках выявляли с помощью окраски 1 %-м раствором кораллина в 4 %-м водном растворе Na_2CO_3. Каллоза окрашивалась в красный цвет. Автофлюоресценцию фенолов изучали с помощью люминесцентного микроскопа после промывки кусочков листьев 0,07 М калий-фосфатным буфером (pH 6,24). При исследованиях использовали возбуждающий светофильтр 340–420 нм и запирающий фильтр 530–640 нм (Плотникова, Мешкова, 2009). Лигнин в проводящих пучках и в зонах инфекции на листьях устойчивых растений имел зеленое свечение.

Взаимодействие изучали на пяти фиксированных листьях каждого образца. На поверхности листьев в сумме по варианту изучали формирование инфекционных структур, образованных 80–100 спорами, в тканях – развитие 25 колоний. Размеры колоний и пустул гриба определяли с помощью окуляр-микрометра, площадь вычисляли по формуле площади эллипса. Исследования проводили с помощью микроскопов: светового МБИ-15 и люминесцентного Люмам-5. Микрофотосъемку осуществляли цифровой фотокамерой Olympus SP-320 с разрешением 7 мегапикселей на дюйм.

Количество урединиоспор в пустулах определяли на листьях растений, выращенных в поле и лаборатории. Для этого на флаговых листьях подсчитывали количество пустул, споры стряхивали в пробирки, перемешивали с 0,5 мл водного раствора детергента Твин-80, подсчитывали число спор в суспензии с помощью

микроскопа и камеры Горяева, рассчитывали среднее количество спор в пустулах. Исследования проводили в 3 повторностях по 5 листьев в каждой. По всем данным рассчитывали средние показатели и ошибку средней.

Результаты

В лесостепной зоне Западной Сибири споры *P. triticina* погибают во время зимовки, поэтому развитие ржавчины на посевах пшеницы связано с заносом инфекции в июле–августе. В этот период растения проходят фазы развития от колошения до спелости. В 2005 и 2007 гг. сложились благоприятные условия для развития эпидемий, в 2006 г. интенсивность болезни была ниже. Среднесуточные значения температуры в Омской области в годы наблюдений существенно варьировали: в 2005 и 2007 гг. они были значительно выше (19–20 ºС и 20–23 ºС соответственно) по сравнению с 2006 г. (14–16 ºС) (рис. 1, а). Сорт Саратовская 29 был восприимчив к болезни (4 балла), степень его поражения в 2005 и 2007 гг. достигла 100 %, а в 2006 г. – 65 %. Сорт Тэтчер и изогенные линии Тс*Lr34* и Тс*Lr37* проявляли восприимчивый тип реакции 3–4 балла в период «колошение – восковая спелость». Кривые развития болезни на сортах Тэтчер и Саратовская 29 в 2005–2006 гг. были сходны. В 2007 г. отмечено небольшое замедление развития болезни на сорте Тэтчер, но к концу наблюдений поражение двух сортов не различалось (рис. 1, б–г).

Таким образом, ген *Lr22b* на юге Западной Сибири был неэффективен. Линия Тс*Lr34* в жаркие сезоны 2005 и 2007 гг. была поражена ржавчиной в средней степени (45–55 %), а при умеренных температурах в 2006 г. – в слабой (10 %). Это свидетельствует о зависимости действия гена *Lr34* от температуры и снижении его эффективности при высокой температуре. Линия Тс*Lr37* показывала высокий уровень устойчивости к болезни (поражение 10–20 %) независимо от условий.

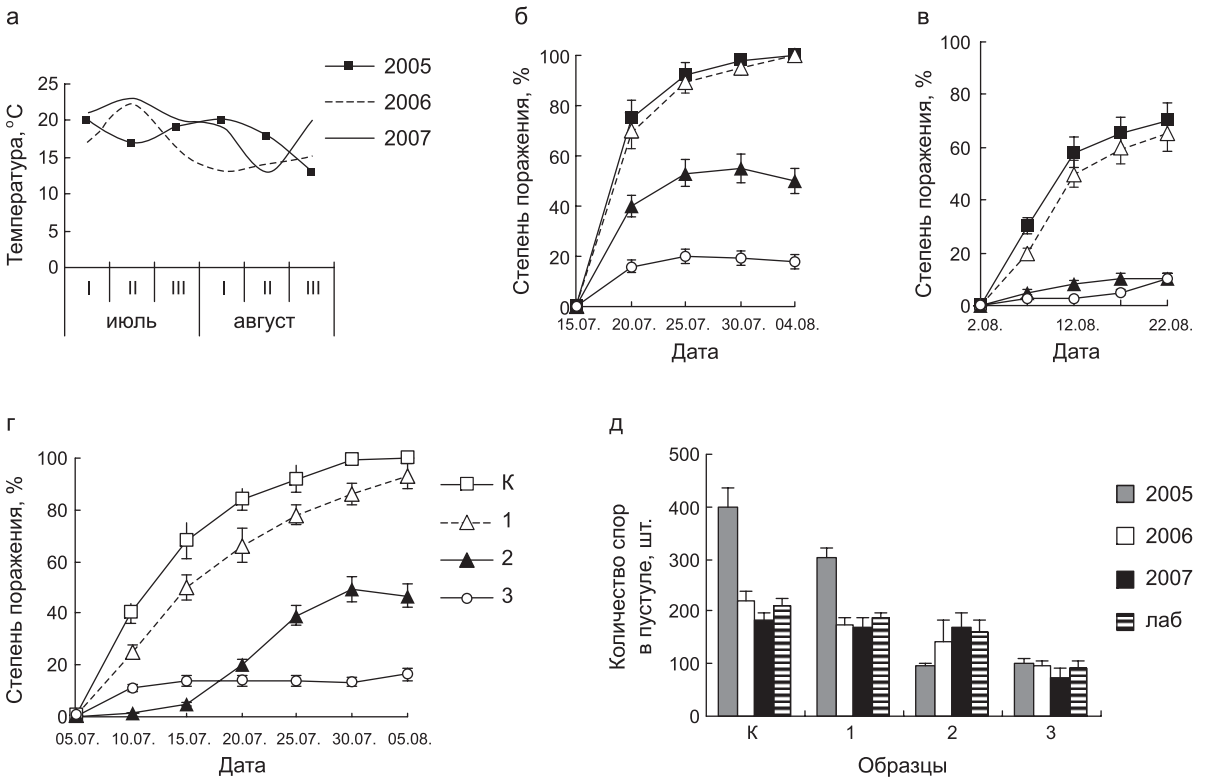


Рис. 1. Кривые развития бурой ржавчины и интенсивность образования спор в пустулах на сорте Тэтчер и его изогенных линиях с генами возрастной устойчивости в 2005–2007 гг.

а – среднесуточная температура воздуха; б–г – развитие болезни в 2005, 2006 и 2007 гг. соответственно; д – количество спор в пустулах на листьях образцов. К – Саратовская 29 (контроль), 1 – Тэтчер (*Lr22b*), 2 – Тс*Lr34*, 3 – Тс*Lr37*.

Скорость развития ржавчины в существенной степени зависит от репродуктивной способности патогена. Подсчет количества спор в пустулах на разных образцах показал, что на сорте Тэтчер в 2005 г. наблюдалось некоторое подавление спорогенеза, но в остальные годы и в лабораторных условиях этот факт не подтвердился. На линиях Тс*Lr34* и Тс*Lr37* спорогенез гриба был существенно подавлен по сравнению с восприимчивыми сортами (рис. 1, д).

Цитофизиологические особенности действия генов изучали на взрослых растениях, выращенных при оптимальной для проявления генов температуре 15–18 ºС. Для выявления механизмов возрастной устойчивости был использован изолят, к которому образцы были восприимчивы в стадии проростков (4 балла). Установлено, что взрослые растения также показали восприимчивую реакцию (3–4 балла). Пустулы появились на всех образцах через 9 сут после инокуляции, различий по длине латентного периода не установлено.

На листьях восприимчивых сортов Саратовская 29 и Тэтчер споры прорастали, образовывали ростковые трубки, часть из них (10–12 %) прекращали развитие, остальные формировали аппрессории на устьицах и подустьичные везикулы (ПУВ) (рис. 2, а). ПУВ дали начало инфекционным гифам, которые образовывали на концах материнские клетки гаусториев (МКГ) и гаустории для питания гриба в мезофилльных клетках. Все колонии сформировали пустулы. В тканях сорта Тэтчер отмечены некоторое угнетение формирования гаусториев через 3 сут после инокуляции и уменьшение размеров колоний на этапе спороношения, но достоверного снижения размеров пустул не установлено (рис. 2, б, в). В то же время на листьях линий Тс*Lr34* и Тс*Lr37* значительная доля инокулюма погибала (62–72 %). При этом на линии Тс*Lr34* гибель гриба на стадии ростковых трубок не отличалась от контроля, но 39 % инокулюма отмирало при контакте аппрессориев и ПУВ с замыкающими клетками устьиц, а 14 % – на стадии небольших (абортивных) колоний в ткани (рис. 2, а, 3, а). На поверхности листьев линии Тс*Lr37* формирование аппрессориев было интенсивно подавлено (в 3,5 раза по сравнению с контролем), 35 % инокулюма отмирало на стадиях аппрессориев и подустьичных везикул, но абортивных колоний было мало.

Средние размеры колоний и пустул в тканях устойчивых линий были существенно меньше, чем в контроле (в 4,0–5,3 и 10–13 раз соответственно) (рис. 2, в). В тканях линии Тс*Lr34* размеры колоний имели широкий размах варьирования – от крупных до маленьких абортивных (в 2–19 раз меньше контроля) (рис. 3, а, б). Характерным проявлением устойчивости было замедление формирования инфекционных

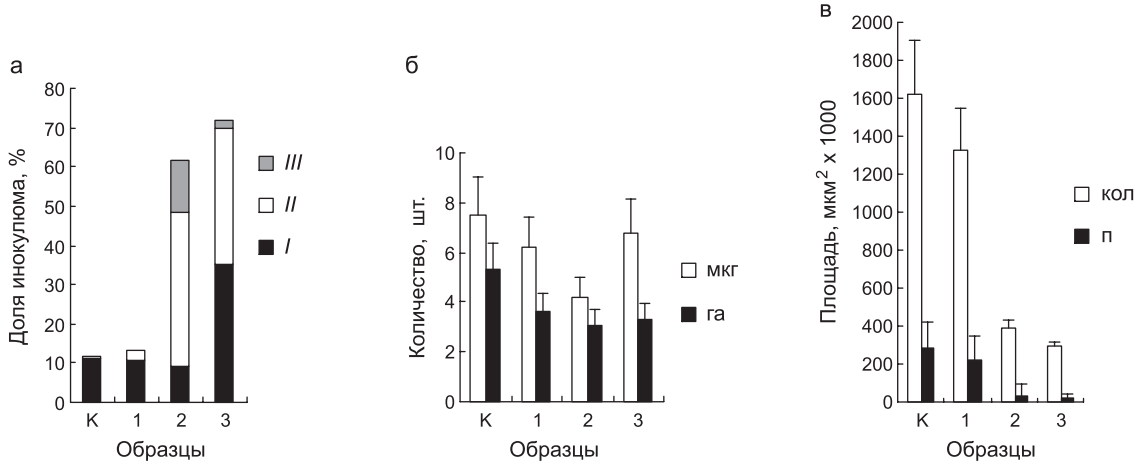


Рис. 2. Особенности взаимодействия *P. triticina* с сортом Тэтчер и изогенными линиями с генами возрастной устойчивости.

а – подавление развития на разных стадиях патогенеза: *I* – ростковые трубки без аппрессориев, *II* – аппрессории и подустьичные везикулы, погибшие на устьицах, *III* – абортивные колонии; б – инфекционные структуры в колониях гриба: мкг – материнские клетки гаусториев; га – гаустории; в – площадь колоний и пустул: кол – колонии, п – пустулы. К – Саратовская 29 (контроль), 1 – Тэтчер (*Lr22b*), 2 – Тс*Lr34*, 3 – Тс*Lr37*.

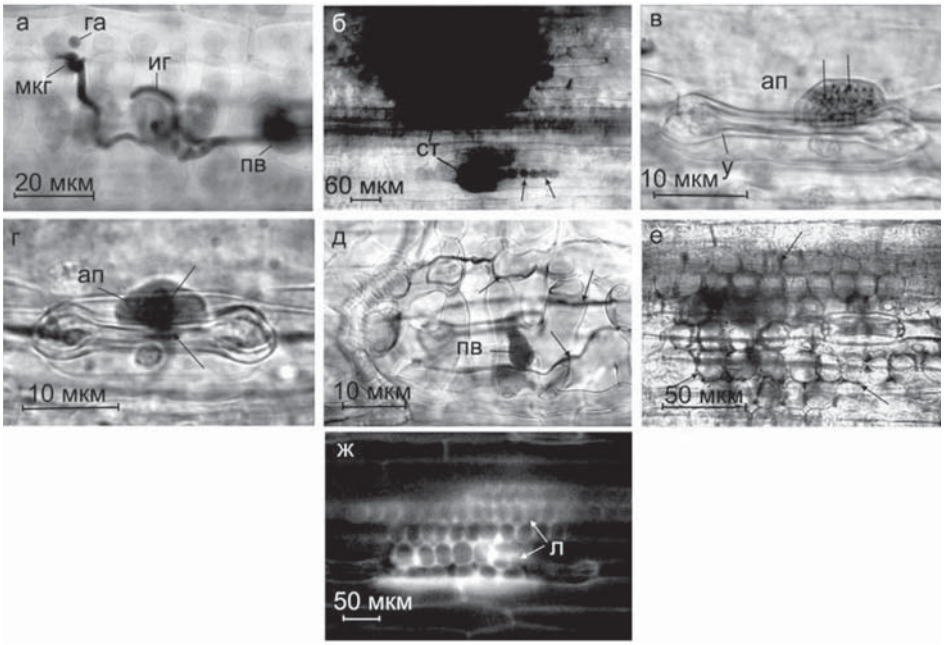


Рис. 3. Цитофизиологические особенности взаимодействия *P. triticina* с линиями пшеницы, несущими гены возрастной устойчивости.

а – абортивная колония с двумя гаусториями, 3 сут. после инокуляции, линия Тс*Lr34*; б – пустулы разных размеров с единичными отмершими клетками (стрелки), линия Тс*Lr34*, 9 сут. после инокуляции; в – аппрессорий на устьице восприимчивого сорта Тэтчер, в цитоплазме видны окрашенные митохондрии (стрелки); г – накопление супероксид-аниона в цитоплазме аппрессория (стрелки), линия Тс*Lr37*, 12 ч после инокуляции; д – некротическая подустьичная везикула и утолщения стенок клеток, окружающих подустьичную полость (стрелки), линия Тс*Lr34*; е – отложения каллозы на стенках клеток в зоне колонии, линия Тс*Lr37*, 5 сут. после инокуляции (стрелки); ж – отложения лигнина с зеленой автофлюоресценцией на стенках клеток в зоне абортивной колонии, линия Тс*Lr37*, 5 суток после инокуляции.
Обозначения. ап – аппрессорий, га – гаусторий, иг – инфекционная гифа, л – лигнин, мкг – материнская клетка гаустория, пв – подустьичная везикула, у – устьице.

гиф и МКГ на первых этапах взаимодействия. Колонии с малым числом гаусториев (1–5 шт.) прекращали развитие, остальные развивались с различной интенсивностью. В тканях линии Тс*Lr37* рост всех колоний был сильно ограничен, при этом образовывалось достаточное количество МКГ, но было подавлено проникновение гаусториев в клетки.

В тканях устойчивых линий Тс*Lr34* и Тс*Lr37* в зонах колоний в течение 5 сут. не обнаруживались коллапсированные клетки растения с интенсивно окрашенной разрушенной цитоплазмой, т. е реакция СВЧ не развивалась. Эти наблюдения были подтверждены данными люминесцентной микроскопии, с ее помощью не обнаружены клетки растений с желтой автофлюоресценцией, характерной для реакции СВЧ (Rubiales, Niks, 1995). Умеренное окрашивание цитоплазмы клеток, свидетельствующее о постепенном их разрушении, проявлялось после гибели абортивных колоний, а также вокруг части пустул в момент спороношения. На стенках отмирающих клеток через 3–5 сут. после инокуляции появлялись отложения, их толщина увеличивалась к моменту спороношения. Эти реакции приводили к проявлению визуальных симптомов несовместимости в виде небольших хлоротических пятен на месте абортивных колоний в листьях линии Тс*Lr34* и узких зон хлороза вокруг пустул на листьях обеих линий.

Для выявления причин нарушения развития патогена были изучены генерация супероксид-аниона и состав отложений на клеточных стенках. При развитии гриба на восприимчивых растениях нитросиним тетразолием окрашивались только мелкие гранулярные структуры в цитоплазме аппрессориев и ПУВ (рис. 3, в).

Вероятно, краситель выявил активность дегидрогеназ в митохондриях клеток гриба. При окрашивании инфицированных листьев краситель накапливался в цитоплазме значительной части аппрессориев и подустьичных везикул, контактировавших с замыкающими клетками устьиц, но не в клетках растений (на линиях Тс*Lr34* и Тс*Lr37* – в 32 и 35 % структур соответственно) (рис. 3, г). Это свидетельствует об экстраклеточной генерации O_2^- замыкающими клетками устьиц. Позже цитоплазма гриба интенсивно окрашивалась анилиновым синим, что характерно для отмерших клеток. Очевидно, окислительный взрыв был причиной отмирания значительной части инокулюма до внедрения в клетки растений. Через 1 сут. после инокуляции в местах окислительного взрыва на стенках замыкающих клеток устьиц и мезофилльных клеток, окружающих подустьичную полость, откладывалась каллоза, толщина ее отложений увеличивалась со временем (рис. 3, д). Через 3 сут. после инокуляции в таких отложениях появлялся лигнин с зеленой автофлюоресценцией, его свечение было аналогично свечению фенолов в проводящих пучках здоровой части листьев. В линии Тс*Lr34* каллозно-лигниновые отложения сначала появлялись в зоне отмерших колоний через 5 сут. после инокуляции, а вокруг активно развивающихся колоний – в момент спороношения (рис. 3, е, ж). В тканях линии Тс*Lr37* комплексные отложения формировались в зоне всех колоний и имели большую толщину, чем в линии Тс*Lr34*. На восприимчивых сортах Саратовская 29 и Тэтчер слабый синтез каллозы выявлен под пустулами гриба, лигнификация не установлена.

Обсуждение

Для стабильной защиты растений от бурой ржавчины необходимо использовать гены, определяющие разные механизмы устойчивости. В связи с этим интерес представляет группа генов возрастной устойчивости. Эффективность генов возрастной устойчивости в регионах мира различна. Так, сорта с геном *Lr34* сохраняют устойчивость в различных зонах в течение нескольких десятилетий, поэтому его действие считается неспецифическим (Singh *et al*., 2003). Ген *Lr22b* сорта Тэтчер был эффективен в Канаде и юго-западных регионах России (Kolmer, 1996; Коваленко и др., 2000). Его действие приводило к снижению степени поражения и удлинению латентного периода (Rubiales, Niks, 1995). Ген *Lr37* высокоэффективен во многих регионах, включая Европу, Австралию и европейскую часть России (Singh *et al*., 2001; Ишкова и др., 2004).

Проведенные нами исследования показали, что сорт Тэтчер в Западной Сибири восприимчив к бурой ржавчине. В лабораторных экспериментах никаких компонентов устойчивости не выявлено, т. е. патоген полностью преодолел ген *Lr22b*. Нами подтверждены ранее выявленная зависимость действия гена *Lr34* от температуры и большая его эффективность при пониженных температурах (Rubiales, Niks, 1995). В то же время ген *Lr37* обеспечивал высокую устойчивость к ржавчине независимо от условий среды. Эти результаты необходимо учитывать при использовании генов в регионах с различными климатическими условиями.

Наши исследования были направлены на выявление механизмов возрастной устойчивости, при этом результаты взаимодействия гриба с линией Тс*Lr34* рассматривались как эталон частичной устойчивости. Существующее в настоящее время представление об особенностях действия гена *Lr34* основано на изучении взаимодействия с единственным изолятом из марокканской популяции *P. triticina* (Rubiales, Niks, 1995). В этих исследованиях линия Тс*Lr34* проявляла все четыре компонента устойчивости, сформулированные Парлевлитом, поэтому ген *Lr34* был назван «истинным геном частичной устойчивости». В тканях линии Тс*Lr34* не были выявлены реакция СВЧ и утолщения клеточных стенок, но было нарушено образование инфекционных гиф и гаусторий, что приводило к отмиранию 20 % колоний на ранних стадиях развития и замедлению роста остальных. В то же время при заражении тем же изолятом сорта Тэтчер и линий Тс*Lr12* и Тс*Lr13* развивалась реакция СВЧ.

Результаты наших исследований показали, что при заражении изолятом из западносибирской популяции гриба линия Тс*Lr34* проявила все компоненты частичной устойчивости, кроме удлинения латентного периода. Подтверждено, что образование гаусторий в тканях линии

Тс*Lr34* частично подавляется без проявления реакции СВЧ. Однако в наших экспериментах сокращение степени поражения растений определялось, прежде всего, отмиранием значительной доли аппрессориев на устьицах, а не гибелью колоний в тканях. На поздних этапах патогенеза и вокруг абортивных колоний выявлены утолщения клеточных стенок. Сравнение полученных нами и Д. Рубиалесом и Р. Никсом результатов показывает различия во взаимодействии изолятов с линией Тс*Lr34*, а также проявление разных защитных механизмов, влияющих на отдельные компоненты частичной устойчивости.

Реакция СВЧ считается типичным проявлением расоспецифической устойчивости. Предполагается, что длительная неспецифическая устойчивость проявляется до внедрения гаусториев в клетки и не связана с реакцией СВЧ (прегаусториальная устойчивость) (Niks, 1983). Помимо *Lr34,* к группе генов возрастной устойчивости, действующих без реакции СВЧ, отнесены *Sr2*, проявивший длительную эффективность к стеблевой ржавчине, и новые гены, *Lr46* и *Lr67* (Niks, Rubiales, 2002; Spielmeyer *et al*., 2003; Hiebert *et al*., 2010). Остальные гены возрастной устойчивости считаются расоспецифическими. «Генотип-специфическое» действие гена *Lr35* предполагается на основании визуальных признаков некроза (McIntosh, 2009). Расы, вирулентные к генам *Lr12*, *Lr13* и *Lr22b*, появились в Индии и Австралии (Kaur *et al*., 2000; McIntosh, 2009).

Хотя ген Тс*Lr37* считается расоспецифическим, в наших экспериментах линия Тс*Lr37* демонстрировала те же компоненты частичной устойчивости, что и Тс*Lr34*, но они были выражены сильнее. Часть защитных механизмов у Тс*Lr34* и Тс*Lr37* были сходны (гибель аппрессориев на устьицах и подавление образования гаусториев) и проявлялись без реакции СВЧ. Помимо этого, на линии Тс*Lr37* наблюдалось сильное подавление формирования аппрессориев, что приводило к снижению степени поражения, а также формирование отложений на клеточных стенках, коррелирующее с замедлением роста колоний и подавлением спорогенеза. Эти механизмы значительно повышали устойчивость линии Тс*Lr37* по сравнению с Тс*Lr34* в лабораторных и полевых условиях.

В наших экспериментах показано, что на поверхности листьев линий Тс*Lr34* и Тс*Lr37* погибало более половины инокулюма. Ранее сходные проявления прегаусториальной устойчивости были обнаружены при инфицировании сортов пшеницы (Little Joss) и ячменя (Vada), проявивших длительную частичную устойчивость к желтой, бурой и карликовой ржавчине соответственно (Cartwright, Russel, 1980; Niks, 1983). В некоторых сортах пшеницы (Akabozu, ВН1146) замедление роста колоний *P. triticina* сопровождалось образованием отложений на клеточных стенках, с которыми связывали неспособность грибов образовывать гаустории и раннюю абортацию колоний (Rubiales, Niks, 1995). Таким образом, на примере взаимодействия различных ржавчинных грибов с линиями и сортами с возрастной и частичной устойчивостью выявлен сходный набор механизмов защиты. Сочетания механизмов различались, что может быть связано с генетическими особенностями как сортов, так и патогенов.

Нами впервые была изучена роль окислительного взрыва в возрастной устойчивости. Ранее было показано, что иммунитет линии Тс*Lr19* обеспечивался гибелью всех аппрессориев на устьицах в результате окислительного взрыва (Плотникова, Мешкова, 2009). Однако на линиях Тс*Lr34* и Тс*Lr37* окислительный взрыв при контакте с аппрессориями зафиксирован только на 1/3 устьиц, т. е. проявлялся нестабильно. Окислительный взрыв считается первой активной реакцией растений, связанной с узнаванием патогенов, поэтому подавление формирования аппрессориев на предшествующей стадии может быть связано с пассивными механизмами устойчивости. В составе отложений на клеточных стенках растений нами выявлены каллоза и лигнин. Защитное действие каллозы связано с ограничением поступления питательных веществ в мицелий (Ohana *et al*., 1993). Ранее была отмечена тесная связь между синтезом каллозы и окислительным взрывом (Плотникова, Мешкова, 2009). Вероятно, в зонах синтеза каллозы накапливались и активные формы кислорода. Лигнификация клеточных стенок растений проявлялась на более поздних этапах патогенеза. Известно, что лигнин на стенках клеток, погибших в результате реакции СВЧ, имеет характерное желтое свечение

(Плотникова, Мешкова, 2009). В то же время свечение лигнинов в зоне колоний на линиях Тс*Lr34* и Тс*Lr37* было сходно с автофлюоресценцией фенолов в проводящих пучках листьев. Возможно, в растениях с генами возрастной и ювенильной устойчивости активируются разные ветви фенольного метаболизма.

Типичным нарушением взаимодействия грибов с растениями с возрастной устойчивостью было подавление развития инфекционных структур на поверхности и в тканях до проявления активных защитных механизмов. Известно, что для полноценного развития инфекционных структур необходимо получение от растений комплекса положительных стимулов (физических и химических) (Niks, Rubiales, 2002). Возможно, растения имеют особенности, нарушающие стимуляцию образования структур гриба. Угнетение формирования гаусториев приводит к замедлению или гибели колоний в результате голодания (Voegel *et al*., 2001). Потенциальным неспецифическим механизмом защиты может также служить системная приобретенная устойчивость (systemic acquired resistance – SAR). Известно, что окислительный взрыв индуцирует развитие SAR, при этом синтезируются фенольные соединения, защитные белки, укрепляются клеточные стенки (Тютерев, 2002). В нашей модели индукторами SAR могли служить окислительный взрыв на устьицах и элиситоры из отмирающих клеток колоний гриба.

Таким образом, наши исследования продемонстрировали, что в Западной Сибири ген возрастной устойчивости *Lr22b* был преодолен патогеном, *Lr34* имел умеренную, а *Lr37* – высокую эффективность. Действие генов *Lr34* и *Lr37* проявлялось сходно на разных этапах патогенеза, не было связано с реакцией СВЧ и приводило к проявлению типичных компонентов частичной устойчивости. Выявлены новые защитные реакции растений: нестабильный окислительный взрыв на устьицах, формирование каллозно-лигниновых отложений на клеточных стенках и синтез фенолов, нетипичных для взаимодействий, связанных с реакцией СВЧ. Гены *Lr34* и *Lr37* определяли проявление набора механизмов устойчивости и плейотропное действие на патогенез.

Литература

Ишкова Т.И., Гультяева Е.И., Левитин М.М. Грибные болезни зерновых культур на Северо-Западе России // Защита и карантин растений. 2004. № 12. С. 15–18.

Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И., Крятева Н.Н. Иммуногенетические методы создания болезнеустойчивых сортов зерновых культур. 1. Генетическая структура популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы // Агро XXI. 2000. № 4. С. 14–15.

Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. // Микология и фитопатология. 1970. Т. 4. Вып. 4. С. 269–273.

Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном *Lr19* // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 4. С. 63–77.

Тютерев С.Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений. СПб: ООО «Инновационный центр защиты растений» ВИЗР, 2002. 328 с.

Cartwright D.W., Russel G.E. Histological and biochemical nature of ‘durable’ resistance to yellow rust in wheat // Proc. of the 5th European and Mediterranean Cereal Rusts Conf., Ban and Rome. 1980. P. 23–26.

Hiebert C., Spielmeyer W., Thomas J. *et al*. Leaf rust resistance gene *Lr67*, a third adult plant slow-rusting gene conferring resistance to multiple pathogens of wheat // 8th Intern. Wheat Conf. 1–4 June 2010. St. Petersburg, Russia: Abstracts. St. Petersburg, 2010. P. 264.

Kaur M., Saini R.G., Preet K. Adult plant leaf rust resistance from 111 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // Euphytica. 2000. V. 113. P. 235–243.

Kolmer J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust // Annu. Rev. Phytopathol. 1996. V. 34. P. 435–455.

Mains E.B., Jackson E.S. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss. // Phytopathology. 1926. V. 16. No 1. P. 89–120.

McIntosh R.A. History and status of wheat rusts // BGRI. 2009. Technical Workshop. Cd. Obregon, Sonora, Mexico, March 17–20, 2009. Full Papers and Abstracts. 2009. P. 1–16.

Niks R.E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost genotypes // Phytopathology. 1983. V. 73. P. 64–66.

Niks R.E., Rubiales D. Potentially durable resistance mechanisms in plats to specialized fungal pathogens // Euphytica. 2002. V. 124. P. 201–216.

Ohana P., Bemiman M., Delmer D.P. Stimulation of callose synthesis *in vivo* correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator P-furfuryl-β-glucoside // Plant Physiol. 1993. V. 101. P. 187–191.

Parlevliet J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development // Annu. Rev. Phytopathol. 1979. V. 17. P. 203–222.

Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals // Can. J. Res. 1948. Sec. C. V. 26. P. 496–500.

Rubiales D., Niks R.E. Characterization of *Lr34*, a major gene

conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust // Plant Disease. 1995. V. 79. P. 1208–1212.

Singh R.P., Huerta-Espino J., William M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts of wheat // Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and International cooperation: Proc. 1st Central Asian Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan, 10–13 June, 2003. Almaty, 2003. P. 127–132.

Singh D., Park R.F., McIntosh R.A. Postulation of leaf (brown) rust resistance genes in 70 wheat cultivars grown in United Kingdom // Euphytica. 2001. V. 120. P. 205–218.

Spielmeyer W., Sharp P.J., Lagudash E.S. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Crop Sci. 2003. V. 43. P. 333–336.

Voegel R.T., Struck C., Hahn M., Mendgen K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 8133–8138.

EFFECTIVENESS OF THE WHEAT *Lr22b*, *Lr34*, AND *Lr37* GENES FOR ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST IN WEST SIBERIA AND THE CYTOPHYSIOLOGICAL BASIS OF THEIR ACTION

L.Ya. Plotnikova, T.Yu. Shtubey

Omsk Stolypin Agrarian University, Omsk, Russia,
e-mail: lplotnikova@rambler.ru

Summary

The effect of genes for adult plant resistance to leaf rust has been explored in southern West Siberia by the examples of common wheat cv. Thatcher (Tc), carrying the *Lr22b* gene, and its near-isogenic lines *TcLr34* and *TcLr37*. *Lr22b* is inefficient, *Lr34* slows down the disease development at a mean daily temperature below 16 ºC, but is poorly efficient at temperatures above 20 ºC. *Lr37* confers high resistance under all conditions. At the heading stage, *TcLr34* and *TcLr37* show similar components of partial resistance to rust: reduction in the number and sizes of spots and sporogenesis suppression. Cytological examination has revealed partial suppression of the formation of *Puccinia triticina* infection signs (appressoria and haustorium) without hypersensitive reaction (HR). Additional defense mechanisms include an oxidative burst induced by contacts of appressoria with stomata and callose-lignine appositions on the wall. Autofluorescence of lignins in *TcLr34* and *TcLr37* lines differs from the glow typical of HR-accompanied combinations. The *Lr34* and *Lr37* genes exert a pleiotropic action on pathogenesis.

Key words: common wheat, leaf rust, adult resistance genes, cytology, oxidative burst, callose, lignin.

УДК 633.11:632.4:575.22

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

© 2012 г. **А.М. Кохметова, М.Н. Атишова**

РГП Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Республика Казахстан,
e-mail: gen_kalma@yahoo.com

Поступила в редакцию 18 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

Стеблевая ржавчина относится к наиболее вредоносным заболеваниям пшеницы. Вирулентная по отношению к большинству сортов пшеницы раса Ug99 возбудителя болезни *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* имеет патотипный состав TTKS. По прогнозам FAO, заболевание может распространиться на восток от Ирана во многих странах Средней Азии, включая Казахстан. Защиту от расы Ug99 обеспечивают гены *Sr2*, *Sr22*, *Sr24/Lr24* и *Sr46*. Для перспективной селекции пшеницы проведен скрининг образцов на присутствие эффективных генов устойчивости к стеблевой ржавчине. С использованием молекулярных маркеров ген *Sr2* идентифицирован у 12 образцов, *Sr24/Lr24* – у 7, *Sr46* – у 1, *Sr22* – у 6 линий. Полученные результаты используются в Казахстане для создания устойчивых к стеблевой ржавчине сортов пшеницы с применением MAS-селекции.

Ключевые слова: пшеница, гены устойчивости, стеблевая ржавчина, молекулярные маркеры.

Введение

По оценке экспертов Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (Food and Agriculture Organization – FAO), на рубеже последнего столетия потери пшеницы в мире от болезней достигли 33,5 млн т, что составляет около 10 % потенциального урожая этой важнейшей продовольственной культуры. Стеблевая ржавчина (возбудитель – гриб *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*) относится к наиболее вредоносным заболеваниям пшеницы. В истории земледелия известны эпифитотии, охватывавшие целые континенты, что приводило к катастрофическим потерям урожая (Pretorius *et al.*, 2000). В 1967 г. в северных областях Казахстана эпифитотия стеблевой ржавчины охватила свыше 5 млн га посевов. При этом поражаемость пшеницы достигла 70–90 %, а потери урожая превысили 50 % (Плахотник, 1969). После этого массовое развитие стеблевой ржавчины на посевах пшеницы в мире, включая Казахстан, отмечалось очень редко. Однако в 1999 г. в Уганде была обнаружена новая раса гриба с характеристикой патотипа TTKS, получившая обозначение Ug99 (Jeffrey *et al.*, 2007). В следующем году она была обнаружена уже в Эфиопии и Кении (Pretorius *et al.*, 2007). Впоследствии из расы TTKS были выделены три разных изолята: TTKSK, TTKST и TTSSK, вирулентных к разным генам устойчивости (Jin *et al*., 2008). Известно, что споры ржавчинных грибов воздушным путем могут переноситься на сверхдальние расстояния, иногда и через океаны. Раса Ug99 оказалась высоковирулентной, она поражает большую часть коммерческих сортов пшеницы. По сравнению с другими видами ржавчины (желтой и бурой), наносящими меньший урон, стеблевая ржавчина может привести к полной потере урожая.

В масштабах земного шара в текущее время под угрозой эпифитотии ржавчины находится 65 млн га сельскохозяйственных земель. Согласно некоторым прогнозам, распространение расы Ug99 может привести к потере двух третей урожая пшеницы в США и 80 % – в странах Азии и Африки (Jin *et al.*, 2008). Специалисты предупреждают о том, что заболевание может распространиться к востоку от Ирана во многих странах Средней Азии, в том числе в Казахста-

не. Гриб распространяется очень быстро и может нанести серьезной урон урожаю пшеницы в этих странах (Wanyera *et al.*, 2006). Это не может не вызывать тревогу в Казахстане, где пшеница – важная экономическая культура.

На севере и востоке Казахстана развитие стеблевой ржавчины происходит ежегодно. С 1990 по 1999 гг. в Северном Казахстане на яровой пшенице 6 раз наблюдали позднее проявление и слабое развитие стеблевой ржавчины (Койшибаев и др., 1999). В Костанайской и Северо-Казахстанской областях в 2006–2007 гг. отмечалось поражение посевов в пределах 20–40 %, а в других областях – 80–100 %. Отмечено, что казахстанская популяция стеблевой ржавчины 2006–2007 гг. включала высоковирулентные патотипы (TFK/R, TKT/C, TPS/H, TKH/RS, TDT/HS и TTH/KQ), некоторые из них поражают все изученные изогенные *Sr*-линии и по номенклатурному индексу сходны с патотипом из Африки Ug99 (TTKS) (Рсалиев, 2008). Представительством Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы (International Maize and Wheat Improvement Center – CIMMYT) в Казахстане (СИММИТ) совместно с учреждениями-участниками сети КАСИБ (Казахстанско-Сибирской сети улучшения пшеницы) в 2007–2010 гг. проведена оценка более 1200 образцов пшеницы на устойчивость к расе Ug99. Работы, проведенные в Исследовательском центре по селекции растений (Кения, г. Нджеро), выявили только 3 сорта яровой пшеницы, устойчивые к Ug99 (Зеленский и др., 2010).

Наиболее эффективным способом защиты растений является использование устойчивых к болезням сортов. Применение молекулярно-генетических маркеров позволяет идентифицировать эффективные гены устойчивости в сортах и гибридах, что ускоряет отбор целевых генотипов и повышает эффективность селекционного процесса. Преимуществом селекции с применением молекулярных маркеров (marker assisted selection – MAS) является возможность проведения отбора растений независимо от условий среды и на любой стадии развития (Shi *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002). ДНК-маркеры широко используются как для непосредственного проведения селекции с помощью маркеров, так и для поиска доноров генов устойчивости к стеблевой ржавчине в перспективном материале пшеницы.

К настоящему времени в базе данных Komugi Wheat Genetics Resource Database) зарегистрировано 69 генов устойчивости к стеблевой ржавчине (SHIGEN, 2011), в том числе 45 идентифицированных *Sr*-генов и 24 *Sr*-гена, имеющих временное обозначение. По данным ряда исследователей, гены *Sr2*, *Sr13*, *Sr14*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35, Sr36*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr45*, *Sr46* и *Sr1A.1R* эффективны против расы Ug99 (Singh *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2007). В настоящем исследовании внимание было обращено на часть эффективных генов – *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr36*, *и Sr46.* Ген *Sr2* локализован в хромосоме 3BS, тестирующей линией этого гена является CS(Hope 3B), а источником гена – *Triticum turgidum* (Yaroslav emmer) (Knott, 1968). Ген *Sr2* является геном возрастной устойчивости широкого спектра (APR-ген, adult plant resistance gene). Однако уровень защитного ответа может зависеть от генетического окружения, окружающей среды и инфекционной нагрузки, поэтому для эффективной защиты от ржавчины рекомендуется «пирамидирование» этого гена с другими генами (Jin *et al.*, 2007). Ген *Sr22* локализован в хромосоме 7AL, источником гена является *T. monococcum*, а тестирующей линией – SwSr22T.B. (Knott, 1968). Ген *Sr24* локализован в хромосоме 3DL, тесно сцеплен с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr24*, источником гена является *Agropyron elongatum*, а тестирующей линией – BrSr24Ag (McIntosh *et al*., 1977). Ген *Sr36* локализован в хромосоме 2BS, источником гена является *T. timopheevii*, а тестирующей линией – W2691SrTt-1 (McIntosh, Guarfas, 1971). Ген *Sr46* локализован в хромосоме 2DS, источником гена является *Aegilops tauschii*, а тестирующей линией – L-18913 (Lagudah, 2008).

С учетом возможности воздушого переноса урединиоспор *P. graminis*. f. sp. *tritici* в регион Центральной Азии и Казахстана поиск и создание новых доноров и перспективных линий пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине, становятся весьма актуальны и своевременны. Цель настоящей работы – идентификация источников с эффективными генами устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований были использованы 88 образцов, включающих 40 перспективных линий яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., и пшенично-пырейные гибриды (ППГ), созданные в лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений Казахстана. Кроме того, в данной статье представлены результаты конкурсного сортоиспытания лучших из 48 перспективных линий озимой пшеницы, проведенного в 2011 г. в условиях полевого стационара отдела генофонда полевых культур Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак Алматинской области (КазНИИЗР). Нами также изучено 45 линий пшеницы, предоставленных СИММИТ и созданных по программе повышения устойчивости пшеницы к расе возбудителя стеблевой ржавчины Ug99. Анализ устойчивости образцов пшеницы проводили в Казахстане (Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, п. Гвардейский, Жамбылская область) и в Кении (Институт сельскохозяйственных исследований Кении – Исследовательский центр селекции растений, г. Нджеро). В Кении экспериментальный материал испытывали на фоне естественной эпифитотии, популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* включала расу Ug99. Оценку развития болезни стеблевой ржавчиной в Казахстане и Кении проводили в фазу молочно-восковой спелости по принятой в СИММИТ методике, определяя инфекционный тип и степень поражения: R (Resistant – устойчивый тип) – 1 балл (поражение 5 %); MR (Moderately resistant – относительно устойчивый тип) – 2 балла (поражение до 20–30 %); MS (Moderately susceptible – относительно восприимчивый тип) – 3 балла (поражение до 40–50 %); S (Susceptible – восприимчивый тип) – 4 балла (поражение более 60 %) (Peterson *et al*., 1948). В качестве восприимчивого контроля в полевых экспериментах в Кении и Казахстане использовали сорт пшеницы Безостая 1. Коллекции образцов пшеницы высевали во всех фитопатологических опытах на делянках площадью 1 м^2 в трехкратной повторности.

Для создания искусственного инфекционного фона в Казахстане образцы урединиоспор возбудителя стеблевой ржавчины собирали в процессе обследований и экспедиций на производственных и селекционных посевах пшеницы в Алматинской, Жамбылской и Акмолинской областях. После размножения урединиоспор проводили инфицирование растений в фазе колошения смесью инокулюма с тальком в соотношении 1 : 100, инфекционная нагрузка урединиоспор составляла 20 мг/м^2. Для накопления инфекции и перезаражения растений через каждые пять опытных делянок высевали универсально восприимчивый сорт Moroccо и сорт-стандарт (Безостая 1).

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из 5-дневных проростков пшеницы с помощью CTAB-метода (Riede, Anderson, 1996). Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве положительного контроля при идентификации генов использованы образцы пшеницы, в которых гены устойчивости идентифицированы, а в качестве отрицательного контроля – образцы, в которых гены устойчивости не выявлены. Носители гена *Sr2* выявляли на основе ПЦР с использованием SSR-маркера GWM533 (Hayden *et al.*, 2004), ген *Sr22* – с использованием маркера cfa2123 (Khan *et al.*, 2005), ген *Sr46* – с использованием маркера csSC46 (Lagudah, 2008), а гены *Sr24/Lr24* – с использованием STS маркера Sr24#12 (Mago *et al.*, 2005). Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10х буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ каждого нуклеотида), 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 18 мкл MQ-H_20. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 %-м агарозном или 8 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1мМ EDTA, pH 8) (Chen *et al.*, 1998). Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) при следующих параметрах: начальная денатурация – 94 ºС в течение 5 мин; 45 циклов – 1 мин при 94 ºС; 1 мин – 45 ºС; 2 мин – 72 ºС; финальная элонгация проводилась в течение 7 мин при 72 ºС.

Изучение селекционного материала и статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам (Седловский и др., 1982).

Результаты и обсуждение

Оценка устойчивости перспективных линий пшеницы к возбудителю стеблевой ржавчины расы Ug99 в Исследовательском центре селекции растений (Кения, г. Нджеро)

В лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений были созданы интрогрессивные образцы мягкой пшеницы с участием диких и культурных сородичей *Triticum dicoccum*, *T. compactum*, *T. maha*, *T. spelta*, *T. turgidum*, *Aegilops triaristata*, а также пшенично-пырейные гибриды (ППГ), созданные на основе пырея удлиненного *Agropyron elongatum*. 40 перспективных по продуктивности образцов были изучены по устойчивости к стеблевой ржавчине. В 2008 г. коллекция образцов была испытана на инфекционном фоне на устойчивость к казахстанской популяции *P. gramiis* f. sp. *tritici*. Образцы были устойчивы (оценка от 5R до 20–40MR). В 2009 г. коллекция образцов пшеницы была оценена в Исследовательском центре селекции растений (Кения) к популяции возбудителя стеблевой ржавчины, включающей вирулентную расу Ug99 (табл. 1).

Большинство образцов в условиях Кении оказались восприимчивыми к возбудителю ржавчины. В то же время результаты исследований позволили выявить 4 линии с умеренно устойчивым типом реакции (MR) на заражение. При этом указанные образцы отличались по степени поражения от низкой (5 %) до средней (40 %): № 28 Женис / *T. dicoccum* (5MR), № 32 Саратовская 29 / *T. maha* (20MR) и № 36 Женис / *T. compactum* (30MR), № 23 Женис / ППГ-27 (40MR). Выделено 14 линий с умеренно восприимчивой реакцией MS (табл. 1). Принимая во внимание тот факт, что у контрольного сорта интенсивность поражения болезнью составляет 60–70S, результаты испытания в Кении можно считать достаточно успешными. Изучение 4 перспективных устойчивых образцов в селекционных питомниках (СП-1 и СП-2) Казахского НИИ земледелия и растениеводства подтвердило ожидания в отношении продуктивности этих линий пшеницы.

Идентификация носителей генов устойчивости с использованием молекулярных маркеров

Поиск носителей генов устойчивости к стеблевой ржавчине был основан на молекулярном скрининге образцов пшеницы. В образцах идентифицировали гены, эффективные против расы стеблевой ржавчине Ug99 (TTKSK): *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr36* и *Sr46*. Эффективность генов *Sr24* и *Sr36* подвергается сомнению, так как в последнее время обнаружены две новые разновидности расы Ug99, TTKST и TTSSK, вирулентные к генам *Sr24* и *Sr36* соответственно (Jin *et al.*, 2007). Однако предполагается, что их целесообразно использовать в сочетании с другими эффективными генами устойчивости для создания пирамид генов (Tsilo *et al.*, 2008).

Ген возрастной устойчивости (adult plant resistance) *Sr2* обеспечивал полувековую стабильную устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине во многих регионах мира. Ген *Sr2* содержится во многих современных коммерческих сортах пшеницы (McIntosh, 1988). Известно, что наследование гена *Sr2* носит рецессивный характер, что усложняет отбор по фенотипу. Проявление устойчивости на взрослой стадии развития также способствует поздней идентификации носителей гена *Sr2*. С ним тесно сцеплены 2 морфологических маркера, псевдочерная колосковая чешуя (PBC, pseudo-black chaff) и проростковый хлороз, индуцированный высокой температурой (HTISC, high-temperature-induced seedling chlorosis), которые используют для косвенного отбора устойчивых фенотипов в селекционных программах (Eagles *et al.*, 2001). Для более надежного отбора носителей данного гена устойчивости к стеблевой ржавчине использован SSR-маркер GWM533, тесно сцепленный с *Sr2*-геном, преимуществом которого является то, что он выявляется независимо от влияния среды и стадии развития растений (Hayden *et al.*, 2004).

Для идентификации носителей этого гена проведен ПЦР-анализ 19 устойчивых к стеблевой ржавчине генотипов пшеницы с использованием указанного молекулярного маркера. Материалом для исследования служили линии пшеницы, предоставленные СИММИТ.

Таблица 1

Результаты изучения образцов пшеницы и пшенично-пырейных гибридов казахстанской селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (Кения, г. Нджеро, 2009 г.)

№ п/п	№ каталога ИББР*	Образец-источник гена устойчивости	Степень поражения (%) и инфекционный тип
1	–	Контроль – Безостая 1	60–70S
2	1S-259-1	ППГ-23 *Ag. elongatum* /239	70S
3	2S-259-2	ППГ-18 *Ag. elongatum* /239	60S
4	3S-260-1	ППГ-14 *Ag. elongatum* /239	60S
5	4S-261-1	ППГ-26 *Ag. elongatum* /Женис	40MS
6	5S-262-1	Женис /ППГ-26 *Ag. elongatum*	50S
7	6S-263-1	Женис / *Ae. triaristata*	40MS
8	7S-266-1	Саратовская 29/ *T. maha*	60S
9	8S-268-1	Саратовская 29 / *T. maha*	60S
10	9S-271-1	L719-99 / *T. maha*	40MS
11	10S-273-1	*T. compactum* / Женис	30MS
12	11S-274-1	Женис / *T. compactum*	20MS
13	12S-275-5	Казахстанская 10/ *Ae. triaristata*	40MS
14	13S-276-1	Карабалыкская 84 / *T. spelta*	70S
15	14S-278-1	Женис / *Ae. triaristata*	70S
16	15S-279-1	Женис / *Ae. triaristata*	50MS
20	16S-280-1	Женис / *Ae. triaristata*	50MS
21	20S-283-2	Женис / *Ae. triaristata*	70S
22	21S-284-3	ППГ-27 *Ag. elongatum* / Женис	80S
23	22S-285-1	ППГ-14 *Ag. elongatum* / Женис	50MS
24	23S-286-1	Женис/ППГ-27 *Ag. elongatum*	40MR
25	24S-287-1	Женис / *T. turgidum*	40MS
26	25S-287-4	Женис / *T. turgidum*	60MS
27	26S-287-5	Женис / *T. turgidum*	60MS
28	27S-289-5	Женис / *T. turgidum*	50MS
29	28S-289-6	Женис / *T. turgidum*	5MR
30	29S-290-1	Женис / *T. maha*	60S
31	30S-265-2	*T. spelta* / Женис	40S
32	31S-265-5	*T. spelta* / Женис	50S
33	32S-266-4	Саратовская 29 / *T. maha*	20MR
34	33S-266-7	Саратовская 29 / *T. maha*	60S
35	34S-271-5	L719-99 / *T. maha*	20MS
36	35S-274-3	Женис / *T. compactum*	60S
37	36S-274-6	Женис / *T. compactum*	30MR
38	37S-276-8	Карабалыкская 84 / *T. spelta*	70S
39	38S-276-13	Карабалыкская 84 / *T. spelta*	60S
40	39S-278-2	Женис / *Ae. triaristata*	70S
41	40S-279-2	Женис / *Ae. triaristata*	40MS

* ИББР – Институт биологии и биотехнологии растений.

Ожидаемый размер фрагмента амплификации для локуса *Xgwm533* – 120 п.н. (Hayden *et al.*, 2004). Среди продуктов амплификации ДНК положительного контроля, почти изогенной линии сорта Чайниз Спринг (CS*6/Hope 3B), присутствует характерный фрагмент размером 120 п.н. (рис.).

Анализ результатов ПЦР показал, что 12 генотипов формировали амплифицированный продукт, аналогичный маркеру гена *Sr2*. К носителям этого гена можно отнести линии: 1 – 1212/8 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/ GRISET-4); 2 – 1216/7 (TAM200/3/F60314.76/ MRL//CNO79/4/84.40022/5/AGRI/ NAC//KAUZ/ 3/1D13.1/MLT); 6 – 1213/8 (AGRI/NAC//KAUZ/ 3/1D13.1/MLT/4/ PYN/BAU); 7– 1213/5 (AGRI/ NAC//KAUZ/3/ 1D13.1/MLT/4/PYN/BAU); 8 – 1213/1 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/ MLT/4/PYN/BAU); 9 – 1212/3 (AGRI/NAC// KAUZ/3/ 1D13.1/MLT/4/GRISET-4); 10 – 1211/4 (KINACI97/4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/ MLT); 12 – 1212/1(AGRI/NAC//KAUZ /3/1D13.1/ MLT/4/GRISET-4); 13 – 1212/1 (AGRI/NAC// KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/ GRISET-4); 15 – 1211/7 (KINACI97/4/ AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/ MLT); 19 – 1210/10 (338-K1-1//ANB/BUC/3/ GS50A /4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT) и 20 – 1210/4 (338-K1-1//ANB/BUC/3/ GS50A/4/ AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT). Оценка устойчивости к стеблевой ржавчине на инфекционном фоне к казахстанской популяции стеблевой ржавчины показала высокую устойчивость указанных 12 линий пшеницы (5R–20MR). Присутствие в геноме изученных линий гена *Sr2* было подтверждено проявлением морфологического маркера «псевдочерная колосковая чешуя» (PBC, pseudo-black chaff), тесно сцепленного с геном. Таким образом, результаты ПЦР-анализа и фитопатологической оценки свидетельствуют о том, что из 19 проанализированных перспективных линий пшеницы 12 содержат в своем генотипе эффективный ген *Sr2*.

При изучении этих же 19 образцов пшеницы из СИММИТ на наличие гена *Sr46* был использован молекулярный маркер csSC46, который был разработан на основе BAC-клона, содержащего локус *Xpsr649* (Lagudah, 2008). В результате ПЦР с маркером csSC46, сцепленным с геном *Sr46*, образовывался фрагмент длиной 600 п.н. ПЦР-анализ выявил присутствие продукта амплификации характерного размера лишь у линии 338-K1-1//ANB/ BUC/3/GS50A/4/422/5/ BAYRAKTAR; в остальных генотипах он не обнаружен.

С целью идентификации носителей гена *Sr22* проведен ПЦР-анализ с праймерами к SSR-локусу *Xcfa2123*, расположенному на расстоянии 6 сМ от гена *Sr22* (Khan *et al.*, 2005). Анализу были подвергнуты 19 образцов пшеницы казахстанской селекции, показавшие устойчивость к местной популяции стеблевой ржавчины на инфекционном фоне (5R–30MR). При использовании праймеров к локусу *Xcfa2123* амплифицировались фрагменты ДНК размером 245 п.н. (в случае сцепления с доминантным аллелем

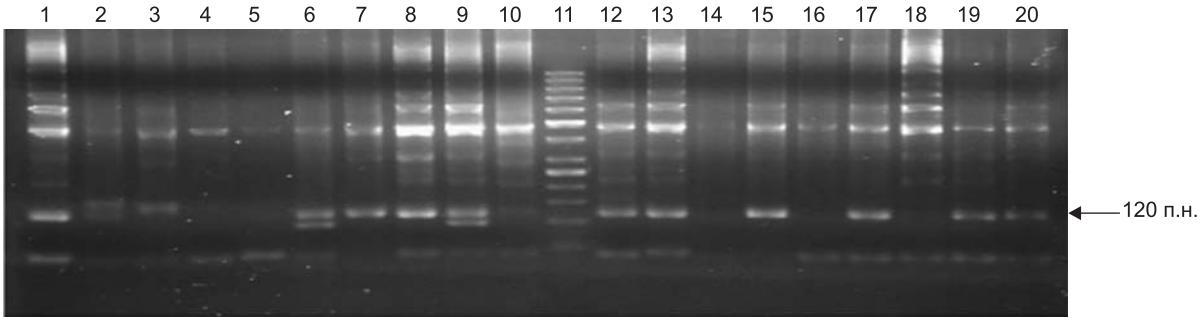


Рис. Продукты амплификации ДНК образцов пшеницы с использованием праймеров к локусу *Xgwm533*, сцепленному с геном устойчивости *Sr2*.

1 – 1212/8; 2 – 1216/7; 3 – 1216/6; 4 – 1216/5; 5 – 1213/9; 6 – 1213/8; 7 – 1213/5; 8 – 1213/1; 9 – 1212/3; 10 – 1211/4; 11 – маркер молекулярного веса (Gene-Ruler, 50 bp DNA Ladder); 12 – 1212/1; 13 – 1212/1; 14 – 1211/9; 15 – 1211/7; 16 – 1211/6; 17 – положительный контроль, *Sr2*, почти изогенная линия CS*6/Hope 3B; 18 – отрицательный контроль сорт Morocco; 19 – 1210/10; 20 – 1210/4. Гель 2 %-й агарозный.

гена *Sr22*) или 260 п.н. (при рецессивном аллеле гена *Sr22*). Фрагменты, указывающие на присутствие доминантного аллеля гена *Sr22*, выявлены у 6 из 19 проанализированных линий пшеницы, включая положительный контроль – тестирующую линию Sw*Sr22*T.B. К носителям гена *Sr22* следует отнести линии: 185-6 (More/ Currawong / LawsonC90-1(Marquis*8/*Sr39Lr35*), KS5 (Женис / *T. dicoccum*), KS9 (Саратовская 29 / *T. maha*), KS12 (Женис / *T. compactum*) KS15 (Раминал), KS16 (Женис / 96Argus).

Ранее нами был проведен молекулярный скрининг 42 линий селекции СИММИТ на наличие генов *Sr24/Lr24* (Kokhmetova *et al.*, 2011). Среди изученного материала характерные ПЦР-продукты размером 500 п.н. выявлены у 7 линий пшеницы. Фитопатологическая оценка казахстанской популяции в условиях искусственного инфекционного фона показала устойчивую (5R) и умеренно-устойчивую (20MR) реакцию этих образцов на заражение стеблевой ржавчиной. У остальных 35 генотипов пшеницы маркер гена не обнаружен (Kokhmetova *et al.*, 2011). Присутствие генов *Sr24/Lr24* предполагается у следующих линий пшеницы: Progress/94*Sr36*, 94*Sr36*/Progress, MV10-2000/4/ AGRI/NAC// KAUZ, KALYOZ-18//8229/OK81306/4/, SILVERSTAR/4/338-K1-1// ANB/, 338-K1-1//ANB/ BUC/3/GS50A/4/422/5/BAYRAKTAR и TREGO/ BTYSIB// ZARGANA-3/3/.

Отбор линий мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине и по количественным признакам

В питомнике конкурсного сортоиспытания отдела генофонда полевых культур Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства (КазНИИЗР) в 2011 г. испытано 48 перспективных линий озимой пшеницы, созданных в нашей лаборатории. Основными критериями отбора были высокая урожайность и устойчивость к стеблевой ржавчине. В табл. 2 приведены данные за 2011 г. по лучшим 9 линиям пшеницы, которые проявили высокую устойчивость к казахстанской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* (поражение не более 5 %). Выделены 4 линии, превышающие по

Таблица 2

Результаты изучения перспективных линий озимой пшеницы в питомнике конкурсного сортоиспытания, Алмалыбак, КазНИИЗР, 2011 г.

№ каталога	Образец	Высота растения, см	Степень развития, инфекционный тип стеблевой ржавчины*	Урожайность, т/га	Отклонение урожайности от стандарта, %	Идентифицированные гены устойчивости
529	Санзар / Анза	100,2 ± 2,1	0	8,52	+16,9	*Sr22*
519	А-А р-к / Прогресс	80,1 ± 1,7	5R	8,15	+11,7	–
512	Таза / МК 3750	85,4 ± 2,3	0	7,97	+9,3	–
531	Тилек / RWKLDN-33	110,1 ± 2,0	0	7,59	+4,1	–
539	RWKLDN-9 / FAWWON 3750	101,3 ± 1,9	5R	8,83	+21,1	*Sr24/Lr24*
526	Moro*2/c90/More*2	120,0 ± 2,4	5R	7,25	–0,54	*Sr22*
508	181(Комсомол.1 / Карлыгаш 06)	100,6 ± 1,6	5R	7,24	–0,68	–
19W-207	Progress / 94Sr36	95,1 ± 1,5	5R	6,61	–9,3	*Sr22*, *Sr36, Sr24/Lr24*
514	More / Carrawary / Lawson	100,7 ± 1,7	5R	6,46	–11,4	*Sr22*, *Sr36*
	Стандарт – Алмалы	97,6 ± 1,4	40MS	7,29	0	–
	$НСР_{0,05}$	2,6	–	0,29	–	–

* Степень поражения и инфекционный тип по методике, принятой в СИММИТ.

урожайности сорт-стандарт Алмалы: № 529 F4 Санзар / Анза, № 519 A-A p-k / Прогресс, № 512 Таза / MK3750, № 531 Тилек / RWKLDN-33. По признаку «высота растения» отобранные линии в основном относились к среднерослым. Выраженность признака варьировала в пределах от 80 см у линии A-A p-k / Прогресс до 120 см у линии Moro*2/c90/More*2. Селекционная линия № 539 комбинации RWKLDN-9/FAWWON 3750, характеризующаяся высокой продуктивностью и устойчивостью к стеблевой ржавчине, в 2011 г. передана на Государственное сортоиспытание в Госсортсеть Республики Казахстан.

С использованием молекулярных маркеров в перспективном селекционном материале идентифицированы гены устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине. При проведении ПЦР с использованием молекулярного маркера Cfa2123 установлено, что носителями гена *Sr22* являются образцы пшеницы из комбинаций Санзар / Анза, Moro*2/c90/More*2, Progress /94*Sr36* и More / Carrawary / Lawson. Фрагменты ДНК, характерные для носителей генов *Sr36* и *Sr24/Lr24,* выявлены у линий RWKLDN-9 / FAWWON 3750, Progress / 94*Sr36* и More / Carrawary / Lawson при использовании молекулярных маркеров Sr24#12 для локуса *Sr24/Lr24* и STM773-2 для гена *Sr36* (Tsilo *et al.*, 2008). Все испытанные линии показали высокий уровень устойчивости к стеблевой ржавчине, однако не во всех идентифицированы известные гены *Sr* (табл. 2). Возможно, что в них присутствуют неидентифицированные гены устойчивости к болезни. Ряд устойчивых к болезням образцов уступали сорту-стандарту по урожайности, что предполагает дальнейшую селекционную работу с ними.

Таким образом, в связи с возможной угрозой развития эпифитотий болезней необходимо создание новых доноров устойчивости к стеблевой ржавчине и селекционного материала пшеницы на их основе. В результате последовательной оценки на восприимчивость перспективных линий пшеницы на инфекционном фоне в Казахстане, а затем к кенийской популяции, включающей вирулентную расу Ug99, нами отобран ряд устойчивых к *P. graminis f.* sp. *tritici* линий. С использованием молекулярных маркеров, сцепленных с *Sr*-генами устойчивости, выявлены линии, несущие эффективные гены устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы. Отобранный материал проявил устойчивость к казахстанской популяции при повторном испытании, а в настоящее время проходит испытание в Кении. В питомнике КСИ выделены 4 высокоурожайные линии пшеницы, превышающие по урожайности сорт-стандарт. Эти образцы, устойчивые к казахстанской популяции стеблевой ржавчины и к расе Ug99, вовлечены в селекционные программы по повышению устойчивости к ржавчинным болезням. В селекционных питомниках младшего звена изучаются гибриды с участием этих линий. Для ускорения селекционного процесса нами будет продолжен отбор устойчивых к болезням линий с использованием молекулярных маркеров, сопряженных с этим признаком.

Для успешной селекции на иммунитет большое значение имеет международное сотрудничество с СИММИТ. Наши исследования показали, что сорта, устойчивые к стеблевой ржавчине, нужно создавать на основе казахстанских сортов пшеницы, адаптированных к условиям региона. В качестве доноров устойчивости необходимо вовлекать в гибридизацию и образцы из коллекции СИММИТ, а также линии с новыми генами устойчивости, полученные в Казахстане. Результаты нашей работы создают возможность для перехода селекционного процесса в Казахстане на новый научный уровень за счет применения молекулярно-генетических методов.

Багодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений, отдела фитопатологии Института проблем биологической безопасности, отдела генофонда полевых культур Казахского НИИ земледелия и растениеводства и А.И. Моргунову (Представительство СИММИТ в Турции) за содействие в проведении исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках программы НТП 0.0492.

Литература

Зеленский Ю.И., Койшибаев М.К., Моргунов А.И. Повышение устойчивости яровой мягкой пшеницы к видам ржавчины и септориозу в Северном Казахстане

// Матер. конф. «Биологическая защита растений как основа экологического земледелия и фитосанитарной стабилизации агроэкосистем», посвященной 50-летию ВНИИБЗР, Краснодар, 21–24 сентября 2010. Краснодар: ВНИИБЗР, 2010. С. 583–585.

Койшибаев М., Пономарева Л.А., Кочоров А.С. Динамика болезней зерновых культур с листостебельной инфекцией в различных агроландшафтных зонах // Междунар. конф. «Стратегия земледелия и растениеводства на рубеже XXI века», Алматы, 1–3 июля 1999. Алматы, 1999. С. 108–110.

Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на Севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы (ВНИИЗХ) // Тр. Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969. Вып. 3. С. 72–75.

Рсалиев Ш.С. Вирулентность новых патотипов стеблевой ржавчины в Казахстане // Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам», Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2008. СПб: Инновационный центр защиты растений, 2008. С. 87–90.

Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. Алма-Ата: Наука, 1982. С. 47–143.

Castro A., Chen X.M., Hayes P.M., Johnston M. Pyramiding quantitative trait locus (QTL) alleles determining resistance to barley stripe rust: effects on resistance at the seedling stage // Crop Sci. 2002. No 43. P. 651–659.

Chen X.M., Line R.F., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis // Theor. Appl. Genet. 1998. No 97. P. 345–355.

Eagles H.A., Bariana H.S., Obgonaya F.C. *et al*. Implementation of markers in Australian wheat breeding // Austr. J. Agric. Res. 2001. No 52. P. 1349–1356.

Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance genes *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2004. No 109. P. 1641–1647.

Jeffrey G. E., Mago R., Kota R. *et al*. Wheat rust resistance research at CSIRO // Austr. J. Agric. Res. 2007. V. 58. Issue 6. P. 507–511.

Jin Y., Singh R.P., Ward R.W. *et al*. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2007. No 91. P. 1096–1099. DOI:10.1094/PDIS-91-9-1096.

Jin Y., Szabo Z.A., Pretorius Z.A. *et al*. Detection of virulence to *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2008. V. 92. P. 923–926.

Khan R., Bariana H., Naik S. *et al*. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2005. No 111. P. 846–850.

Knott D.R. The inheritance of resistance to stem rust races 56 and 15B-1L (Can.) in wheat varieties Hope and H-44 // Can. J. Genet. Cytol. 1968. No 10. P. 311–320.

Kokhmetova A., Morgounov A., Rsaliev Sh. *et al*. Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques // Czech J. Genet. Plant Breeding. 2011. V. 47. P. 146–154.

Lagudah E.S. Personal communication. Catalogue of gene symbols for wheat: 2008 Supplement // Annu. Wheat Newslett. 2008. V. 54. P. 209–225.

Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S. *et al*. Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm // Theor. Appl. Genet. 2005. No 111. P. 496–504.

McIntosh R.A. The role of specific genes in breeding for durable stem rust resistance in wheat and triticale // Breeding Strategies for Resistance to the Rust of Wheat / Eds N.W. Simmonds, S. Rajaram. CIMMYT, Mexico, 1988. P. 1–9.

McIntosh R.A., Guarfas J. *Triticum timopheevii* as a source of resistance to wheat stem rust // Z. Pflanzenzucht. 1971. V. 66. P. 240–248.

McIntosh R.A., Dyck P., Green G. Inheritance of leaf rust and stem rust resistance in wheat cultivars Agent and Agatha// Aust. J. Agric. Res. 1977. V. 28. P. 37–45.

Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. 1948. V. 26. P. 496–500.

Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance genes *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda // Plant Disease. 2000. V. 84. P. 203.

Pretorius Z.A., Pienaar L., Prins R. Greenhouse and field assessment of adult plant resistance in wheat to Greenhouse and field assessment of adult plant resistance in wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Australian Plant Pathol. 2007. V. 36. No 6. P. 905–909.

Riede C.R., Anderson, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat // Crop Sci. 1996. No 36. P. 905–909.

Shi Z.X., Chen X.M., Line R.F. *et al*. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust // Genome. 2001. V. 44. P. 509–516.

SHIGEN (2011): Shared Information of GENetic Resources. Available at: www.shigen.nig.ac.jp. Accessed 26 June 2011.

Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y. *et al*. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen // CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 2006. 1. N 054 DOI: 10.1079/PAVSNNR20061054

Tsilo T., Jin Y., Anderson J. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 253–261.

Wanyera R., Kinyua M. G., Jin Y., Singh R.P. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. tritici, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa // Plant Disease. 2006. V. 90. P. 113.

IDENTIFICATION OF STEM RUST RESISTANCE SOURCES IN WHEAT BY USING MOLECULAR MARKERS

A.M. Kokhmetova, M.N. Atishova

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan,
e-mail: gen_kalma@yahoo.com

Summary

Puccinia graminis f. sp. *tritici* induces stem rust, which is the cause of a considerable crop loss. Race Ug99 of *P. graminis* f. sp. *tritici* (pathotype TTKS) is virulent to the majority of wheat varieties. According to FAO reports, major wheat-producing countries to the east of Iran (Afghanistan, India, Pakistan, Turkmenistan, Uzbekistan and Kazakhstan) are greatly endangered. It is necessary to seek resistance sources to stem rust with identified *Sr* genes. Screening with PCR SSR and STS markers associated with effective *Sr* genes (*Sr2*, *Sr22*, *Sr24* and *Sr46*) was undertaken to identify *Sr* gene sources. Twelve accessions with the *Sr2*-gene were identified. Seven resistant lines were found to possess *Sr24/Lr24* genes. *Sr46* was identified in one line. PCR analysis revealed the presence of *Sr22* in six promising lines. The results are used in wheat breeding programs for stem rust resistance with marker-assisted selection.

Key words: wheat, resistance genes, stem rust, molecular markers.

УДК 576.316:633.111.1:632.938.1

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ХРОМОСОМ *TRITICUM TIMOPHEEVII* НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Е.М. Тимонова[1], И.Н. Леонова[1], И.А. Белан[2], Л.П. Россеева[2], Е.А. Салина[1]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: eegorova@bionet.nsc.ru;
[2] Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Сибирского отделения Российской сельскохозяйственной академии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 23 декабря 2011 г. Принята к печати 10 января 2012 г.

Проведена оценка влияния фрагментов интрогрессии *Triticum timopheevii* Zhuk. ($2n = 28$, A^tA^tGG) и их комбинаций на устойчивость к бурой и стеблевой ржавчине, мучнистой росе и ряду количественных признаков у 15 интрогрессивных линий мягкой пшеницы. Анализ интрогрессивных линий молекулярно-генетическими и цитологическими методами продемонстрировал эффективность комплексного использования различных типов маркеров для детальной характеристики гибридных форм и выявления различных транслокаций и замещений. Оценка линий по устойчивости к грибным болезням показала, что линии, содержащие в геноме интрогрессивный фрагмент хромосомы 5G, являются полностью устойчивыми к популяциям бурой ржавчины Западной Сибири и стеблевой ржавчины, типичной для Омской области. Линии 3862-5 и 3862-15, содержащие в геноме фрагмент длинного плеча хромосомы 2G, были устойчивыми к популяции стеблевой ржавчины Западной Сибири. Интрогрессивные линии были изучены по ряду количественных признаков. У всех изученных линий не отмечено негативного влияния чужеродного материала на урожайность и другие количественные признаки, что позволяет их использовать в селекции в качестве доноров устойчивости к грибным заболеваниям. Кроме того, установлено положительное влияние фрагментов хромосомы 2G *T. timopheevii* на признак озерненности колоса.

Ключевые слова: интрогрессивные линии мягкой пшеницы, *T. timopheevii*, SSR-анализ, *in situ* гибридизация, С-окрашивание, устойчивость к грибным болезням, количественные признаки.

Введение

Дикие и культурные сородичи мягкой пшеницы интенсивно используются для поиска и переноса в современные коммерческие сорта новых генов устойчивости к биотическому стрессу. Например, из около 80 известных генов и локусов количественных признаков (QTL), контролирующих устойчивость к бурой ржавчине, почти половина интегрирована в геном мягкой пшеницы от дикорастущих сородичей (McIntosh *et al.*, 1995, 2008; Friebe *et al.*, 1996). Однако большое количество найденных генов по различным причинам оказалось невостребованным в создании улучшенных генотипов (Friebe *et al.*, 1996). В первую очередь, это может быть связано с тем, что интрогрессивные сегменты хромосом, кроме полезных генов, часто содержат генетический материал, который может негативно влиять на проявление агрономически ценных признаков (Zeven *et al.*, 1983; Friebe *et al.*, 1996; Labuschagne *et al.*, 2002; Maghirang *et al.*, 2006). Так, было показано, что присутствие фрагмента от *Aegilops umbellulata* с геном *Lr9* значительно снижает урожайность у линий мягкой пшеницы (Ortelli *et al.*, 1996; Friebe *et al.*, 1996). Известным примером нежелательного влияния чужеродного

материала является ген *Lr19*, происходящий из генома *Agropyron elongatum*. Использование его в сортах мягкой пшеницы ограничено в странах, отдающих предпочтение муке белого цвета, поскольку ген *Lr19* сцеплен с геном Y, увеличивающим количество желтого пигмента в эндосперме (Knott, 1968; Uhrin *et al.*, 2008). С другой стороны, Singh с соавт. (1998) обнаружили положительное влияние хромосомного сегмента с геном *Lr19* на урожайность. Присутствие в геноме гена устойчивости к листовой ржавчине *Lr38* может приводить к значительному снижению урожая зерна (Dyck, Friebe, 1993; Mebrate *et al.*, 2008). Было показано, что ген *Lr47*, источником которого является *Aegilops speltoides*, оказывает негативное влияние на агрономические и качественные признаки (Brevis *et al.*, 2008). Присутствие в геноме пшенично-ржаной транслокации 1B.1R, в которой находятся гены *Lr26*, *Pm8*, *Sr31*, довольно часто приводит к ухудшению качества муки и хлеба (Kumlay *et al.*, 2003). Кроме того, негативное влияние чужеродного материала может быть связано с плейотропным действием самих генов устойчивости. Так, показано, что локус *mlo* устойчивости ячменя к мучнистой росе вызывает снижение урожайности зерна на 4 % (Kjær *et al.*, 1990, Brown, 2002).

Негативное влияние чужеродного материала ограничивает использование в селекции ряда генов устойчивости, перенесенных от сородичей пшеницы. В то же время большое количество форм и линий с генами устойчивости к различным болезням, перенесенными из генома сородичей, успешно использованы в практической селекции (Qi *et al.*, 2007).

Исследования, проводимые на отдаленных гибридах, фокусируются преимущественно на поиске новых генов устойчивости и переносе их в коммерческие сорта. При этом в подобных работах практически отсутствуют данные по влиянию чужеродных интрогрессий на другие хозяйственно полезные признаки.

Вид *Triticum timopheevii* Zhuk. обладает комплексным иммунитетом к большинству грибных заболеваний пшеницы. Ряд генов устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr36* и *Sr37*), к мучнистой росе (*Pm6*, *Pm27* и *Pm37*) и бурой ржавчине (*Lr18*) был перенесен от *T. timopheevii* в мягкую пшеницу (McIntosh *et al.*, 2008). Но потенциал этого вида еще далеко не исчерпан к настоящему моменту.

Ранее в ИЦиГ СО РАН на основе скрещивания мягкой пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 29 с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* были созданы гибридные линии, обладающие высокой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине и мучнистой росе (Budashkina, Kalinina, 2001). Молекулярно-генетический анализ показал, что они имеют множественные замещения/транслокации в различных хромосомах мягкой пшеницы, и выявил три локуса *QLr.icg-5B*, *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* в хромосомах 5B, 2A и 1A, определяющих устойчивость линий к бурой ржавчине (Леонова и др., 2002, 2008). Поскольку исходные гибридные линии из-за множественного характера интрогрессии достаточно сложно использовать в селекционном процессе в качестве доноров генов резистентности, была создана серия линий, содержащих единичные фрагменты *T. timopheevii* или их комбинации (Салина и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010).

Целью данной работы было определить с помощью молекулярно-генетических и цитологических методов хромосомную локализацию и размеры интрогрессированных фрагментов у линий мягкой пшеницы и оценить влияние различных фрагментов интрогрессии *T. timopheevii* и их комбинаций на устойчивость к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 15 интрогрессивных линий мягкой пшеницы (BC_3F_{3-5}), содержащих единичные фрагменты генома *T. timopheevii* и их комбинации (табл. 1). Интрогрессивные линии были получены путем трех возвратных скрещиваний гибридных родительских линий 744 и 832 (*T. aestivum* − *T. timopheevii*, $2n = 42$) с сортом Саратовская 29 и последующего самоопыления (Салина и др., 2008). Растения интрогрессивных линий, контрольного сорта Саратовская 29 и гибридных родительских линий выращивали на экспериментальном участке ГНУ СибНИИСХ Россельхозакадемии (г. Омск) в 2009–2010 гг., экспериментальном участке ИЦиГ СО РАН

Таблица 1

Характеристика протяженности интрогрессивных фрагментов от *T. timopheevii* по данным молекулярного анализа

Хромосома *T. aestivum*	Интрогрессивный фрагмент	Родительская линия-донор фрагмента	Локус устойчивости к бурой ржавчине	SSR маркеры*, фланкирующие фрагменты транслокации	Размер интрогрессивного фрагмента в сМ по данным ITMI
1A	$1A^t$	832	*QLr.icg-1A*	*Xgwm0691-Xgwm0633*	91,8
2A	$2A^t$	832	*QLr.icg-2A*	*Xgwm1036-Xgwm0372*	14,5
2B	2G(1)**	832		*Xgwm0257-Xgwm0785*	174,9
2B	2GL(2)**	744		*Xgpw1109-Xgwm0846*	106,0
5B	5GL	832	*QLr.icg-5B*	*Xgwm1246a-Xcfe229*	77,8
6B	6G(1)**	744		*Xgwm0361-Xgwm0219*	145,3
6B	6GL(2)**	744		*Xgwm1199-Xgwm0219*	100,7

Примечание. Для иллюстрации длины и локализации интрогрессивных фрагментов использовались карты сцепления ITMI популяции (Ganal, Röder, 2007).
* Маркеры, использованные в анализе:
1A/$1A^t$ – ***Xgwm***: 33, 99, 164, 357, 633, 691, 750, 752, 1104, 1097, 148, 1223, 1148, 778; ***Xgpw*** – 7072, 7258a.
2A/$2A^t$ – ***Xgwm***: 95, 312, 372, 726, 614, 830, 846, 1151, 1198, 1115, 1036, 1070b, 1256, 739; ***Xgpw***-7501a.
2B/2G – ***Xgwm***: 120, 148, 257, 630, 785a, 846, 1027, 1048, 526, 1067, 1128, 1177, 619, 1070a; ***Xgpw***-1109, 7501b.
5B/5G – ***Xgwm***: 234, 540, 213, 371, 408, 499, 814, 1054, 1257, 1043, 777, 604, 1246, 1072; ***Xcfe***-229.
6B/6G – ***Xgwm***: 613, 1255, 816, 361, 518, 626, 785b, 1199, 1076, 889, 1233, 219.
** Цифры 1 и 2 маркируют разные по длине интрогрессивные фрагменты одной и той же хромосомы *T. timopheevii*.

(Новосибирская область) в 2009–2010 гг. и экспериментальном участке ГНУ СибНИИРС Россельхозакадемии в 2009–2010 гг. (Новосибирская область), далее в тексте обозначенных как поле/участок 1, 2 и 3 соответственно. Растения выращивали на делянках шириной 50 см, по 30 зерен в ряду с расстоянием между рядами 20 см.

Выделение ДНК и микросателлитный анализ. Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу Плашке с соавт. (Plaschke *et al.*, 1995). В работе были использованы микросателлитные маркеры *Xgwm* (Ganal, Röder, 2007), *Xgpw* (Sourdille *et al.*, 2004), *Xcfe* (Zhang *et al.*, 2005) с известной локализацией в хромосомах *T. aestivum* и *T. timopheevii* (Salina *et al.*, 2006a). Процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли с использованием меченого праймера M13 и немеченых праймеров к микросателлитным локусам согласно методике Hayden с соавт. (2002). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems) в 6 %-м денатурирующем полиакриламидном геле. Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы Peak Scanner (Applied Biosystems) относительно стандартных образцов ДНК известной длины.

ДНК-зонды. Повторяющаяся последовательность Spelt1 с длиной мономера 178 п.н. была выделена из *Ae. speltoides* и клонирована в плазмидный вектор pBluescript II SK + (Salina *et al.*, 2006b). Последовательность pSc119.2 с длиной мономера 120 п.н. изолирована из генома *Secale cereale* L. и клонирована в плазмидный вектор pBR322 (Bedbrook *et al.*, 1980). Зонды pSc119.2 и Spelt1 локализуются в основном в хромосомах B- и G-геномов (Jiang, Gill, 1993, 1994; Salina *et al.*, 2006b).

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

С-бэндинг. С-окрашивание проводили с соответствии со стандартной методикой, согласно Badaeva с соавт. (1994).

Оценка устойчивости к болезням. Оценку устойчивости к болезням полученных интрогрессивных линий и родительских форм проводили на стадии взрослых растений.

Учет поражения листовой ржавчиной проводили по шкале Майнса и Джексона: 0 – иммунный тип, отсутствие симптомов поражения; 1 – весьма устойчивый, очень мелкие пустулы с некрозом; 2 – умеренно устойчивый, пустулы мелкого и среднего размера с некрозом или хлорозом; 3 – умеренно восприимчивый, пустулы средней величины без некроза; 4 – весьма восприимчивый, пустулы крупные, зачастую сливающиеся вместе, участков омертвевшей ткани нет (Mains, Jackson, 1926). Устойчивость оценивали два раза – на стадии выхода растения в трубку и стадии молочной спелости зерна.

Симптомы поражения мучнистой росой оценивались по шкале учета интенсивности поражения растений зерновых культур мучнистой росой от 0 до 9 баллов: 1–3 – чувствительные растения, 4–5 – умеренно восприимчивые, 6 – умеренно устойчивые, 7–9 – весьма устойчивые (Saari, Prescott, 1975).

Анализ устойчивости к стеблевой ржавчине проводили в полевых условиях на стадии восковой спелости по унифицированной шкале типов реакций растений зерновых культур к стеблевой ржавчине: 0 – иммунность, признаки болезни отсутствуют; R – устойчивость, хлоротические или некротические пятна, пустулы отсутствуют; MR – умеренная устойчивость, небольшие пустулы, окруженные хлоротическими или некротическими пятнами; M – гетерогенный тип, пустулы различного размера, окруженные хлоротическими и некротическими пятнами или без них; MS – умеренная восприимчивость; S – восприимчивость, пустулы крупные, иногда сливающиеся, часто с хлорозом, но без некроза (Roelfs *et al.*, 1992). Оценку интенсивности поражения растений проводили согласно модифицированной шкале Кобба в процентах (площадь покрытия листьев и стеблей пустулами) (Peterson *et al.*, 1948; Roelfs *et al.*, 1992).

Анализ количественных признаков. Анализ элементов структуры урожая проводили по 7 количественным признакам, определяющим продуктивность растений. Признаки оценивались три раза: на участке 1 в 2009 и 2010 гг. и на участке 2 в 2010 г. Оценка признаков проводилась для 20 случайно выбранных растений для каждой интрогрессивной линии и родительских форм. В работе оценивали следующие показатели: высота растения, длина колоса, число колосков в колосе, число зерен в колосе, число зерен с растения, масса зерна в колосе, масса зерна с растения, масса 1000 зерен.

Статистический анализ. Сравнение количественных признаков проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа (Фактор – генотип). Достоверность межгрупповых различий оценивали по критерию множественных сравнений LSD Фишера. Достоверность внутриклассового коэффициента корреляции при оценке влияния окружающей среды (фактор – поле) на формирование количественных признаков оценивали с помощью критерия Фишера. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы STATISTICA 8.0.

Результаты

Молекулярно-генетическая и цитологическая характеристика интрогрессивных линий *T. aestivum–T. timopheevii*

Для более детального анализа геномного состава и протяженности фрагментов интрогрессии из коллекции интрогрессивных линий *T. aestivum–T. timopheevii*, полученных ранее методом маркер-опосредованного отбора, было выбрано 15 линий, содержащих участки интрогрессии в 1, 2, 5 и 6 группах гомеологичных хромосом (Салина и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010). Интрогрессивные линии были проанализированы с использованием трех методических подходов, а именно: SSR-анализа, *in situ* гибридизации и С-окрашивания. Результаты оценки геномного состава и протяженности фрагментов представлены в табл. 1 и 2.

SSR-анализ с использованием от 12 до 16 маркеров на каждую изучаемую хромосому позволил уточнить протяженность области интрогрессии у отобранных интрогрессивных линий. Так, было показано, что интрогрессивные фрагменты в хромосоме 1A у изучаемых линий 5352-70, 5352-79, 5352-83 и 5352-104 имеют одинаковую длину и захватывают существенную часть короткого и часть длинного плеча хромосомы (табл. 1). Область интрогрессии у линий 5352-83, 5352-104 и 5360-191/5 в хромосоме 2A существенно короче, затрагивает центромерную область и не отличается по про-

Таблица 2

Характеристика геномного состава интрогрессивных линий мягкой пшеницы по результатам молекулярно-генетического и цитологического анализа

N	Линия[1]	SSR анализ	FISH	C-окрашивание
1	3862-5[2]	2GL(2)	2GL	2GL
2	3862-15[2]	2GL(2)	2GL	2GL
3	3869-47	6GL(2)	6GL	6GL
4	3869-50	6G(1)	6GL	6GL
5	3869-51	6GL(2)	6GL	6GL
6	5352-70	**1A^t**, **2G**(1) 5GL	5GL	**2GS**, 5GL
7	5352-79	**1A^t** 5GL	5GL	5GL
8	5352-83	**1A^t**, **2A^t**	–	–
9	5352-104	**1A^t**, **2A^t**	–	–
10	5360-107	**2G**(1)	–	**2GS**
11	5366-157	5GL	5GL	5GL
12	5366-171	5GL	5GL **3GL**	5GL
13	5366-180	5GL	5GL	5GL
14	5360-191/5	**2A^t**, 5GL	5GL	5GL
15	5360-191/28	5GL	5GL	5GL
16	744	**1A^t**, 2G, **5A^{t}L**, 5GL, 6G	2G, **4GL**, 5GL[3], 6G	2G, **4GL**, 5GL[3], 6G
17	832	1At, **2A^t**, **2GS**, **3A^{t}L**, **5A^{t}L**, 5GL	1A^t, **3GL**, **4GL**, 5GL	1A^t, **2A^t**, **2GS**, **4GL**, 5GL, **6A^{t}L**[4]

Примечание. Жирным шрифтом выделены фрагменты интрогрессии от *T. timopheevii*, которые выявляются только одним или двумя методами.
[1] Линии под номерами 3862, 3869 получены от исходной линии 744; линии под номерами 5352, 5360, 5366 – от 832.
[2] У линий хромосома 2D замещена на транслоцированную хромосому 2BS.2GL, состав 2-й гомеологичной группы: 2A, 2B, 2BS.2GL.
[3] Негомеологичная транслокация 5DS.5GL.
[4] Негомеологичная транслокация 6DS.6DL-6A^{t}L.

тяженности между линиями. Линии, имеющие интрогрессию от *T. timopheevii* в хромосоме 2B, делятся на две группы в зависимости от протяженности участка интрогрессии. У линий 5352-70 и 5360-107 интрогрессия затрагивает большую часть короткого и небольшую часть длинного плеча, а у линий 3862-5, 3862-15 – только длинное плечо хромосомы 2B. Транслокация в хромосоме 5B у линий 5352-70, 5352-79, 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5 и 5360-191/28 имеет одинаковую протяженность и находится в теломерной области длинного плеча. При определении длины фрагмента интрогрессии в хромосоме 6B было выявлено 2 типа линий, у которых область интрогрессии затрагивала или оба плеча (линия 3869-50), или только длинное плечо (3869-47 и 3869-51).

С учетом того что теломерные и гомеологичные транслокации не всегда можно однозначно выявить SSR маркерами, родительские гибридные линии 744 и 832 и отобранные интрогрессивные линии были проанализированы методами флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и дифференциальным C-окрашиванием. Зонд Spelt1, являющийся видоспецифичным для *Ae. speltoides* (Salina *et al.*, 2006b), присутствует на хромосомах пшеницы *T. timopheevii* и отсутствует в геноме мягкой пшеницы сорта Саратовская 29, что позволяет эффективно использовать данный зонд при анализе гибридов мягкой пшеницы с указанными видами. Все сайты повтора Spelt1 имеют субтеломерную локализацию на хромосомах 2A^t, 6A^t, 1G, 2G, 4G, 5G, причем размеры сигналов в зависимости от хромосомы варьируют.

С помощью цитологического анализа были подтверждены перестройки в хромосомах 2B, 5B, 6B у изучаемых интрогрессивных и

родительских гибридных линий, выявленные SSR-анализом. Так, например, наличие локуса Spelt1 на хромосоме 2B у линий 3862-5 (рис. 1, г, табл. 2) и 3862-15 позволило выявить присутствие в их геномах фрагмента 2G от *T. timopheevii*. У линий 3869-47, 3869-50 и 3869-51 методом *in situ* гибридизации было показано, что на длинном плече хромосомы 6B блоки повтора pSc119.2 имели то же расположение, что и на длинном плече хромосомы 6G *T. timopheevii*. С-окрашивание подтвердило наличие протяженных транслокаций 6BS-6GS.6GL и 6BS.6BL-6G в геномах данных линий. У линий 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5 (рис. 1, е) и 5360-191/28 методом FISH был обнаружен сайт повтора Spelt1, локализованный на длинном плече хромосомы 5B, что говорит о присутствии в геномах линий транслокации 5BS.5BL-5GL. Данная транслокация при С-окрашивании выявляется по интенсивно окрашенному терминальному бэнду на длинном плече хромосомы 5B. FISH на метафазных хромосомах линии 5352-70 выявила присутствие транслокации 5BS.5BL-5GL по расположенному в длинном плече сигналу Spelt1. Дифференциальное окрашивание хромосом линии, кроме интрогрессивного фрагмента 5GL, позволило выявить в геноме интрогрессивный фрагмент 2G от *T. timopheevii* (табл. 2).

Кроме того, были обнаружены транслокации, затрагивающие хромосомы 3B, 4B, и отмечены случаи гомеологичных транслокаций в хромосомы 5D, 6D, не выявляемые SSR анализом. Так, у родительской гибридной линии 832 и линии 5366-171 (рис. 1, в) блок повтора pSc119.2, расположенный на длинном плече хромосомы 3B, указывает на присутствие транслокации 3BS.3BL-3GL. Транслокация 4BS.4BL-4GL не была обнаружена с помощью молекулярного анализа, но выявлялась методом *in situ* по наличию сигнала пробы Spelt1 и С-окрашиванием по яркому терминальному бэнду (рис. 1, а, б). В гибридной линии 744 была обнаружена негомеологичная транслокация интрогрессивного фрагмента 5GL в длинное плечо хромосомы 5D (рис. 1, б). Гомеологичная транслокация, затрагивающая хромосому 6D, была выявлена методом С-окрашивания у линии 832 (рис. 1, а). Яркий терминальный бэнд, локализованный на длинном плече хромосомы 6D, нетипичен для данной хромосомы. Это дает нам возможность предположить наличие у данной линии транслокации фрагмента хромосомы 6G от *T. timopheevii* в длинное плечо хромосомы 6D. Однако отсутствие других цитологических маркеров не позволяет точно определить происхождение транслоцированного фрагмента.

Сопоставление данных трех методических подходов по оценке геномного состава указывает на то, что наиболее точное описание структуры генома и хромосомных перестроек, возникающих при гибридизации видов с частичной гомеологией хромосом, можно дать с использованием только комплексного молекулярно-генетического и цитологического анализа (табл. 2). Использование такого подхода позволило также установить сложную реорганизацию, произошедшую во второй гомеологичной группе хромосом во время создания гибридов *T. aestivum–T. timopheevii*. Так, у гибридной линии 744 возникла транслокация 2BS.2GL, которая в процессе беккроссирования вытеснила не хромосому 2B, что следовало ожидать, а хромосому 2D (рис. 1, б, табл. 2).

Таким образом, из 15 отобранных линий для изучения влияния чужеродных транслокаций на проявление хозяйственно ценных признаков 10 линий полностью различаются по геномному составу, из них 4 линии имеют от одной до двух сестринских линий со сходным характером интрогрессии. Следует также отметить, что линии с транслокациями в хромосомах 5B, 2A и 1A несут локусы *QLr.icg-5B*, *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* соответственно, определяющие устойчивость линий к бурой ржавчине, согласно ранее проведенному анализу на гибридных линиях 832 и 744 (Леонова и др., 2008).

Характеристика интрогрессивных линий на устойчивость к болезням

Оценку устойчивости интрогрессивных линий к грибным болезням проводили в различных регионах Западной Сибири в 2009 и в 2010 гг., отличающихся погодными характеристиками и инфекционной нагрузкой. Погодные условия в 2010 г. оказались более благоприятными для развития заболеваний, и инфекционный фон в целом был выше, чем в 2009 г. В табл. 3 приводится характеристика устойчивости по

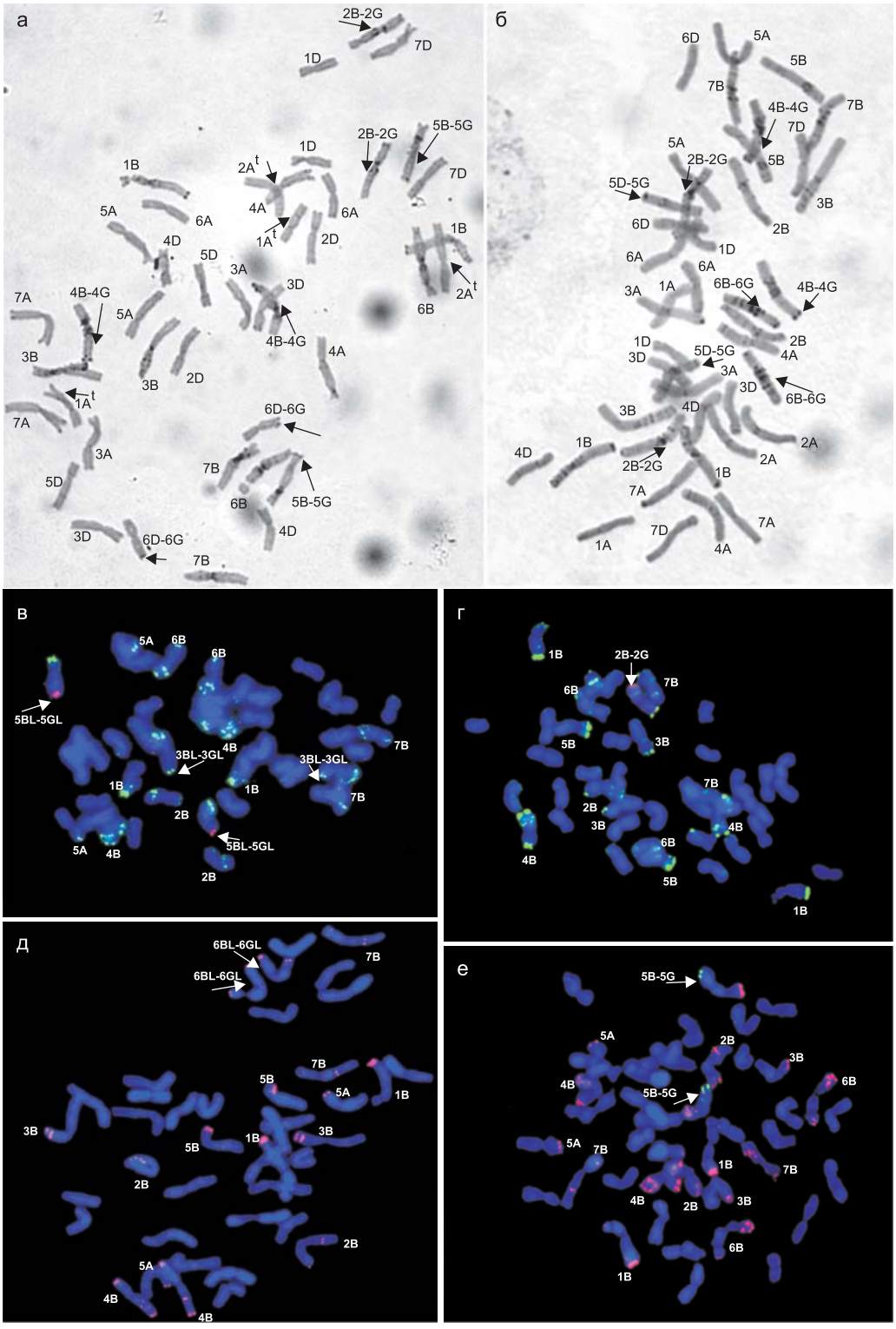


Рис. 1. С-окрашивание метафазных хромосом 832 (а) и 744 (б). FISH на метафазных хромосомах интрогрессивных линий 5366-171 (в), 3862-5 (г), 3869-47 (д), 5360-191/5 (е). в, г – проба pSc 119.2 мечена биотином и выявлена с помощью FITC (зеленый); проба Spelt-1 мечена дигоксигенином и выявлена родамином (красный). д, е – проба pSc 119.2 мечена дигоксигенином и выявлена с помощью родамина (красный); проба Spelt-1 мечена биотином и выявлена FITC (зеленый). Стрелками указаны транслокации фрагментов *T. timopheevii*.

Таблица 3

Характеристика линий мягкой пшеницы по типу интрогрессии и устойчивости к бурой и стеблевой ржавчинам, мучнистой росе

Линия	Интрогрессивные фрагменты от *T. timopheevii* (генотип по данным всех подходов)	Мучнистая роса 2009/2010, поле 2, балл	Мучнистая роса 2009/2010 поле 1, балл	Бурая ржавчина, 2009/2010, поле 2, балл	Стеблевая ржавчина, 2010, поле 1, %**	Стеблевая ржавчина, 2010, поле 2, %
3862-5	2GL(2)	4/4	3/2	4/4	70/30**	5R-MR
3862-15	2GL(2)	4/4	3/2	4/4	80/20	5R-MR
3869-47	6GL(2)	4/3	3/2	4/4	70/50	nd
3869-50	6G(1)	4/3	3/2	4/4	80/40	50S
3869-51	6GL(2)	4/4	4/2	4/4	80/40	nd
5352-70	**1A^t** 2G(1) **5GL**	6/5	6/4	**0-1/1**	50/20	40MS-S
5352-79	**1A^t 5GL**	3/4	nd/nd	**0-1/1**	nd*	nd
5352-83	**1A^t 2A^t**	nd	nd/nd	3/3	nd	nd
5352-104	**1A^t 2A^t**	4/5	5/3	3/3	80/30	nd
5360-107	2G(1)	3/4	4/2	4/4	60/40	50MS-S
5366-157	**5GL**	nd	nd/nd	**1/1**	**nd**	60MS-S
5366-171	**3GL 5GL**	4/4	4/4	**1/1-2**	**10/10**	50MS-S
5366-180	**5GL**	4/4	6/4	**1/1-2**	**15/5**	60MS-S
5360-191/5	**2A^t 5GL**	4/4	5/3	**1/1-2**	**50/10**	50MS-S
5360-191/28	**5GL**	3/4	5,5/2	**1/1-2**	**10/5**	nd
744	**1A^t**, 2G, 4GL 5A^{t}L, **5GL**, 6G	8/7	7/6	0/1	10/5.	0R
832	**1A^t**, **2A^t**, 2GS, 3A^{t}L, 3GL, 4GL, 5A^{t}L, **5GL**, 6A^{t}L	8/7	8/7	0/0	15/ е.п.	0R
Саратовская 29	–	3-4/3	4/3	4/4	80/50	60S

Примечание. Жирным шрифтом выделены хромосомы, несущие локусы устойчивости к бурой ржавчине; nd – данные отсутствуют; ** % поражения лист/стебель, е.п. – единичные пустулы.

двум сезонам для максимума развития болезней. Гибридные родительские линии 744 и 832 во всех полевых опытах проявили высокую устойчивость к бурой и стеблевой ржавчине, а также к мучнистой росе.

Оценка устойчивости к бурой ржавчине проводилась в 2009 и 2010 гг. на экспериментальных участках 2 и 3. Развитие бурой ржавчины у анализируемых линий в течение двух сезонов проходило сходным образом. Устойчивость на уровне 0–1 балла по шкале Майнса–Джексона проявили линии с единичными интрогрессивными фрагментами хромосомы 5G, содержащие локус устойчивости *QLr.icg-5B*, и линии, содержащие этот локус в комбинации с другими фрагментами *T. timopheevii* (табл. 3). Присутствие в геноме линий 5352-83 и 5352-104 транслокаций 1A^t и 2A^t с минорными локусами устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* оказывало сдерживающий эффект на проявление болезни (балл = 3). Так, в сезон 2010 г. развитие болезни у линий с локусами *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* проявилось на неделю позже по сравнению с контрольным сортом. Восприимчивый сорт Саратовская 29 и все линии с единичными фрагментами из хромосом 6G и 2G *T. timopheevii* были существенно поражены бурой ржавчиной (балл = 4).

Устойчивость к мучнистой росе оценивали в 2009–2010 гг. на участках Новосибирской и Омской областей. Все линии, за исключением линии 5352-70, показали умеренно восприимчи-

вый тип реакции и практически не отличались от родительского сорта Саратовская 29.

Инфекционный фон для возбудителя стеблевой ржавчины в 2009 г. был низким, поэтому позднее и слабое развитие стеблевой ржавчины (< 20 % пустул на листе) не позволило выявить значимые различия среди интрогрессивных линий. Оценка поражения стеблевой ржавчиной проводилась на участках 1 и 2 в 2010 г. Было показано, что линии 3862-5 и 3862-15, содержащие в геноме фрагмент хромосомы 2GL, оказались устойчивыми к расам стеблевой ржавчины, характерным для Новосибирской области (табл. 3). Все другие линии были полностью восприимчивыми к данному заболеванию и не отличались от сорта Саратовская 29. На участке 1 в Омске при оценке линий на устойчивость к стеблевой ржавчине было обнаружено, что слабовосприимчивый защитный ответ проявляют линии 5352-70, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5 и 5360-191/28 с транслокацией 5BS.5BL-5GL (15/10 % пустул на листьях/стеблях соответственно). Восприимчивость всех остальных линий оказалась намного выше (на уровне 70/40 %), что аналогично контрольному сорту (80/50 %) (табл. 3).

Характеристика интрогрессивных линий по количественным признакам

Выбранные линии позволяют оценить влияние как индивидуальных интрогрессивных фрагментов, так и их комбинаций на формирование количественных признаков. Оценка линий проводилась на экспериментальных участках 2 в 2010 г. и 1 в течение двух сезонов 2009 и 2010 гг. Полученные данные представлены на рис. 2–4. В целом интрогрессивные линии по отдельным показателям превышали родительские гибридные линии 744 и 832 и почти не отличались от сорта Саратовская 29.

Анализ количественных признаков в полевых условиях проводился для 15 интрогрессивных линий. Поскольку сравнение линий с одинаковыми фрагментами от *T. timopheevii* в геноме с контрольным сортом Саратовская 29 выявляло сходные закономерности, то на рисунках представлены только 9 линий с разными комбинациями фрагментов *T. timopheevii*.

Высота растения. Среднее значение этого параметра варьировало от 103,20 ± 0,75 см на участке 1 в 2009 г. до 119,13 ± 0,58 на поле 2 в 2010 г. Однако межлинейные различия при сравнении с родительским сортом были одинаковыми для обоих экспериментальных участков. Было обнаружено, что линии 3862-5 и 3862-15 с транслокациями 2BS.2GL достоверно ниже ($p < 0{,}005$ для полей 1 и 2) родительского сорта Саратовская 29 по высоте. При этом для исходных гибридных линий 744 и 832, которые тоже содержат в геноме фрагменты хромосомы 2G, снижения по высоте не отмечено.

Продуктивность у пшеницы складывается из многих признаков, наиболее важными из них являются длина колоса, число колосков в колосе, масса зерна с растения и масса зерна с колоса.

Длина колоса и число колосков в колосе. Было обнаружено, что линии 744 и 832, 5352-70 и 5352-104 имеют достоверно большую длину колоса, чем сорт Саратовская 29 ($p < 0{,}005$). Однако данные по анализу числа колосков не указывают на существование корреляции между

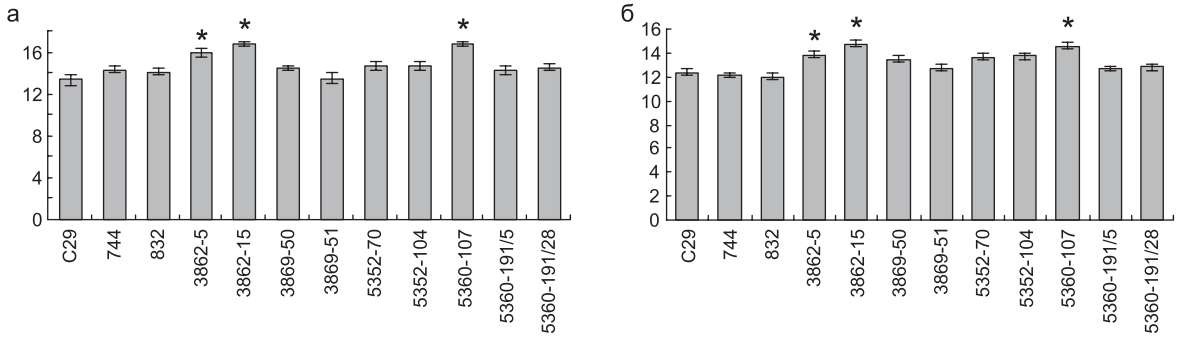


Рис. 2. Характеристика интрогрессивных линий по признаку «число колосков в главном колосе».

а – поле 1, 2009 г.; б – поле 2, 2010 г. * Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0{,}005$.

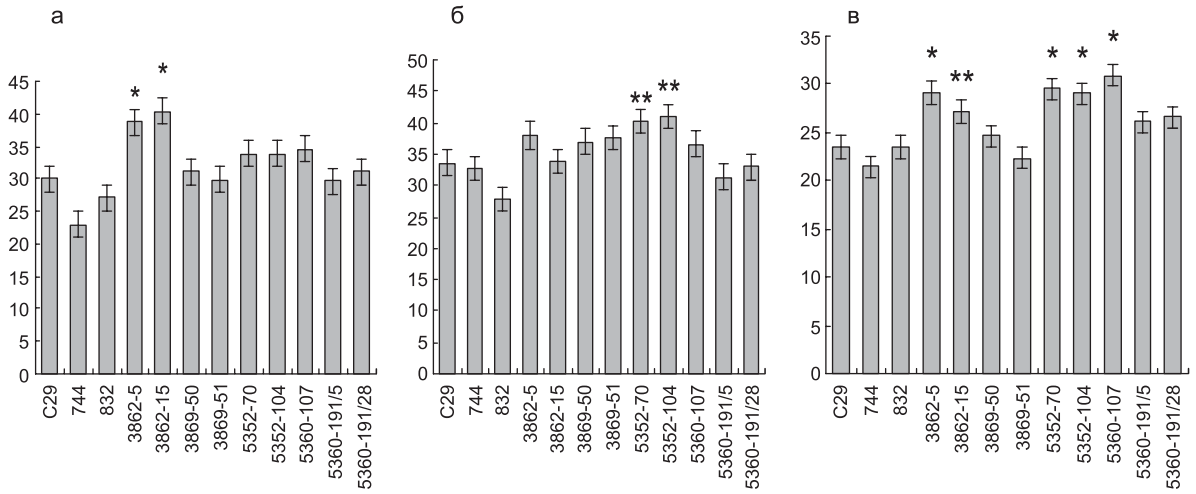


Рис. 3. Характеристика интрогрессивных линий по признаку «число зерен в главном колосе».

а – поле 1, 2009 г.; б – поле 1, 2010 г.; в – поле 2, 2010 г. *, ** Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0{,}005$; $p < 0{,}05$.

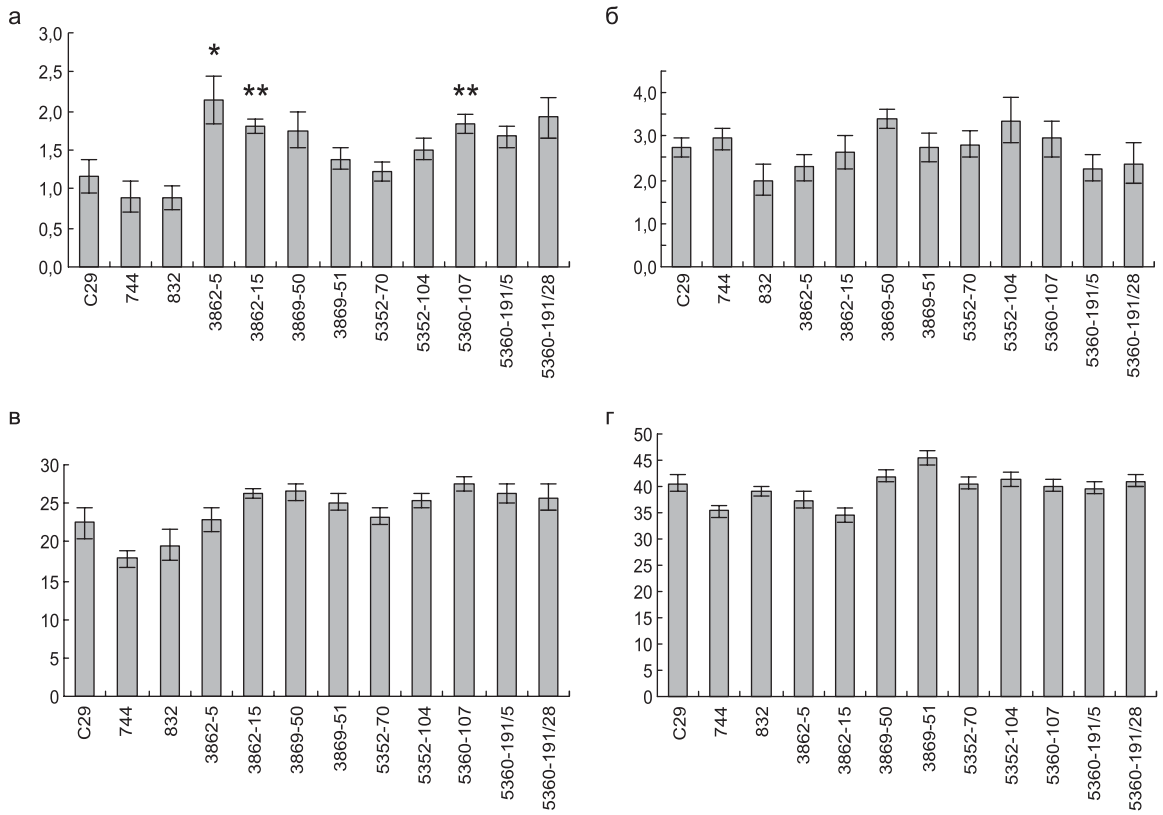


Рис. 4. Характеристика интрогрессивных линий по признакам «масса зерна с растения» (а, б) и «вес 1000 зерен» (в, г).

а, в – поле 1, 2009 г.; б, г – поле 1, 2010 г. *, ** Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0{,}005$; $p < 0{,}05$.

длиной колоса и числом колосков в колосе. Это, возможно, объясняется снижением плотности колоса у линий с длинным колосом. Ни одна из интрогрессивных линий не уступала по числу колосков исходному сорту. Этот показатель был достоверно выше у линий 3862-5, 3862-15 и 5360-107 на участках 1 и 2 (рис. 2). У изученных интрогрессивных линий среднее

число колосков в колосе колебалось в пределах 12,7–16,8 шт. на участках 1 в 2009 и 2010 гг. и на участке 2 в 2010 г. Так, например, на участке 1 в 2009 г. наибольшие значения по этому признаку были у линий 3862-5 (15,90 ± 0,43), 3862-15 (16,80 ± 0,20), 5352-107 (16,70 ± 0,26), тогда как у Саратовской 29 этот показатель в среднем был ниже (13,30 ± 0,54). В сумме по двум параметрам (длина колоса и число колосков) было выявлено три линии 3862-5, 3862-15 и 5360-107 с наилучшими характеристиками, превышающими показатели исходного сорта Саратовская 29 (табл. 4).

Число зерен в колосе. Число зерен в главном колосе в среднем соответствовало уровню родительского сорта Саратовская 29. Наилучшие значения по этому признаку отмечены для линий 3862-5, 3862-15, 5352-70, 5352-104, 5360-107. Достоверно отличаются от Саратовской 29 по двум годам линии 5352-70, 5352-104, 5352-107 (участки 1 и 2 в 2010 г.) и линии 3862-5, 3862-15 (участки 1 в 2009 г. и 2 в 2010 г.) (рис. 3).

Масса зерна в колосе и с растения и масса 1000 зерен. Данные, полученные в 2010 г. на экспериментальном участке 1 по массе зерна, были исключены из анализа, поскольку показатели контрольного сорта были значительно снижены из-за высокого уровня развития болезней.

Среднее значение массы зерна в колосе у всех линий в основном соответствовало уровню исходного сорта. Большие значения по этому признаку отмечены для линий 3862-5 и 3862-15 в условиях 2009 г. и для линий 5352-70, 5352-104, 5360-107 в 2010 г., которые, как было отмечено выше, имеют хорошие показатели и по другим признакам колоса. Однако достоверных отличий для всех изученных линий по двум годам не выявлено.

Наиболее важный признак, характеризующий продуктивность, – масса зерна с растения – варьировал у анализируемого материала в среднем от 1,95 до 3,40 г. Средние значения за разные годы на участке 1 по массе зерна заметно варьируют, но в целом закономерности для линий сохраняются, и среднее значение этого параметра в основном соответствовало уровню родительского сорта. Вероятно, различия обусловлены флюктуациями погодных условий и инфекционного фона. Достоверные отличия от родительского сорта для некоторых линий обнаруживаются в 2009 г., что связано с нетипично низкими показателями родительского сорта и с более низкими показателями в целом для линий (рис. 4). По признаку «масса 1000 зерен» все линии достоверно не отличались от родительского сорта.

Однофакторный дисперсионный анализ по оценке вклада среды в формирование четырех количественных признаков (длина колоса, число колосков в колосе, число зерен с колоса и масса зерна с колоса) у интрогрессивных линий показал, что практически у всех линий признак «масса зерна с колоса» достоверно находится в зависимости от условий среды, отличающихся по годам (табл. 4). Значительная зависимость признака «число колосков в колосе» от условий среды показана для линии 3862-15. Для трех линий (3862-15, 3869-47 и 3869-51) и сорта Саратовская 29 показано, что в значительной степени формирование признака «число колосков» зависит от условий среды.

Обсуждение

Создание и использование в селекции интрогрессивных линий мягкой пшеницы с небольшими фрагментами чужеродного материала являются предпочтительными по сравнению с замещенными и дополненными линиями. В этой работе мы охарактеризовали 15 интрогрессивных линий с материалом от *T. timopheevii*. Проведенный анализ с помощью молекулярных маркеров и цитологическими методами позволил определить размеры интрогрессивных фрагментов хромосом $1A^t$, $2A^t$, 2G, 5G и 6G *T. timopheevii* и уточнить их локализацию в геноме линий. Полученные данные позволили провести изучение влияния различных фрагментов интрогрессии *T. timopheevii* и их комбинаций на проявление хозяйственно ценных признаков мягкой пшеницы.

Вклад транслокаций от *T. timopheevii* в формирование устойчивости к заболеваниям

Устойчивость к бурой ржавчине. Главный локус устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B*, определяющий более половины проявления признака, расположен в небольшой теломерной

Таблица 4

Оценка некоторых количественных признаков продуктивности
и анализ однофакторного дисперсионного комплекса (фактор – поле)
по некоторым количественным признакам
продуктивности интрогрессивных линий и родительских форм

Линия	Признак	$X \pm s_x$			r_{wr}	F
		Поле 1, 2009 г.	Поле 1, 2010 г.	Поле 2, 2010 г.		
3862-5	Длина колоса, см	8,95 ± 0,26	8,40 ± 0,43	7,74 ± 0,18	0,22	3,82
	Число колосков в колосе, шт.	15,90 ± 0,43	15,00 ± 0,58	13,85 ± 0,31	0,28*	4,86
	Число зерен в колосе, шт.	38,70 ± 1,78	36,00 ± 2,87	29,36 ± 1,34	0,21	3,71
	Масса зерна с колоса, г	1,01 ± 0,09	1,41 ± 0,12	0,66 ± 0,05	0,53**	12,09
3862-15	Длина колоса, см	8,80 ± 0,21	8,05 ± 0,24	7,35 ± 0,21	0,26*	4,60
	Число колосков в колосе, шт.	16,80 ± 0,20	14,30 ± 0,47	14,76 ± 0,29	0,59***	15,59
	Число зерен в колосе, шт.	40,30 ± 2,40	33,80 ± 1,79	27,06 ± 1,45	0,49**	10,43
	Масса зерна с колоса, г	1,15 ± 0,09	1,20 ± 0,08	0,69 ± 0,06	0,56***	13,59
3869-47	Длина колоса, см	8,20 ± 0,19	7,98 ± 0,24	7,65 ± 0,26	0,02	1,22
	Число колосков в колосе, шт.	14,40 ± 0,37	13,40 ± 0,27	13,25 ± 0,32	0,17	2,99
	Число зерен в колосе, шт.	29,30 ± 1,23	34,90 ± 2,37	21,45 ± 0,87	0,44**	8,88
	Масса зерна с колоса, г	0,84 ± 0,05	1,46 ± 0,12	0,67 ± 0,06	0,74**	29,46
3869-51	Длина колоса, см	7,70 ± 0,17	7,95 ± 0,27	7,10 ± 0,19	0,08	0,29
	Число колосков в колосе, шт.	13,50 ± 0,52	14,40 ± 0,43	12,75 ± 0,24	0,17	3,03
	Число зерен в колосе, шт.	29,90 ± 2,07	37,60 ± 1,95	22,35 ± 0,99	0,43**	8,39
	Масса зерна с колоса, г	0,85 ± 0,70	1,74 ± 0,11	0,66 ± 0,05	0,75***	30,27
5352-70	Длина колоса, см	9,40 ± 0,32	8,48 ± 0,28	8,74 ± 0,25	0,11	2,25
	Число колосков в колосе, шт.	14,60 ± 0,41	14,90 ± 0,41	13,7 ± 0,25	0,20	3,47
	Число зерен в колосе, шт.	33,82 ± 2,53	40,20 ± 1,89	29,55 ± 1,15	0,42**	8,35
	Масса зерна с колоса, г	0,90 ± 0,09	1,73 ± 0,12	0,73 ± 0,05	0,75	31,65
5352-104	Длина колоса, см	9,10 ± 0,37	9,62 ± 0,38	8,60 ± 0,18	0,10	2,16
	Число колосков в колосе, шт.	14,70 ± 0,36	14,8 ± 0,29	13,75 ± 0,24	0,18	3,26
	Число зерен в колосе, шт.	33,80 ± 2,04	41,00 ± 2,75	29,05 ± 1,04	0,38*	7,19
	Масса зерна с колоса, г	1,01 ± 0,09	1,79 ± 0,12	0,81 ± 0,05	0,73***	27,57
5360-107	Длина колоса, см	8,35 ± 0,26	8,33 ± 0,27	7,47 ± 0,16	0,16	2,97
	Число колосков в колосе, шт.	16,70 ± 0,26	15,40 ± 0,76	14,58 ± 0,27	0,20	3,43
	Число зерен в колосе, шт.	34,60 ± 1,78	36,60 ± 2,99	30,95 ± 1,12	0,01	1,06
	Масса зерна с колоса, г	1,13 ± 0,07	1,55 ± 0,12	1,13 ± 0,06	0,42**	8,14
5360-191/5	Длина колоса, см	7,75 ± 0,17	7,04 ± 0,23	6,90 ± 0,19	0,14	2,60
	Число колосков в колосе, шт.	14,20 ± 0,44	13,00 ± 0,59	12,70 ± 0,27	0,16	2,95
	Число зерен в колосе, шт.	29,70 ± 2,29	31,30 ± 1,89	26,10 ± 0,89	0,08	1,92
	Масса зерна с колоса, г	0,80 ± 0,11	1,29 ± 0,09	0,82 ± 0,05	0,50**	11,10
5360-191/28	Длина колоса, см	8,40 ± 0,21	7,83 ± 0,22	7,12 ± 0,38	0,22	3,90
	Число колосков в колосе, шт.	14,50 ± 0,27	13,70 ± 0,26	12,85 ± 0,24	0,27*	4,76
	Число зерен в колосе, шт.	31,10 ± 1,44	33,00 ± 1,38	26,60 ± 1,14	0,04	0,66
	Масса зерна с колоса, г	0,91 ± 0,07	1,43 ± 0,09	1,01 ± 0,06	0,49**	10,42
744	Длина колоса, см	9,55 ± 0,25	8,87 ± 0,16	9,00 ± 0,25	0,17	3,10
	Число колосков в колосе, шт.	14,30 ± 0,30	13,90 ± 0,31	12,15 ± 0,27	0,33*	5,87
	Число зерен в колосе, шт.	22,90 ± 2,22	32,70 ± 2,26	21,50 ± 1,03	0,41**	7,83
	Масса зерна с колоса, г	0,43 ± 0,06	1,23 ± 0,08	0,64 ± 0,05	0,78***	36,82

Окончание таблицы 4

Линия	Признак	$X \pm s_x$			r_{wr}	F
		Поле 1, 2009 г.	Поле 1, 2010 г.	Поле 2, 2010 г.		
832	Длина колоса, см	10,05 ± 0,25	9,01 ± 0,29	9,15 ± 0,26	0,11	2,25
	Число колосков в колосе, шт.	14,11 ± 0,37	12,50 ± 0,48	12,00 ± 0,28	0,47**	9,76
	Число зерен в колосе, шт.	27,31 ± 2,04	27,80 ± 2,13	23,47 ± 1,23	0,24	4,11
	Масса зерна с колоса, г	0,57 ± 0,09	1,12 ± 0,08	0,87 ± 0,06	0,59**	15,14
С 29	Длина колоса, см	7,75 ± 0,27	7,76 ± 0,23	7,15 ± 0,21	0,21	3,69
	Число колосков в колосе, шт.	13,30 ± 0,54	14,20 ± 0,29	12,37 ± 0,29	0,25*	4,28
	Число зерен в колосе, шт.	30,10 ± 1,98	33,50 ± 1,48	23,52 ± 1,16	0,42**	8,26
	Масса зерна с колоса, г	0,74 ± 0,09	1,46 ± 0,07	–	0,05	2,00

$X \pm s_x$ – среднее значение и среднее отклонение; r_{wr} – доля влияния фактора поля в формировании количественных признаков при однофакторном дисперсионном анализе; F – критерий Фишера. С29 – Саратовская 29, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

транслокации от *T. timopheevii* в хромосоме 5B, не превышающей 20 % от размера длинного плеча (Леонова и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010). Транслокация 5BS.5BL-5GL, выявляемая по темному теломерному бэнду на дифференциально окрашенных хромосомах, была впервые описана Бадаевой с соавт. (Badaeva *et al.*, 1991). В 1994 г. M. Yamamori (1994) была показана связь между устойчивостью к бурой ржавчине сортов мягкой пшеницы и присутствием в их геноме данной транслокации. Из литературы известно, что в хромосоме 5G у *T. timopheevii* ssp. *timopheevii* локализован ген *Lr18*, который находится в теломерной области длинного плеча (Yamamori, 1994). Ранее нами на основании молекулярного анализа и теста на устойчивость было показано, что картированный в области расположения *QLr.icg-5B* локуса ген *LrTt2* отличается от гена *Lr18* и представляет, по-видимому, новый более эффективный аллель данного гена, который также имеет происхождение из генома *T. timopheevii* (Leonova *et al.*, 2010).

В нашей работе было показано, что присутствие локуса *QLr.icg-5B* в геноме мягкой пшеницы является достаточным для приобретения устойчивости к популяции бурой ржавчины, характерной для Западно-Сибирского региона России. Присутствие в геноме только минорных локусов *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* от *T. timopheevii* оказывает сдерживающий эффект на развитие болезни и не приводит к развитию гиперчувствительного ответа. Поскольку полигенная устойчивость с большей вероятностью будет более эффективной, чем моногенная, данные локусы могут быть использованы в селекционных программах для объединения с другими генами и локусами с целью создания генотипов, обладающих расонеспецифической устойчивостью широкого спектра.

Устойчивость к мучнистой росе. У пшениц группы Timopheevi к настоящему моменту идентифицировано 4 гена устойчивости к мучнистой росе. В длинном плече $7A^t$ хромосомы расположены ген *Pm37,* выявленный у *T. timopheevii* subsp. *armeniacum*, и временно обозначенный ген MlAG12 (Perugini *et al.*, 2008; Maxwell *et al.*, 2009). В мягкую пшеницу был перенесен ген устойчивости к мучнистой росе *Pm27*, картированный в хромосоме 6G (Järve *et al.*, 2000). Однако из-за сниженного уровня рекомбинации между хромосомами 6B и 6G точная локализация данного гена на хромосоме не определена (Järve *et al.*, 2000). В нашей работе линии 3869-47, 3869-50 и 3869-51, несущие транслокации фрагмента 6GL, не обладали устойчивостью к расам мучнистой росы, типичным для Западной Сибири. Отсутствие устойчивости у данных линий может быть связано либо с уменьшением размера транслоцированного фрагмента 6GL в процессе беккроссирования, либо с неэффективностью аллеля, присутствовавшего в геноме донора.

Аналогичные результаты получены при анализе на устойчивость к мучнистой росе линий с фрагментами хромосомы 2G. В хромосоме 2G был картирован ген устойчивости к мучнистой росе *Pm6.* Но, по результатам нашей работы,

линии 3862-5, 3862-15, 5352-70 и 5352-107, содержащие в геноме интрогрессивные фрагменты 2G, не обладали устойчивостью к мучнистой росе и не отличались по устойчивости от контроля. На основании полученных данных можно предположить, что если геном *T. timopheevii*, использованный в качестве донора генов резистентности, содержит ген *Pm6* в хромосоме 2G, то он расположен либо вне области транслокаций, захватывающих разные по длине фрагменты хромосомы 2G у изученных интрогрессивных линий, либо присутствует в виде неэффективного аллеля.

Устойчивость к стеблевой ржавчине. Хотя линии 3862-5 и 3862-15 содержат интрогрессивный фрагмент 2G в гетерозиготе, они оказались устойчивыми к популяции стеблевой ржавчины Западной Сибири, характерной для Новосибирской области.

А.И. Моргуновым были оценены интрогрессивные линии (3862-5, 5352-70, 5352-104, 3869-47, 3869-50, 3869-51, 5366-180 и 5360-191/28) и родительские формы (линии 744 и 832) на устойчивость к расам стеблевой ржавчины, характерным для Африки (Моргунов. Устное сообщ.). Результаты оценки показали, что линия 3862-5 и гибридные родительские линии, содержащие в геноме интрогрессивный фрагмент 2GL от *T. timopheevii*, проявляют устойчивость на уровне 5R-MR к африканским расам стеблевой ржавчины. Уровень заболевания всех остальных тестируемых линий был выше и находился в пределах 40–60 % пустул на листе (MS-S). Оценка динамики поражения показала, что у линии 3862-5 с момента появления первых симптомов на нижних листьях и стебле растений развивался умеренно восприимчивый тип защитного ответа, не отличающийся от такового у остальных линий. Однако в течение последующих двух недель распространения заболевания у данной линии не происходило и оставалось на уровне 5 % пустул на листе (R-MR) (Моргунов. Устное сообщ.).

В хромосоме 2G у *T. timopheevii* обнаружен ген устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr36* (Roelfs *et al.*, 1992; Tsilo *et al.*, 2008). Для данного гена показано сцепление с микросателлитными маркерами *Xgwm319-2B*, *Xstm773-2-2B*, *Xwmc477-2B*, локализующимися в районе центромеры (Tsilo *et al.*, 2008). В настоящий момент нет данных о более точном расположении данного гена на хромосоме из-за сниженного уровня рекомбинации между хромосомами 2B и 2G и предпочтительного наследования хромосомы 2G и ее фрагментов в поколениях. Этот ген широко распространен в сортах мягкой пшеницы по всему миру, благодаря высокой эффективности против стеблевой ржавчины Ug99 (раса TTKSK) (Jin *et al.*, 2009). Однако начиная с 2007 г. устойчивость линий и сортов пшеницы, содержащих ген *Sr36*, преодолевается новой африканской расой стеблевой ржавчины, TTTSK, выявленной в Кении (Jin *et al.*, 2009). Поскольку ответ на поражение стеблевой ржавчиной в Кении у интрогрессивной линии 3862-5 не является иммунным и аналогичен описанным в литературе данным по устойчивости форм мягкой пшеницы с геном *Sr36*, то можно предположить, что линии 3862-5 и 3862-15 содержат этот ген устойчивости в геноме.

Нами был проведен анализ с помощью ПЦР интрогрессивных линий, содержащих в геноме фрагменты хромосомы 2G, с использованием маркера *Xstm773-2-2B*, сцепленного с геном *Sr36* (рис. 5). У линий 3862-5 и 3862-15 с транслокацией 2GL специфичный для *T. timopheevii* фрагмент присутствует в гетерозиготе и отсутствует у линий 5352-70 и 5360-107 с транслокацией 2G(1). Сравнивая размер и расположение транслоцированных фрагментов у данных линий (табл. 1, 2) с литературными данными, можно

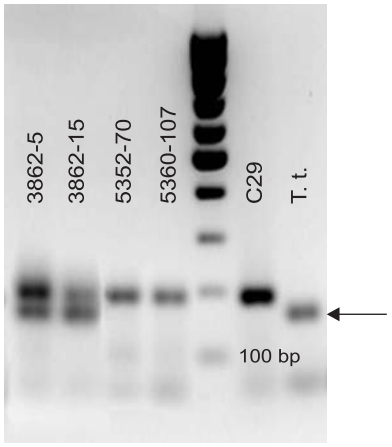


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к локусу *Xstm773-2-2B* у интрогрессивных линий 3862-5, 3862-15, 5352-70 и 5360-107 с фрагментами 2G в геноме.

предположить, что наиболее вероятное расположение данного гена – в длинном плече хромосомы 2B, ближе к центромерной области.

Несмотря на то что *Sr36* не является эффективным против всех рас стеблевой ржавчины, он, тем не менее, имеет высокую селекционную ценность. Уязвимость моногенной устойчивости к стеблевой ржавчине требует пирамидирования генов при создании устойчивых форм (Tsilo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009). В селекционных программах ген *Sr36* может быть объединен с другими генами или локусами для создания форм, обладающих устойчивостью широкого спектра.

Интрогрессивные линии 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5, 5360-191/28 и 5352-70 с интрогрессивным фрагментом 5G проявляли устойчивость к расам стеблевой ржавчины, характерным для Омска на участке 1, но оставались полностью чувствительными к популяции стеблевой ржавчины в Новосибирской области на экспериментальном участке 2, а также к популяции стеблевой ржавчины в Кении (Моргунов. Устное сообщ.). Этот факт позволяет предположить, что интрогрессивный фрагмент 5G, кроме главного локуса устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B*, содержит сцепленный с ним неизвестный ранее расоспецифичный локус устойчивости к стеблевой ржавчине. Примеры подобного сцепления генов устойчивости встречаются у злаков довольно часто. Так, широко распространенная в сортах мягкой пшеницы транслокация 1BL.1RL содержит сцепленные гены устойчивости *Sr31*, *Yr9*, *Lr26* и *Pm8* (Friebe *et al.*, 1996). Интрогрессивный фрагмент хромосомы 2G от *T. timopheevii* несет сцепленные гены *Sr*36 и *Pm*6, встречающиеся с высокой частотой в американских и австралийских сортах мягкой пшеницы (Jorgensen, Jensen, 1973; Friebe *et al.,* 1996; Bariana *et al.,* 2001; Jin, Singh, 2006). От *Ag. elongatum* в мягкую пшеницу перенесены сцепленные гены *Lr19/Sr25* и *Lr24/Sr24* (Friebe *et al.,* 1996).

Влияние транслокаций от *T. timopheevii* на урожайность и другие количественные признаки

Интрогрессия в мягкую пшеницу небольших фрагментов генома отдаленных видов при сохранении генетического окружения коммерческого сорта является обычным подходом для изучения и использования ресурса ценных аллелей, которые присутствуют в геноме диких видов. Анализ количественных признаков у 15 интрогрессивных линий в сравнении с родительским сортом Саратовская 29 позволяет сделать некоторые выводы о влиянии интрогрессивных фрагментов от *T. timopheevii* на формирование фенотипа. Так, растения линий 3862-5 и 3862-15 с транслокацией 2BS.2GL являются самыми низкорослыми по сравнению с остальным интрогрессивными линиями и родительским сортом Саратовская 29. Поскольку создание сортов с короткой соломиной является предпочтительным в селекции на устойчивость к полеганию, эти линии могут иметь практическую ценность в селекционных программах. По литературным данным, практически все хромосомы в различной степени оказывают влияние на высоту растения. К настоящему моменту описан 21 ген, определяющий уменьшение высоты у пшеницы, однако лишь несколько из них широко используются (Liu *et al.*, 2005). Было показано, что данный признак у мягкой пшеницы контролируется генами, в основном находящимися в хромосомах 2-, 3-, 4- и 6-й гомеологичных групп. Несколько генов у пшеницы были картированы в хромосомах 2A, 2B и 2D (McIntosh *et al.*, 1995). Возможно, *T. timopheevii* содержит в длинном плече хромосомы 2G гомеологичный ген, обусловливающий снижение длины растения. Так как низкорослые формы имеют преимущество перед высокорослыми растениями как более устойчивые к полеганию в условиях ливневых дождей и влажности, сопровождающихся ветрами, данная транслокация может иметь практическое значение для использования в сортах западносибирского экотипа.

Также нами было обнаружено небольшое положительное влияние фрагмента 2GL на число зерен в главном колосе и число колосков в колосе, отношение которых определяет признак озерненности колоска.

Следует отметить, что у всех изученных линий за исключением исходных гибридных линий 744 и 832 с множественными интрогрессиями от *T. timopheevii* не отмечено отрицательного влияния на показатели продуктивности, а в некоторых случаях, перечисленных выше,

наоборот, показан положительный эффект. Это также относится и к двум группам линий: 1) 3862-5 и 3862-15; и 2) 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5, 5360-191/28 и 5352-70, выделяющихся по устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине соответственно.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что линии, содержащие в геноме интрогрессивные фрагменты с локусами устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине, могут представлять интерес для их использования в селекционном процессе. Не исключено, что линии, несущие транслокации от *T. timopheevii* в другие участки хромосом, также могут нести адаптивно значимые гены, проявляющиеся в других климатических условиях.

Благодарности

Авторы статьи выражают признательность профессору Marion Röder из Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (г. Гатерслебен, Германия) за предоставление молекулярных маркеров, использованных в работе. Авторы статьи благодарят доктора биологических наук Е.Д. Бадаеву из Института молекулярной биологии им. Энгельгарта в Москве за консультации и помощь в освоении методик.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы РФ (Госконтракт 16.512.11.2223).

Литература

Леонова И.Н., Родер М.С., Будашкина Е.Б. и др. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* с тетраплоидной пшеницей *Triticum timopheevii* // Генетика. 2002. Т. 38. № 12. С. 1648–1655.

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

Салина Е.А., Егорова Е.М., Адонина И.Г. и др. ДНК-маркеры для генотипирования линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch и *Triticum timopheevii* Zhuk. // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 620–628.

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S. *et al*. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. P. 117–145.

Badaeva E.D., Budashkina E.B., Badaev N.S. *et al*. General features of chromosome substitutoins in *Triticum aestivum* × *T. timopheevii* hybrids // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. P. 227–232.

Bariana H.S., Hayden M.J., Ahmed N.U. *et al*. Mapping of durable adult plant and seedling resistances to stripe rust and stem rust diseases in wheat // Aust. J. Agric. Res. 2001. V. 52. P. 1247–1255.

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.

Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A. *et al*. Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47* // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 1441–1451.

Brown, J.K.M. Yield penalties of disease resistance in crops // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 339–344.

Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust // Acta Phytopathol. Entomol. 2001. 36. P. 61–65.

Dyck P.L., Friebe B. Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines // Crop Sci. 1993. V. 33. P. 687–690.

Egorova E., Leonova I., Budashkina E. *et al*. Application of marker assisted selection for transferring resistance genes from *Triticum timopheevii* to bread wheat // Proc. of the 20th Intern. Conf. on ITMI/2nd WGC Joint Workshop, 1–5 September 2010. Beijing, China. P. 78.

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

Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Genomics-assisted crop improvement / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. Springer, N.Y., 2007. P. 124.

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.

Järve K., Peusha H.O., Tsymbalova J. *et al*. Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat // Genome. 2000. V. 43. P. 377–381.

Ji J.H., Qin B., Wang H.Y. *et al*. STS markers for powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat // Euphytica. 2008. V. 163. P. 159–165.

Jiang J., Gill B.S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis // Genome. 1993. V. 36. P. 792–795.

Jiang J., Gill B.S. Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the diphyletic origin of polyploidy wheats // Chrom. Res. 1994. V. 2. P. 59–64.

Jin Y., Szabo L.J. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* // Plant Disease. 2009. V. 93. No 4. P. 367–370.

Jin Y., Singh R.P. Resistance in US wheat to recent Eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31* // Plant Dis. 2006. V. 90. P. 476–480.

Jorgensen J.H., Jensen C.J. Gene *Pm6* for resistance to powdery mildew in wheat // Euphytica. 1973. V. 22. P. 4–23.

Kjær B., Jensen H.P., Jensen J. *et al*. Associations between three *mlo* powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley // Euphytica. 1990. V. 46. P. 185–193.

Knott D.R. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying leaf rust resistance // Can. J. Genet. Cytol. 1968. V. 10. P. 695–696.

Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S. *et al.* Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat // Crop Sci. 2003. V. 43. No 5. *P. 1643–1651.*

Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobbelaar B. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29, Lr34, Lr35* and *Lr37* on breadmaking quality in wheat // Euphytica. 2002. V. 124. P. 65–70.

Leonova I.N., Budashkina E.B., Flath K. *et al*. Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat to *Triticum timopheevii* // Cereal Res. Commun. 2010. 38. P. 212219.

Liu Y., Liu D., Zhang H. *et al*. Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the XGWM261 locus in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties // Euphytica. 2005. V. 145. P. 103–112.

Maghirang E.B., Lookhart G.L., Bean S.R. *et al*. Comparison of quality characteristics and breadmaking functionality of hard red winter and hard red spring wheat // Cereal Chem. 2006. V. 83. P. 520–528.

Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. P. 89–120.

Maxwell J.J., Lyerly J.H., Cowger C. *et al*. MlAG12: a *Triticum timopheevii* derived powdery mildew resistance gene in common wheat on chromosome 7AL // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 1489–1495.

McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO Publ., Collingwood, Australia, 1995.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al*. Catalogue of Gene Symbols for Wheat // www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/. 2008.

Mebrate S.A., Oerke E.C., Dehne H.W. *et al*. Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers // Euphytica. 2008. V. 162. P. 457–466.

Ortelli, S., Winzeler H., Winzeler M. *et al*. Leaf rust resistance gene *Lr9* and winter wheat yield reduction: I. Yield and yield components // Crop Sci. 1996. V. 36. P. 1590–1595.

Perugini L.D., Murphy J.P., Marshall D. *et al*. *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii* // Theor. Appl. Genet. 2008. V. 116. P. 417–425.

Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. (Section C). 1948. 26. P. 496–500.

Plaschke J., Ganal M.W., Rцder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1001–1007.

Qi L., Friebe B., Zhang P. *et al*. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement // Chromosome Res. 2007. V. 15. P. 3–19.

Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management, CIMMYT Mexico, 1992. P. 45.

Saari E.E., Prescott J.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases // Plant Dis. Rep. 1975. V. 59. P. 377–380.

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 K.Y., Badaeva E.D. *et al*. 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.

Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S. *et al*. Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat // Crop Sci. 1998. V. 38. P. 27–33.

Sourdille P., Singh S., Cadalen T. *et al*. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Funct. Integr. Genomics. 2004. V. 4. P. 12–25.

Tao W., Liu D., Liu J. *et al.* Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 100. P. 564–556.

Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for the detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 253–261.

Uhrin A., Lбng L., Bedx Z. Comparison of PCR-based DNA markers for using different *Lr19* and *Lr24* leaf rust resistance wheat sources // Cereal Res. Commun. 2008. V. 36. No 4. P. 533–541.

Yamamori M. An N-band marker for gene *Lrl8* for resistance to leaf rust in wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 643–646.

Zeven A.C., Knott D.R., Johnson R. Investigation of linkage drag in near isogenic lines of wheat by testing for seedling reaction to races of stem rust, leaf rust and yellow rust // Euphytica. 1983. V. 32. P. 319–327.

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.

EFFECT OF CERTAIN CHROMOSOME REGIONS OF *TRITICUM TIMOPHEEVII* ON THE FORMATION OF PEST RESISTANCE AND QUANTITATIVE TRAITS IN COMMON WHEAT

E.M. Timonova[1], I.N. Leonova[1], I.A. Belan[2], L.P. Rosseeva[2], E.A. Salina[1]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: eegorova@bionet.nsc.ru;
[2] Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Novosibirsk, Russia

Summary

The effects of introgression fragments from *Triticum timopheevii* Zhuk. (2*n* = 28, AtAtGG) and their combinations on resistance to leaf rust, stem rust, powdery mildew, and some quantitative traits were assessed in 15 common wheat introgression lines. Molecular and cytological analyses of the lines demonstrated an advantage of combined use of various marker types in comprehensive characterization of hybrids and detection of translocations and substitutions. Resistance tests to various fungal diseases showed that the lines containing introgression fragments of chromosome 5G were completely resistant to the West Siberian populations of leaf rust and to the stem rust population of the Omsk region. Lines 3862-5 and 3862-15, containing a fragment of the long arm of chromosome 2G, were resistant to West Siberian stem rust populations. No negative effects of the alien genetic material on yield and other quantitative traits were noted. In addition, positive effect of the 2G chromosome fragments of *Triticum timopheevii* on ear grain number was established. Thus, the introgression lines can be used in breeding programs as donors of resistance genes to fungal diseases.

Key words: common wheat introgression lines, *T. timopheevii*, SSR analysis, *in situ* hybridization, C banding, fungus resistance, quantitative traits.

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. Трубачеева[1], Л.А. Кравцова[1], Э.П. Девяткина[1], Т.Т. Ефремова[1], М.Г. Синявская[2], 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 сородичей 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 (2*n* = 28) × *T. aestivum* (2*n* = 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 (2*n* = 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 $7H^{1mar}$ или $7H^{1}L^{mar}$, 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* × П) × П × H^2]$F_{8,11}$	2*n* = 42	2*n* = 40w + 2tb = 40w + 7H^1L^{mar}(7D)
Л-36	$BC_4F_{7,11}$:[(*H. mar* × П) × П × H^3]$F_{7,11}$	2*n* = 42	2*n* = 42w
Л-37	$BC_1F_{8,11}$:[(*H. mar* × П)Ам × П]$F_{8,11}$	2*n* = 43 2*n* = 44	2*n* = 42w + tb = 42w + 7H^1L^{mar} 2*n* = 42w + 2tb = 42w + 7H^1L^{mar}
Л-218-1	BC_4F_5: [(*H. mar* × П) × П × H^3]F_5	2*n* = 42	2*n* = 42w
Л-218-2	BC_4F_5: [(*H. mar* × П) × П × H^3]F_5	2*n* = 42	2*n* = 40w + 2b = 42w + 7$H^{1\ mar}$
Л-80	BC_4F_9: [(*H. v* × я-319) × C^3 × У]	2*n* = 42	2*n* = 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 7$H^{1\ mar}$.

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) (2*n* = 40 + 2t), у которых хромосома 7D замещена на длинное плечо хромосомы ячменя 7H^1L^{mar} (Трубачеева и др., 2009).

Аллоплазматическая рекомбинантная линия Л-80 (2*n* = 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) × *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 амфиплоиды получены в результате спонтанного удвоения числа хромосом у реципрокных гибридов. Амфиплоиды с неполным числом хромосом (2*n* = 54) выделены среди самоопыленных потомков 56-хромосомных амфиплоидов в F_2. Аллоплазматические (с цитоплазмой ржи) и эуплазматические (с цитоплазмой пшеницы) линии мягкой пшеницы, имеющие дополненные хромосомы от ржи (2*n* = 49 = 42w + 7r, 2*n* = 47 = 42w + 5r; 2*n* = 44 = 42w + 2r), выделены среди самоопыленных потомков гибридов в F_2–F_4, полученных от скрещивания 56-хромосомных реципрокных амфиплоидов 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

ttp://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 – $7H^{1mar}$) пшенично-ячменной дополненной линии Л-37 в поколениях F_8 и F_{11}; частично фертильной замещенной линии Л-218-2 (F_5, F_7); для частично фертильных и фертильных растений линии Л-32 (F_8, F_{11}). 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(F_5, F_7) и Л-36 (F_7, F_{11}), 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(F_4, F_5) и Л-416(F_4, F_5), 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 (F_9), 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
ndhH/MspI	5′-tgcatggtgttcttcgactg-3′ 5′-ggattccctcatttcaccaac-3′	250+500	750	750
infA/MspI	5′-acggaagccctacccaatg-3′ 5′-ttcaaatcttcgctatccttcg-3′	220	70+150	220
rpoB/MspI	5′-tggcacatacccgttatctc-3′ 5′-aatggaaaccctcgaatctag-3′	250+400	650	250+400
psaA/TaqI	5′-cttggatctggaacctacatg-3′ 5′-aataatcccgctaagtggtg-3′	50+400	450	50+400
Ycf5/ApaII	5′-tttctcgttgggcttcctc-3′ 5′-gcctcattagcccatactgc-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 (2*n* = 28) × *T. aestivum* L. (2*n* = 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			
					infA	*rpoB*	*psaA*	*ndhH*
Л-37 (F_8, F_{11})	*H. mar*	2*n* = 42w + tb	ч/ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
		2*n* = 42w + 2tb	ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
Л-218-1 (F_5, F_7)	*H. mar*	2*n* = 42w	ферт.	П	П	П	П	П
Л-218-2 (F_5, F_7)	*H. mar*	2*n* = 40w + 2tb	ч/ферт.	Я+П	Я	Я	Я	Я+П
Л-32 (F_8, F_{11})	*H. mar*	2*n* = 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})	*H. mar*	2*n* = 42w	ферт.	П	П	П	П	П
Л-411 (F_4, F_5)	*T. a*	2*n* = 40w + 2tb	ферт.	П	П	П	П	П
			ч/ферт.	П	П	П	П	П
Л-416 (F_4, F_5)	*T. a*	2*n* = 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. * Трубачеева 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 растений 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.

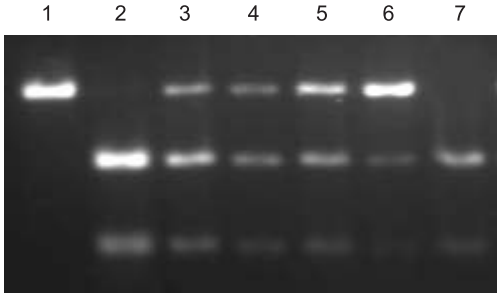


Рис. 1. Результат ПЦР-ПДРФ-анализа с районом *ndhH* хпДНК.

1 – *H. marinum* ssp. *gussoneanum*; 2 – *T. aestivum*; 3 – фертильные растения линии Л-37 (F_{11}); 4 – частично фертильные растения линии Л-37 (F_{11}); 5 – фертильные растения линии Л-32 (F_{11}); 6 – частично фертильные растения линии Л-32 (F_{11}); 7 – фертильные растения линии Л-36 (F_{11}).

Таблица 4

Характеристика аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* (2*n* = 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				
					infA	*rpoB*	*psaA*	*ndhH*	*Ycf5*
Л-80 (F_9)	*H. vulgare*	2*n* = 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 (амфиплоидов 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, амфиплоиды 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. marinum* ssp. *gussoneanum*, рожь посевная) у растений гибридного происхождения, включенных в данную работу.

При изучении реципрокных гибридов F_1, 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 – амфиплоидов 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* (2*n* = 42) (Саратовская 29) и ржи посевной *S. cereale* (2*n* = 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 *ndhH*
S. cereale × *T. aestivum*	*S. cereale*	2*n* = 28 2*n* = 7r + 21w	ч/ферт. стер.	Р+П Р+П	Р Р
Амфиплоиды	*S. cereale*	2*n* = 56 2*n* = 14r + 42w 2*n* = 54 2*n* = 12r + 42w	ферт. стер.	Р+П Р+П	Р Р
Аллоплазматические генотипы *T. aestivum* с дополненными хромосомами *S. cereale*	*S. cereale*	2*n* = 44 2*n* = 2r + 42w 2*n* = 47 2*n* = 5r + 42w 2*n* = 49 2*n* = 5r + 42w	ферт. ч/ферт. стер.	Р+П Р+П Р+П	Р Р Р
T. aestivum × *S. cereale*	*T. aestivum*	2*n* = 28 2*n* = 21w + 7r	ч/ферт. стер.	П П	П П
Амфиплоиды	*T. aestivum*	2*n* = 56 2*n* = 42w + 14r 2*n* = 54 2*n* = 42w + 12r	ферт. стер.	П П	П П
Генотипы *T. aestivum* с дополненными хромосомами *S. cereale*	*T. aestivum*	2*n* = 44 2*n* = 42w + 2r 2*n* = 47 2*n* = 42w+5r 2*n* = 49 2*n* = 42w+5r	ферт. ч/ферт. ч/ферт. стер.	П П П П	П П П П

Обозначения. r – рожь *S. cereale*, w – пшеница; Р – ржаные копии районов органелльной ДНК, П – пшеничные копии районов органелльной 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 пшеницей. 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; Трубачеева и др., 2008, 2009), а среди растений аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. marinum*)-*T. aestivum* стерильные растения встречаются крайне редко (Трубачеева 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(F_9) 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 (F_9). 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 (F_9) 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 (Maan, 1995). Подчеркнем, что у

изученной в данной работе аллоплазматической линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* Л-80 (F_9) 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. (2*n* = 14) × *Triticum aestivum* L. (2*n* = 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. (2*n* = 14) × *Triticum aestivum* L. (2*n* = 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. (2*n* = 28) × *Triticum aestivum* L. (2*n* = 42)] (2*n* = 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. (2*n* = 14) × *T. aestivum* L. (2*n* = 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. (2*n* = 28) × *Triticum aestivum* L. (2*n* = 42)] (2*n* = 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 органельных 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 (2*n* = 42) и телоцентрически дополненных линий (2*n* = 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*) (2*n* = 28) × *T. aestivum* L. (2*n* = 42) с использованием RFLP- И ПЦР-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., Apitz 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 stochiometric 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. Trubacheeva[1], L.A. Kravtsova[1], E.P. Devyatkina[1], T.T. Efremova[1], M.G. Sinyavskaya[2], 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.

УДК 577.2:631:633.111

DELLA MUTATIONS IN PLANTS WITH SPECIAL EMPHASIS ON WHEAT

© 2012 г. **G.A. Chebotar, S.V. Chebotar, Yu.M. Sivolap**

South Plant Biotechnology Center NAASU,
Odessa, Ukraine, e-mail: gchebotar@rambler.ru

Received November 24, 2011. Accepted for publication December 20, 2011.

DELLA proteins are a subfamily of transcriptional regulators from the GRAS protein family. They act as growth repressors. Gibberellins (GA) promote growth by overcoming the DELLA-mediated growth restraint. A number of dominant mutations in highly conserved orthologous DELLA genes are known in various plant species. These mutations reduce plant height owing to production of more active forms of growth repressors. The aim of the current study is to estimate the genetic similarity of DELLA nucleotide and amino acid sequences stored in GenBank and to identify mutant and wild type alleles that encode DELLAs in modern Ukrainian winter bread wheat varieties. We have performed nucleotide and amino acid sequence search and alignment of the *Rht-D1* wheat dwarfing gene and DELLA-encoding genes of other plant species with BLAST and MUSCLE software. A dendrogram illustrating phylogenetic relations among DELLA sequences of 35 plant species has been constructed using MEGA v5. In addition, PCR-based genotyping for the major wheat dwarfing genes *Rht-B1* and *Rht-D1* has been performed in wheat cultivars from different regions of Ukraine. It is shown that the mutant *Rht-D1b* allele is the commonest dwarfing allele among those tested in Ukrainian wheat cultivars (68 %), but its distribution over Ukraine is not random.

Key words: DELLA, wheat, dwarfing genes, phylogenetic relations, PCR genotyping.

Introduction

The improvement of plants by introduction of new agriculturally important genes facilitates the enhancement of productive potential. The introduction of the dwarfing genes *Rht-B1b* and *Rht-D1b* into the wheat genome reduced the plant height and resulted in 2-3 fold increase of yield in grain crops, becoming a basis for the so called «green revolution» (Borojevich, Borojevich, 2005; Bonnet *et al*., 2010; Pearce *et al*., 2011). The importance of the dwarfing genes displays the necessity of detailed understanding of the processes followed by changes in the habitus of plants after introduction of dwarfing genes.

The *Rht-B1* and *Rht-D1* genes in wheat encode DELLA-proteins (Hirsh, Oldroyd, 2009). In Figure 1, we summarize the information about structure of DELLAs from the literature. DELLA proteins consist of functional GRAS and regulatory DELLA-domain at the less conservative N-terminus of the protein (Fig. 1), that may function as a receptor for upstream GA signals (Ashikari *et al*., 2003). DELLAs N-termini show high homology to each other between 34 and 84 % similarity (Bolle, 2004). Mutations in these genes produce amino acid substitutions, deletions or insertions in the N-terminal region of the translated DELLA protein (in wheat, *Rht-B1b* and *Rht-D1b* alleles encode proteins that have deletion between DELLA and TVHYNP motifs in LExLE region). These mutations affect binding to GA-receptor and GA allowing accumulation of mutant DELLAs and repress growth.

In the nucleus, DELLA of wild type binds to GA-receptor (e.g. GID1 known for Arabidopsis), GA and SCF E3 ubiquitin ligase complex. Such a large complex is recognized by 26S proteasome and destroyed. The disappearance of DELLA proteins stimulates GA responsive processes such as seed germination, stem and root elongation, and fertility (Hirsh, Oldroyd, 2009).

In the absence of GA, or in the case of mutation in nucleotide sequence of DELLA domen, the ubiquitination becomes impossible. Accumulation of the mutant DELLA proteins cause continuous

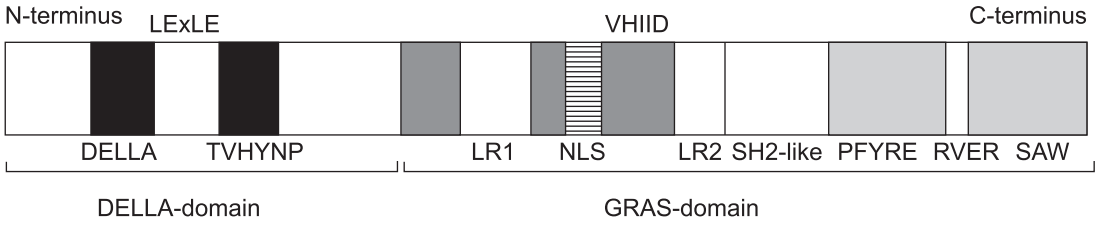


Fig. 1. Summarized scheme of DELLA protein structure according to Peng *et al*. (1997), Peng *et al*. (1999), Olszewski *et al*. (2002), Bolle (2004), and Pearce *et al*. (2011). Conserved N-terminal regulatory region consists of DELLA, LexLe and TVHYNP amino acid motifs. In the C-terminus, functional domains are indicated (LR1, LR2 – leucine rich regions; NLS – nuclear localization signals; SH2 – (Src Homology2)-like domains; VHIID, PFYRE, RVER and SAW – amino acid motifs).

growth inhibition and, accordingly, leads to agronomically advantageous dwarfed plant height and improved straw strength by inhibition of stem cell elongation (Dalrymple, 1986; Flintham *et al*., 1997; Peng *et al*., 1999).

As has been shown for barley embrio (Gubler *et al*., 2002; http://plantcellbiology.masters.grkraj.org), DELLAs repress transcription and processing of *GAMYB* gene (GA induced Amylase-beta), that is transcriptional regulator of α-amylase gene regulatory elements called *GARE* (GA response elements) and induce amylase gene expression (Fig. 2).

DELLAs inhibit growth by interfering with the activity of growth-promoting transcription factors (Harberd *et al*., 2009). Mutants of wheat, barley, and rice, that are affected in GA signaling, display an altered aleurone α-amylase response. For example, dominant mutations at the homeoallelic wheat *Rht-B1a* and *Rht-D1a* loci confer dwarfism and a reduced growth response to GA (Börner *et al*., 1996; Peng *et al*., 1999). Severely dwarfing alleles, such as *Rht-B1c*, abolish the GA response of mutant aleurone cells (Gale, Marshall, 1975; Ho *et al*., 1981; Börner *et al*., 1996).

DELLAs are conservative due to the essential role in plant cell. They help to establish GA homeostasis by direct feedback regulation on the expression of GA biosynthetic and GA receptor

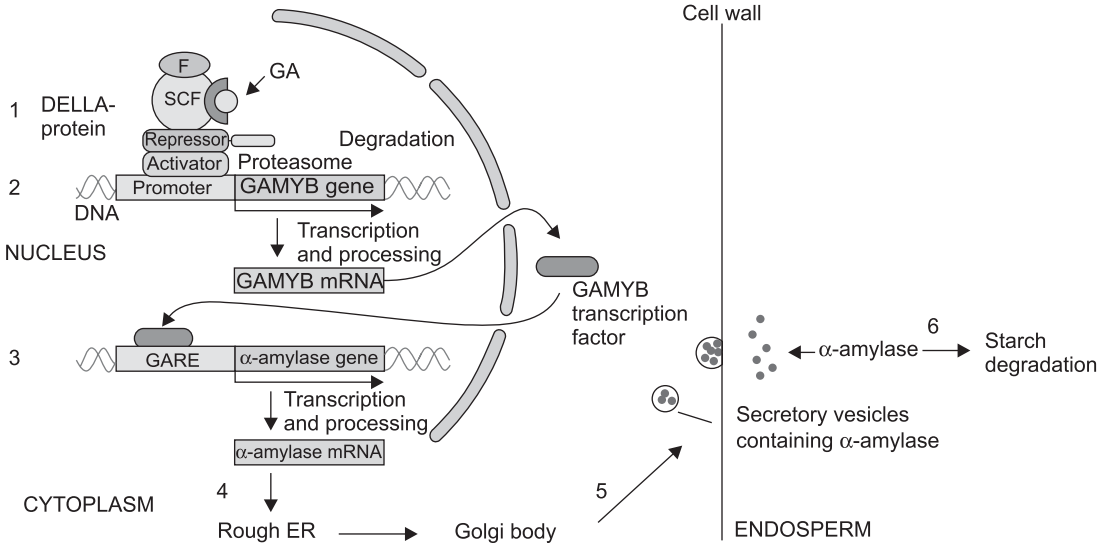


Fig. 2. Model of regulation of amylase biosynthesis by DELLA-protein (http://n0b3l1a.blogspot.com/2010/03/gibberellins-cytokinins.html) with modifications.
1 – DELLA-SCF E3 ubiquitin ligase complex degradation starts after binding with GA; 2 – the promoter of *GAMYB* gene becomes active and GAMYB transcription factor is synthesized; 3 – GAMYB transcription factor activates α-amylase gene; 4 – α-amylase and other hydrolytic enzymes are synthesized in rough endoplasmic reticulum and secreted by the Golgi body (5). Secretory vesicles go through the cell wall, and α-amylase starts the starch degradation in endosperm.

genes, and promote the expression of downstream negative components that are putative transcription factors/regulators or ubiquitin E2/E3 enzymes (Zentella *et al*., 2007). In addition, one of the putative DELLA targets, *XERICO*, promotes accumulation of abscisic acid (ABA) that antagonizes GA effects. Therefore, DELLA may restrict GA-promoted processes by modulating both GA and ABA pathways (Zentella *et al*., 2007).

DELLA-related proteins were identified in a lycophyte (*Selaginella kraussiana*) and a bryophyte (*Physcomitrella patens*) species – ancient plant groups first appeared around 400 and 430 million years ago, respectively (Yasumura, Harberd, 2006).

The aim of the current study was to estimate the genetic similarity of the DELLAs nucleotide and amino acid sequences lodged in GenBank and to detect mutant and wild type alleles that encode DELLA-proteins in Ukrainian modern winter bread wheat varieties.

Materials and Methods

Amino-acid and nucleotide sequences data of DELLAs deposited in GenBank (NCBI database available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) were used in genetic similarity analysis. In molecular analysis, winter bread wheat varieties created after 1990th in different breeding centers of Ukraine were exploited. We divided all varieties that have been involved in our investigation into three groups according to geographical position of the breeding centers. Thus, 79 varieties from Plant Breeding and Genetics Institute (Odessa), and Institute of Agriculture of Southern Region (Kherson) were assigned to the southern part; 21 varieties from Poltava State Agrarian Academy, Institute of Plant Production, Donetsk Institute of Agroindustrial production, Lugansk Institute of Agroindustrial production and Dnepropetrovsk State Agrarian University – to the eastern part; 14 varieties from the V.N. Remeslo Institute of Wheat in Mironovka, Institute of Plant Physiology and Genetics, Institute of sugar beet NAAS, and Belaya Tserkov experiment breeding station – to the central part of Ukraine.

The BLAST tool (Altschul *et al*., 1997) was used for finding homologous sequences. Multiple protein sequence alignment was done with MUSCLE software (MUSCLE tool online at ttp://www.ebi.ac.uk). Phylogenetic and molecular evolutionary analyses of protein sequences were performed using MEGA v5 program (Tamura *et al*., 2011) the UPGMA algorithm.

Total genomic DNA was extracted from seedlings using the modified CTAB method (Verbitskaya, 1998). The *Rht-B1b* and *Rht-D1b* alleles were detected as recommended by Ellis *et al*. (2002). The PCR-products were separated in 7 % PAAG. Visualization of amplification fragment was done according to Promega Technical Manual (1999).

Results and Discussion

Results of Blast and phylogenetic analysis

Based on the data that all DELLAs have similar protein structure features we chose the sequence of wheat DELLA-protein encoded by the *Rht-D1* dwarfing allele and BLASTed it against the NCBI database to compare genetic similarity level of DELLA sequences among different species. We found highly identical sequences among 35 species from different divisions: Bryophyta, Lycopodiophyta and Magnoliophyta (or Angiospermae). Among angiosperm, DELLAs were presented in monocots and dicots such as pea, wheat, rice, maize, cultural soybeans, lettuce, snapdragons, tarragon, cabbage etc. and several species of apple, *Arabidopsis*, and cotton families. These data suggest that the function of GA-signalling repression, in which DELLA takes a special role, is highly conserved within monocots and dicots (Peng *et al*., 1999; Boss, Thomas, 2002; Sun, Gubler, 2004; Muangprom *et al*., 2005). We found several sequences of grape, sorghum, rice and *Arabidopsis* proteins, predicted DELLAs, highly identical (93–100 %) to wheat DELLA-proteins.

We used MUSCLE tools to align these sequences and then MEGA v5 to estimate phylogenetic and molecular evolutionary relationship among DELLAs of different species (Fig. 3). On the dendrogram, DELLAs are divided into two clusters, one of which is formed by bryophytes and lycophytes, the most ancient species, and the second one contains flowering plants (Fig. 3). These data also have been confirmed by analysis of nucleotide sequences that encode DELLA pro-

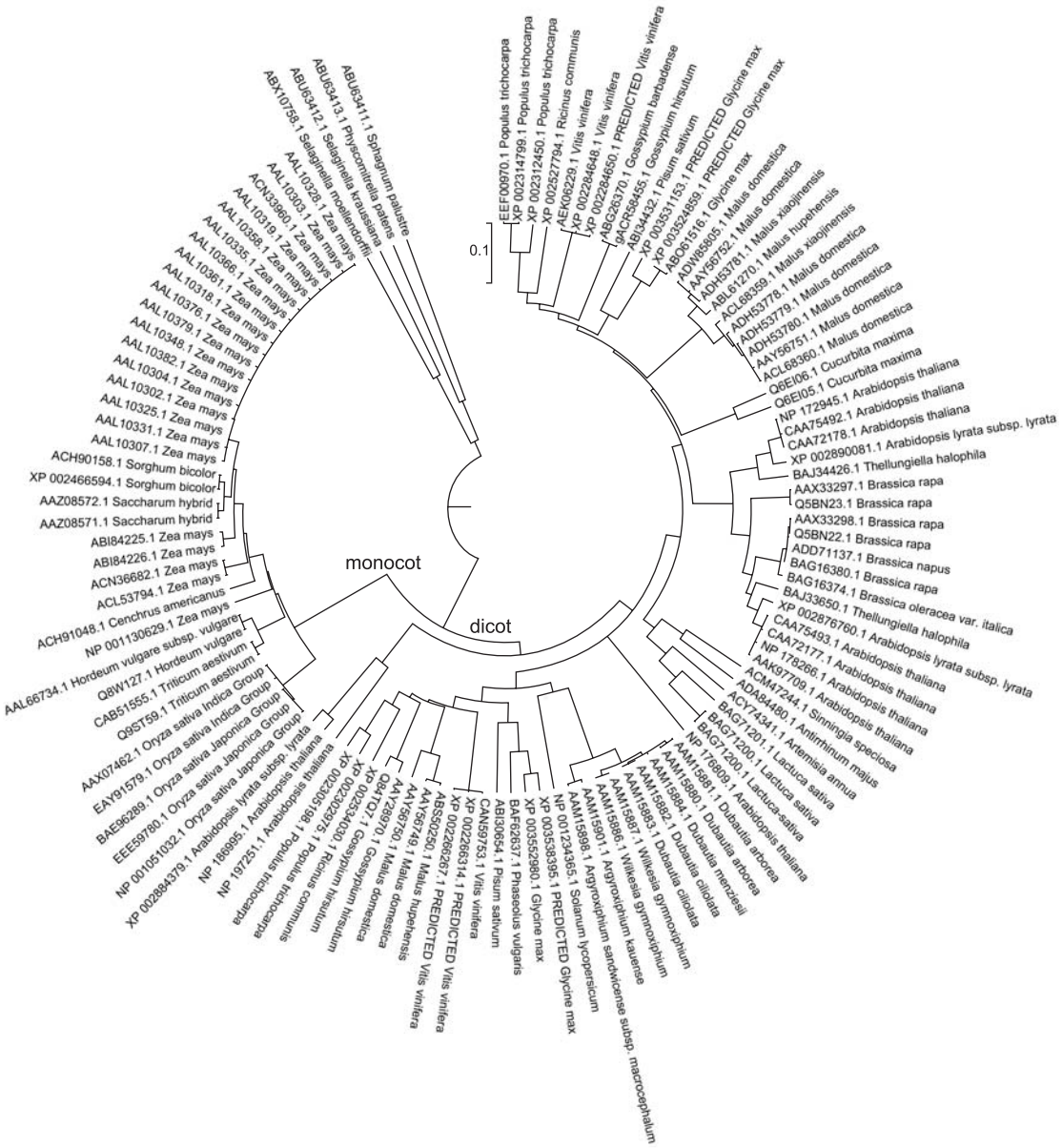


Fig. 3. Dendrogram of sequences of DELLA-proteins in plant species according to the Mega v5.

teins of these species. Angiosperm cluster consists of monocot and dicot subclusters. The cluster of monocots includes a total of 37 sequences and is divided into several subclasses (Fig. 3). The first subclass was formed by DELLAs from two accessions of *Orysa sativa indica* and three ones of *O. sativa japonica*, the second subclass is represented by *Hordeum vulgare* SLN1 protein and *Triticum aestivum* DELLA-protein Rht1, the third subclass consists of *Zea mays* d8 (dwarf 8) protein and proteins of *Saccharum hybrid*, *Sorghum bicolor*, *Cenchrus americanus*.

Among the DELLAs sequences of dicot, proteins of one species can be found in different clusters on the dendrogram, e.g. apple, grape, cotton, *Arabidopsis*, castor bean, pea and poplar. We can speculate that proteins from one species in different clusters are paralogues.

The number of gene copies that encode DELLAs in genome vary between species. In wheat, three genes *Rht-A1*, *Rht-B1* and *Rht-D1* on chromosomes 4A, 4B and 4D, respectively, are known (1 per diploid genome), having high level of sequence similarity to each other. *Rht-B1* and

Rht-D1 have many alleles that differ from the wild type alleles by single nucleotide substitutions (*Rht-B1b* and *Rht-D1b*), insertions (*Rht-B1c*), increased number of gene copies (*Rht-D1c*); introduction of premature stop codon (*Rht-B1d* and *Rht-B1e*) (Pearce *et al*., 2011). For the homoeologous locus on chromosome 4A only one allele *Rht-A1a* (wild type monomorph) is known (Voss, 2010; Pearce *et al*., 2011). There are five members of DELLA gene family in *Arabidopsis*, whereas rice (*SLN1*), maize (*d8*), barley (*SLR1*), *Brassica rapa* (*dwf2*) and grape (*Vvgai1*) contain only one known DELLA protein orthologue. These numbers of orthologs could reflect specific adaptive processes and/or differences between monocots and dicots (Bolle *et al*., 2004).

Detection of alleles of genes that encode DELLAs in wheat

Rht-B1 and *Rht-D1* encode transcription factors which belong to the DELLA proteins (Bolle, 2004; Pearce *et al*., 2011). The alleles *Rht-B1b* and *Rht-D1b* were transferred to European winter wheat from Japanese variety 'Norin 10' and increased significantly wheat production in the last century (Borojevich, Borojevich, 2005; Bonnet *et al*., 2010). With the help of molecular markers (Ellis *et al*., 2002) we have detected *Rht-B1b* and *Rht-D1b* alleles in genotypes of modern winter wheat varieties from different parts of Ukraine (Fig. 4).

The distribution of the mutations in sequences that encode DELLA proteins, analyzed among winter wheat varieties from different breeding centers of Ukraine, is shown in Fig. 5. These mutations are often used in breeding programs in wheat varieties created after 1990th in Ukraine, and the mutant allele *Rht-D1b* has higher frequency than the *Rht-B1b* allele. In the previous investigations, wheat varieties created before 1960th have been shown to have wild type alleles of the *Rht-B1a* and *Rht-D1a* genes. During 1980th, breeders started to introduce dwarfing GA-insensitive alleles in varieties from the southern part of Ukraine, on the other hand varieties from the central part of Ukraine were predominantly GA-sensitive (Chebotar, 2008).

By analysis of allele frequency we revealed, that dwarfing allele *Rht-B1b* is used in breeding programs of Ukraine rarer than its wild type variant – *Rht-B1a*. The allele *Rht-D1b* has higher frequency among tested varieties from eastern and southern parts of Ukraine than wild variant of this locus – *Rht-D1a*. For wheat varieties from the central part of Ukraine, the wild type alleles of the *Rht-B1* and *Rht-D1* genes are more common. This could be due to the priority of breeding programs and/or using special ancestral genotypes in crossing.

Conclusions

In this study, we estimated genetic similarity of the DELLAs nucleotide and amino acid sequences that are involved in gibberellin signaling pathways in plants. We summarized the information about protein sequence of DELLAs for 35 species from the NCBI database. Comparative analysis of DELLA protein sequences for all accessions in NCBI database showed subdivision on two clusters, the first one is formed by non-vascular (bryophytes) and vascular (lycophytes) land plants and the second one by seed plants. In the seed plants cluster, we have observed two quite separate subclusters – monocot and dicot.

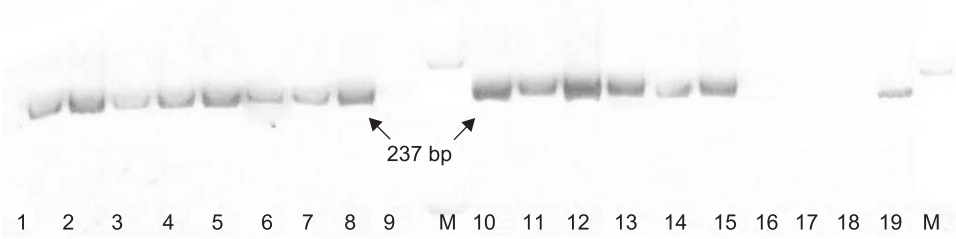


Fig. 4. Electrophoresis of allele-specific PCR-fragments derived from *Rht-D1b* allele in 7 % PAAG of wheat varieties.

1, 2 – 'Jayvir'; 3–5 – 'Ujinok'; 6–8 – 'Barviy', 9 – 'Stepnyak 1' (control line with *Rht-D1a* allele); 10–12 – 'Nebokray'; 13–15 – 'Juravka'; 16–18 – 'Turunchuk'; 19 – 'Stepnyak 2K' (control line with *Rht-D1b* allele); M – molecular weight marker pUC19/Msp I.

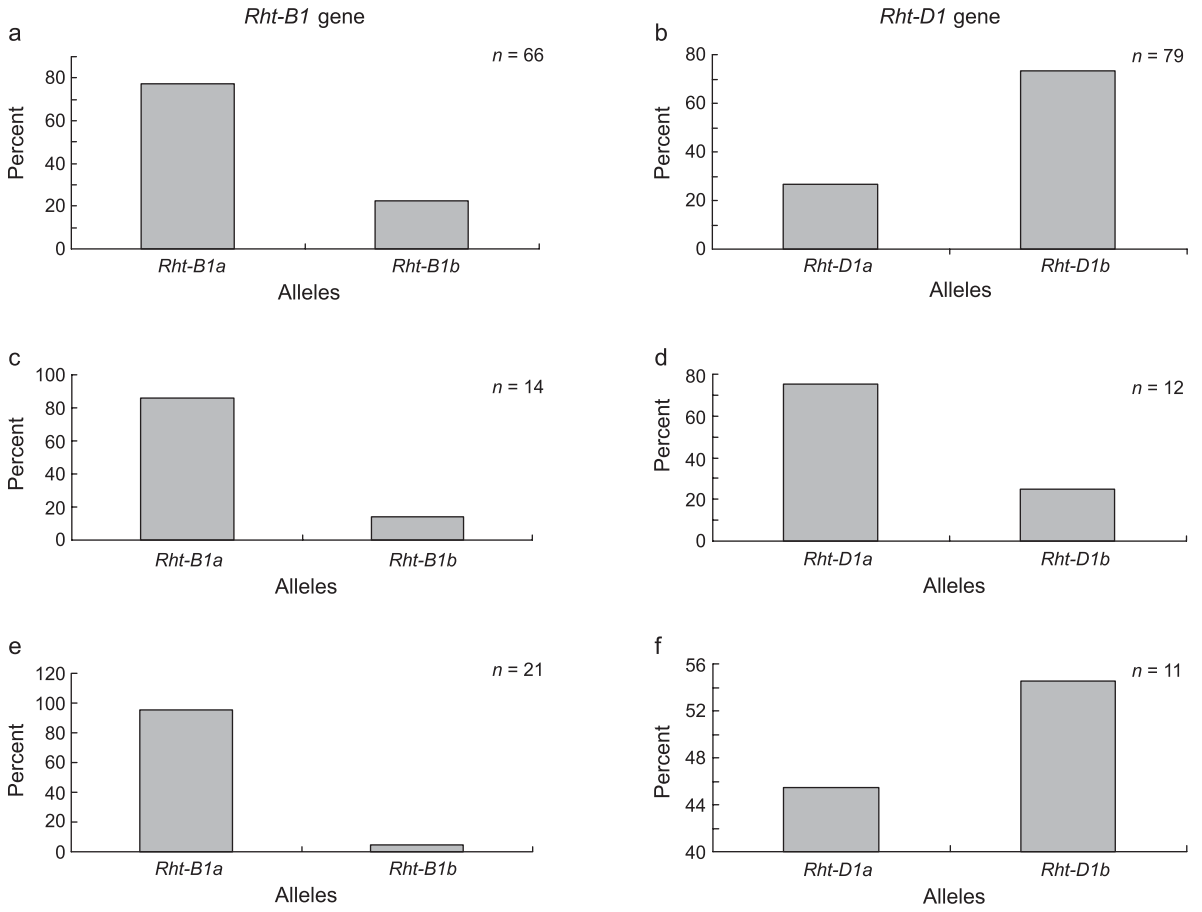


Fig. 5. Diagram of the allele frequency of *Rht-B1* and *Rht-D1* genes in winter wheat varieties of different breeding centers of Ukraine.

a, b – Southern part of Ukraine; c, d – Central part of Ukraine; e, f – Eastern part of Ukraine.

We detected mutant (*Rht-B1b*, *Rht-D1b*) and wild type (*Rht-B1a*, *Rht-D1a*) alleles that encode DELLA-proteins in Ukrainian winter bread wheat varieties created after 1990th. The allele *Rht-D1b* is the most frequently used dwarfing gene in Ukrainian varieties among tested alleles, it is presented in 68 % of wheat varieties that have been analyzed, but its distribution is not random on the territory of Ukraine.

Acknowledgement

The authors are thankful to Dr Cordelia Bolle for discussion of the scheme of DELLA-protein structure.

Literature

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 3389–3402.

Ashikari M., Itoh H., Ueguchi M., Matsuoka M. Gibberellin response and signal transduction // Gamma Field Symposia. Institute of Radiation Breeding NIAS, Japan, 2003. No 42. P. 13–21. available at http://plantcellbiology.masters.grkraj.org

Bolle C. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development // Planta. 2004. V. 218. P. 683–692.

Bonnet D.G., Ellis M.H., Rebetzke G.J. Agronomic performance of GA-responsive semidwarf wheats // 8th Intern. Wheat Conf. (June 1–4, 2010). Abstr. of oral and poster presentations. St. Petersburg, 2010. P. 155–156.

Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. The relationship between the dwarfing genes of wheat and rye // Euphytica. 1996. V. 89. P. 69–75.

Borojevic K., Borojevic K. The transfer and history of «reduced height genes» (*Rht*) in wheat from Japan to Europe // J. Heredity. 2005. V. 94. No 4. P. 455–459.

Boss P.K., Thomas M.R. Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation // Nature. 2002. V. 416. P. 847–850.

Chebotar S.V. Allelic characteristic of dwarfing genes in the

genepool of winter bread wheats of Ukraine // Plant Genet. Res. 2008. No 6. P. 96–103.

Dalrymple D.G. Development and spread of high-yielding wheat varieties in developing countries // Agency for Intern. Development, Washington, DC. 1986.

Ellis M.H., Spielmeyer 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.

Flintham J.E., Borner A., Worland A.J., Gale M.D. Optimizing wheat grain yield: effects of *Rht* (gibberellin-insensitive) dwarfing genes // J. Agric. Sci. Camb. 1997. V. 128. P. 11–25.

Gale M.D., Marshall G.A. The nature and genetic control of gibberellin insensitivity in dwarf wheat grain // Heredity. 1975. V. 35. P. 55–65.

Gubler F., Chandler P.M., White R.G. *et al.* Gibberellin signaling in barley aleurone cells: Control of SLN1 and GAMYB expression // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 191–200.

Harberd N.P., Belfield E., Yasumura Y. The Angiosperm gibberellin-GID1-DELLA drowth regulatory mechanism: How an «Inhibitor of an Inhibitor» enables flexible response to fluctuating environments // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 1328–1339. available at - www.plantcell.org 2009 American Society of Plant Biologists.

Hirsh S., Oldroyd G. GRAS-domain transcription factors that regulate plant development // Plant Signaling and Behav. 2009. V. 4. No 8. P. 1–3.

Ho T.-H.D., Nolan R.C., Shute D.E. Characterisation of a gibberellin-insensitive dwarf wheat, D6899 // Plant Physiol. 1981. V. 67. P. 1026–1031.

MUSCLE tool online available at http://www.ebi.ac.uk

Model of regulation of amylase biosynthesis by DELLA-protein available at http://n0b3l1a.blogspot.com/2010/03/gibberellins-cytokinins.html

Muangprom A., Thomas S.G., Sun T., Osborn T.C. A novel dwarfing mutation in a Green Revolution Gene from *Brassica rapa* // Plant Physiol. 2005. V. 137. P. 931–938.

NCBI database available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Olszewski N., Sun T., Gubler F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolizm and response pathways // The Plant Cell. 2002. V. 14. P. 61–80.

Pearce S., Saville R., Vaughan S.P. *et al.* Molecular characterisation of *Rht-1* dwarfing genes in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) // Plant Physiol. Preview. Published on October 19, 2011, as DOI:10.1104/pp.111.183657

Peng J., Carol P., Richards D.E. *et al.* The *Arabidopsis* GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses // Genes Dev. 1997. V. 11. P. 3194–3205.

Peng J.R., Richards D.E., Hartley N.M. *et al.* «Green revolution» genes encode mutant gibberellin response modulators // *Nature.* 1999. V. 400. P. 256–261.

Promega Technical Manual. Gene Print. STR Systems. Printed in USA. Revised. 1999. V. 7. 52 p.

Sun T., Gubler F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 197–223.

Tamura K., Peterson D., Peterson N. *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. (submitted). 2011. (Publication PDF available at http://www.kumarlab.net/publications)

Verbitskaya T.G. Methods of DNA extraction // Usage of PCR-analysis in genetics and breeding investigations / Ed. Yu.M. Sivolap. Kiev: Agrarna nauka, 1998. P. 34–40.

Voss H.-H. Inheritance of quantitative resistance and aggressiveness in the wheat/*Fusarium* pathosystem with emphasis on *Rht* dwarfing genes // Dissertation zur Erlagung des grades eines Doktors der Agrarwissenschaften. Stuttgart, Hohenheim, 2010. 56 p.

Yasumura Yu., Harberd N.P. Evolution of DELLA proteins and their role in plant growth control // available at http://ucjeps.berkeley.edu/bryolab/Moss2006/abstracts/Yuki Yasumura.pdf at @EbookBrowse

Zentella R., Zhang Z.-L., Park M. *et al.* Global analysis of della direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis // Plant Cell. 2007. V. 19. P. 3037–3057.

DELLA-МУТАЦИИ РАСТЕНИЙ НА ПРИМЕРЕ ПШЕНИЦЫ

Г.А. Чеботарь, С.В. Чеботарь, Ю.М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве НААН, Одесса, Украина,
e-mail: gchebotar@rambler.ru

Репрессоры роста растений DELLA относятся к семейству белков-регуляторов транскрипции GRAS. Гиббереллины способствуют преодолению ограничения роста растений, обусловленного влиянием DELLA. Мутации в высококонсервативных генах, кодирующих DELLA, были описаны у разных видов растений. Эти мутации приводят к снижению высоты растений за счет образования более активных форм репрессоров роста. Цель настоящего исследования состояла в оценке генетического сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей DELLA, представленных в базах данных, и определении аллелей, кодирующих DELLA у современных украинских сортов озимой мягкой пшеницы. С помощью программного обеспечения BLAST и MUSCLE, были проведены поиск и сравнительный анализ последовательностей гена *Rht-D1* и генов других растений, кодирующих DELLA. При использовании программы MEGA v5 была построена дендрограмма, иллюстрирующая сходство аминокислотных последовательностей DELLA у 35 видов растений. ПЦР-идентификация аллелей *Rht-B1* и *Rht-D1* генов короткостебельности пшеницы в сортах из разных регионов Украины показала, что наиболее часто в изученной коллекции встречается мутантный аллель *Rht-D1b* (68 %), причем распределение частот его встречаемости неоднородно на территории Украины.

Ключевые слова: DELLA-протеины, пшеница, гены короткостебельности, ПЦР-генотипирование.

УДК 631.524.633.1

ИЗУЧЕНИЕ ХОЗЯЙСТВЕННО ЦЕННЫХ И АДАПТИВНЫХ ПРИЗНАКОВ У ЛИНИЙ СОРТА ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ОМСКАЯ 37, НЕСУЩИХ ТРАНСЛОКАЦИИ 1RS.1BL И 7DL-7Ai

© 2012 г. **И.А. Белан[1], Л.П. Россеева[1], В.М. Россеев[1], Е.Д. Бадаева[2], Ю.И. Зеленский[3], Н.П. Блохина[1], С.С. Шепелев[1], Л.А. Першина[4, 5]**

[1] Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии, Омск, Россия, e-mail: belan_skg@mail.ru;
[2] Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия;
[3] Представительство СИММИТ, Астана, Республика Казахстан;
[4] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;
[5] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 5 декабря 2011 г. Принята к публикации 14 декабря 2011 г.

Изучены перспективные линии яровой мягкой пшеницы, выделенные из сорта Омская 37 и несущие пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL. Проведена оценка линий по устойчивости к грибным патогенам, засухе, урожайности, параметрам экологической пластичности, стабильности и гомеостатичности. Проведено изучение трех линий с использованием С-окрашивания хромосом. Установлено, что эти линии, кроме пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL, несут и пшенично-пырейную транслокацию 7DL-7Ai, в которой сегмент хромосомы 7Ai принадлежит *Agropyron elongatum* (Host) Beauv (= *Thinopyrum elongatum*; = *Thinopyrum ponticum*). Сделано заключение о том, что комплексная устойчивость сорта Омская 37 и его перспективных линий обусловлена влиянием кластера генов, локализованных на сегментах хромосом ржи и пырея, включенных в состав соответствующих пшенично-чужеродных транслокаций. Выделены наиболее перспективные линии, рекомендованные для дальнейшего использования в селекции. Одна из изученных линий – Лютесценс 242/97-2-10 – передана на Государственное сортоиспытание в качестве сорта яровой мягкой пшеницы Омская 41.

Ключевые слова: линии яровой мягкой пшеницы Омская 37, хозяйственно ценные признаки, 1RS.1BL, 7DL-7Ai.

Введение

Мягкая пшеница является одной из наиболее важных продовольственных культур во всем мире. Большие потери урожая пшеницы во многом определяются поражением растений грибными патогенами. В последние годы, наряду с распространением патогенов мучнистой росы (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), бурой ржавчины (*Puccinia triticina* f. sp. *tritici*), желтой ржавчины (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), возросла угроза проявления эпифитотий стеблевой ржавчины (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*). При этом наибольшую опасность представляют ее новые вирулентные расы, включая Ug99, впервые зафиксированную в 1999 г. в Уганде (Pretorius, Park, 2008).

В связи с этим создание сортов пшеницы с комплексной устойчивостью к грибным патогенам остается одним из наиболее приоритетных направлений генетики и селекции. С 2009 г. по 10-му региону Российской Федерации в Государственный реестр селекционных достижений включен сорт яровой мягкой пшеницы

селекции СибНИИСХ Омская 37 (Бойко и др., 2009), характеризующийся устойчивостью к грибным патогенам. В геноме сорта Омская 37 выявлена пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL (Трубачеева и др., 2011).

Сорта, несущие эту транслокацию, широко распространены во всем мире (Rabinovich, 1998; Schlegel, 2011). Это связано с тем, что короткое плечо хромосомы ржи 1RS, входящее в состав транслокации, несет гены, контролирующие устойчивость растений к грибным патогенам: бурой ржавчине (*Lr26*), стеблевой ржавчине (*Sr31*), желтой ржавчине (*Yr9*) и мучнистой росе (*Pm8*) (Singh *et al*., 1990). Между тем эффект гена *Pm8* (Singrun *et al*., 2004), проявление засухоустойчивости и уровень урожайности у сортов с транслокацией 1RS.1BL определяются генотипической средой пшеницы (Hoffmann, 2008). Присутствие транслокации 1RS.1BL может обусловливать и низкие хлебопекарные свойства за счет снижения качества клейковины и объема хлеба (Monneveux *et al*., 2003). С 1999 г. сорта с транслокацией 1RS.1BL, длительное время защищенные от стеблевой ржавчины функционированием гена *Sr31*, так же, как и сорта с рядом других ранее эффективных генов устойчивости к этому патогену, стали поражаться агрессивной расой стеблевой ржавчины Ug99 (Pretorius *et al*., 2000).

Что касается сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, то для него характерна устойчивость к мучнистой росе, бурой ржавчине (Россеева и др., 2008; Morgounov *et al*., 2011), стеблевой ржавчине, в том числе и к расе Ug99 (Шаманин и др., 2010). Комплексная устойчивость этого сорта к грибным патогенам сочетается с высокой урожайностью и способностью формировать высококачественное зерно (Абугалиева и др., 2010). Эти качества сорта Омская 37 позволили включить его во многие селекционные программы, в том числе в питомники KSBN (Казахстанско-Сибирский питомник челночной селекции) и HLWSN (питомники пшеницы для стран, расположенных в условиях высоких широт). Учитывая такие особенности сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, можно предположить, что этот сорт, помимо кластера генов, локализованных на коротком плече хромосомы ржи 1RS, несет и другие гены, контролирующие устойчивость к грибным патогенам.

Предыдущие исследования показали, что сорт Омская 37 гетерогенен. Это позволило в результате последовательного отбора по хозяйственно ценным признакам выделить из него серию линий, различающихся между собой по проявлению ряда признаков (Белан и др., 2010).

В данной работе была поставлена задача – провести подробное изучение ряда этих линий по устойчивости к грибным патогенам, засухе, урожайности, параметрам экологической пластичности, стабильности и гомеостатичности. Это выполнено с целью выявления наиболее перспективных линий, которые можно использовать в дальнейшем селекционном процессе. Кроме того, в задачу работы входило изучение наиболее ценных линий с применением С-окрашивания хромосом.

Материалы и методы

В исследования было включено 9 линий, у которых было лучшее проявление ряда хозяйственно ценных признаков, из 20 ранее изученных линий сорта Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL (Белан и др., 2010). Сорт яровой мягкой пшеницы Омская 37 создан в результате ступенчатой гибридизации с привлечением экологически отдаленных форм, включая сорт Кавказ, источник пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL (Трубачеева и др., 2011). Обозначение линий, использованных в работе: Лютесценс (Л).242/97-2-10, Л.242/97-2-13, Л.242/97-2-22, Л. 242/97-2-27, Л.242/97-2-31, Л.242/97-2-32, Л. 242/97-2-35, Л.242/97-2-40, Л.242/97-2-45. В качестве контроля (стандарта) были использованы сорта яровой мягкой пшеницы Омская 29 и Омская 35.

Исследования проведены на полях ГНУ СибНИИСХ (южная лесостепь) в 2006–2010 гг. Метеорологические условия за годы проведения опытов были различны по тепло- и влагообеспеченности. Так, условия 2007 и 2009 гг. были наиболее благоприятными для произрастания пшеницы; 2006 г. оказался относительно засушливым в первой половине, а 2008 г. – во второй половине вегетации. Посев проведен селекционной сеялкой ССФК-7М; площадь делянок – 5–10 м^2, повторность – 2–4-кратная. В качестве стандартов использованы среднеспелый сорт Омская 29 и среднепоздний

сорт Омская 35. Уборка проведена комбайном «Хеге-125».

Фенологические наблюдения и учеты проведены в соответствии с «Методикой государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур» (1985). Селекционные линии и сорта оценивались на устойчивость к патогенам бурой ржавчины (*Puccinia triticina*) в стадии проростков и взрослых растений. При изучении устойчивости к возбудителю бурой ржавчины в стадии проростков использовался бензимидазольный метод (Михайлова, Квитко, 1970) при оценке типа устойчивости по шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926). Эксперимент проводили в климокамере Биотрон 4. В полевых условиях СибНИИСХ степень поражения растений патогенами мучнистой росы *Blumeria graminis*, бурой ржавчины *Puccinia triticina* и стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* оценивали по международной шкале (Зыкин и др., 2004). Кроме того, в 2008 и 2009 гг. оценка линий на устойчивость к стеблевой ржавчине (основной патотип TTKST (Ug99+Sr24)), была проведена при выращивании растений с июня по октябрь и с ноября по март в международном питомнике в Кении по модифицированной шкале Cobb (Peterson *et al*., 1948). Эта работа была выполнена в сотрудничестве с Международным центром по улучшению кукурузы и пшеницы (CIMMYT).

При изучении устойчивости линий к засухе использована модифицированная методика тестирования пшеницы *in vitro* (Россеев и др., 2010). Параметры стабильности и экологической пластичности рассчитаны по методу, предложенному Эберхардом и Расселом (Зыкин и др., 2004), а показатель гомеостатичности (Hom) – по методу В.В. Хангильдина (1976). Статистическую обработку данных выполняли с использованием табличного процессора Microsoft Excel по учебному пособию (Макарова, Трофимец, 2003).

Получение хромосомных препаратов и С-окрашивание хромосом проведено в соответствии с методикой (Badaeva *et al*., 1994), хромосомы классифицировали по стандартной номенклатуре.

Результаты

Результаты 4-летнего изучения (2006–2009 гг.) показали, что по продолжительности вегетационного периода линии относятся к двум группам спелости: среднеспелой (Л.242/97-2-22, Л.242/97-2-27, Л.242/97-2-45) и среднепоздней (Л.242/97-2-10, Л.242/97-2-13, Л.242/97-2-31, Л.242/97-2-32, Л.242/97-2-35, Л.242/97-2-40).

Изучение устойчивости линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 к грибным патогенам. Изучение устойчивости сортов и селекционных линий к грибным патогенам в полевых условиях Омска показало, что 2006 и 2008 гг. были неблагоприятны для развития ржавчинных заболеваний. В 2007 г. было отмечено сильное распространение бурой ржавчины, а в 2009 г. пшеница была поражена одновременно как бурой, так и стеблевой ржавчиной. Для возбудителя мучнистой росы все годы изучения были благоприятны. В табл. 1 приведены результаты оценки различных листовых заболеваний у изучаемых генотипов в годы их максимального проявления. Линии сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 характеризуются полевой устойчивостью к патогену мучнистой росы. Так, степень поражения линий варьировала от 5 % (Л.247/97-2-31) до 30 % (Л.247/97-2-45), а у стандартов от 50 % (Омская 35) до 70 % (Омская 29).

Сорта-стандарты были восприимчивы и к возбудителям ржавчинных заболеваний, независимо от вида ржавчины и пункта изучения. Что касается линий сорта Омская 37, то их оценки к возбудителю бурой ржавчины как в фазе проростков, так и в фазе колошения свидетельствуют об их высокой устойчивости к этому патогену в течение онтогенеза (табл. 1).

Так, в фазе проростков 7 из 9 изученных линий не поражались возбудителем бурой ржавчины, а две линии проявили умеренную устойчивость. В полевых условиях степень поражения изученных линий сорта Омская 37 варьировала от 5 до 10 %, степень поражения сорта Омская 35 составила 60 %, сорта Омская 29 – 70 %. Высокую полевую устойчивость к популяции стеблевой ржавчины при выращивании на опытном поле СибНИИСХ проявили все 6 изученных линий. Степень их поражения составляла лишь 5 %, в то время как у сортов-стандартов Омская 29 и Омская 35 этот показатель равнялся 70 и 80 % соответственно.

В условиях Кении на специализированном инфекционном фоне стеблевой ржавчины

Таблица 1

Характеристика перспективных линий сорта Омская 37 по устойчивости к грибным патогенам

Сорт, линия	Поражение патогенами, % и балл				
	Ржавчины				Мучнистая роса
	бурая		стеблевая		
	Омск, поле*	климокамера**	Омск, поле*	Кения***	Омск, поле*
Среднеспелые					
Омская 29 (стандарт)	70	4	70	70S	80
Л.247/97-2-22	10	0	–	–	10
Л.247/97-2-27	5–10	2	5	5MR	25
Л.247/97-2-45	5	0	5	5 MR	30
Среднепоздние					
Омская 35 (стандарт)	60	4	80	80S	50
Л.247/97-2-10	5	0	5	5 MR	25
Л.247/97-2-13	5	0	–	–	15
Л.247/97-2-31	5	0	5	5 MR	5
Л.247/97-2-32	10	2	5	R	25
Л.247/97-2-35	5	0	5	R	15
Л.247/97-2-40	5	0	–	–	10

Примечание. Разница по сравнению с сортом яровой мягкой пшеницы Омская 35 достоверно больше при * $P < 0{,}05$. – Линии не изучались. * % – степень поражения (Зыкин и др., 2004); ** оценка в баллах: 0 – иммунный; 1 – высокоустойчивый; 2 – среднеустойчивый; 3 – средневосприимчивый; 4 – сильновосприимчивый по шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926); *** 5, 15, 40 и т. д. – 5, 10, 30 % пораженных растений и т. д. по шкале Cobb (Peterson *et al*., 1948). R – устойчивый, MR – умеренно устойчивый, MS – умеренно восприимчивый, S – восприимчивый.

(основной патотип TTKST) четыре линии (среднеспелые Л.247/97-2-27, Л.247/97-2-45 и среднепоздние Л.247/97-2-10, Л.247/97-2-31) проявили умеренную устойчивость к этому патогену, а две среднепоздние Л.247/97-2-32 и Л.247/97-2-35 были устойчивы (табл. 1).

Изучение линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 с применением С-окрашивания хромосом. В эту часть работы были включены среднеспелая линия Л.242/97-2-45 и две среднепоздние линии Л.247/97-2-10, Л.242/97-2-35. Результаты проведенного анализа показали, что эти линии несут как пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL, так и пшенично-пырейную транслокацию 7DL-7Ai, в которой сегмент хромосомы 7Ai принадлежит *Agropyron elongatum (= Thinopyrum ponticum*, = *Thinopyrum elongatum*) ($2n = 10x = 70$) (рис.).

Изучение линий сорта мягкой пшеницы Омская 37 по устойчивости к полеганию и урожайности. Оценку линий по устойчивости

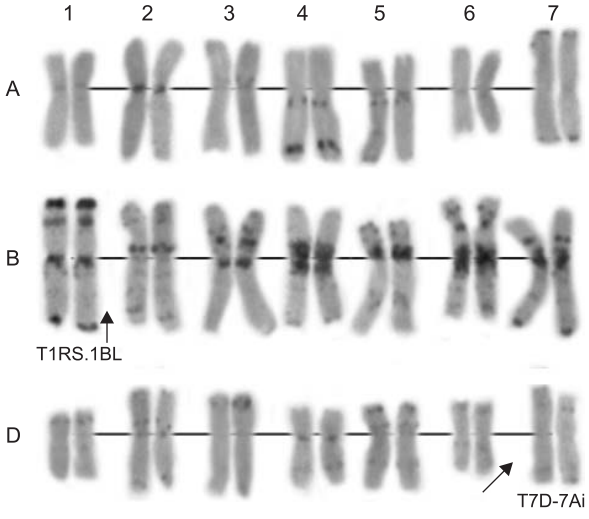


Рис. Результат С-окрашивания хромосом линии Л.247/97-2-10, выделенной из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37.

Стрелками указаны пшенично-чужеродные транслокации (Т): пшенично-ржаная T1RS.1BL и пшенично-пырейная T7D-7Ai.

к полеганию наиболее объективно удалось провести в условиях 2009 г., характеризовавшегося избыточной влагообеспеченностью в период вегетации пшеницы. Сорта-стандарты Омская 29 (среднеспелая группа) и Омская 35 (среднепоздняя группа) по устойчивости к полеганию оценены на 4 балла. По сравнению со стандартами среднеспелая линия Л.242/97-2-27 и среднепоздняя линия Л.242/97-2-10 имели максимальный балл, 5, что указывает на их высокую устойчивость к полеганию.

Показатели урожайности у всех линий изменялись по годам, при этом наиболее высокой и стабильной урожайностью характеризовалась среднепоздняя линия Л.242/97-2-10, у которой среднее значение показателя урожайности было достоверно выше, чем у стандарта – сорта Омская 35 (табл. 2). Известно, что высокая и стабильная урожайность может проявляться при сочетании в генотипе высокой потенциальной продуктивности и устойчивости к неблагоприятным факторам среды (Зыкин и др., 2004). Адаптивные свойства сортов отражают такие показатели, как экологическая пластичность, стабильность и гомеостатичность, которые необходимо оценивать наряду с показателями продуктивности (Зыкин и др., 2004; Бебякин и др., 2005).

На основании результатов, полученных при расчете параметров экологической пластичности, стабильности и гомеостатичности, выделены две линии: в группе среднеспелых – линия Л.242/97-2-45, а в группе среднепоздних – линия Л.242/97-2-10. Эти линии по показателям изученных параметров характеризуются высокой степенью адаптивности (табл. 2). Так, значение коэффициента линейной регрессии b_i, по которому оценивается пластичность, у этих линий было выше единицы ($b_i > 1$). Это указывает на хорошую отзывчивость линий Л.242/97-2-45 и Л.242/97-2-10 при улучшении условий выращивания. Эти линии характеризуются и высоким уровнем стабильности урожайности в различных условиях выращивания. На это указывают показатели стабильности, оказавшиеся близкими к нулю: для линий Л.242/97-2-45 – $\sigma_d^2 = 0,1$ и Л.242/97-2-10 – $\sigma_d^2 = 0,4$.

Другой показатель (гомеостатичность, Hom), отражающий стабильность урожайности за счет слабого реагирования на ухудшение условий, оказался выше у линий Л.242/97-2-45 и Л.242/97-2-10 по сравнению с другими изученными линиями в соответствующих группах среднеспелых и среднепоздних генотипов (табл. 2). Известно, что селекция на гомеостатичность особое значение имеет для сортов пшеницы, рассчитанных для выращивания в регионах с недостаточным увлажнением, какими являются южная лесостепь и степь Западной Сибири (Щербаков, 1981).

Таблица 2

Характеристика перспективных линий сорта Омская 37 по показателям урожайности, гомеостатичности (Hom), экологической пластичности (b_i) и стабильности (σ_d^2)

Сорт, линия	Параметры			
	Урожайность, т/га, Омск	Hom	b_i	σ_d^2
Омская 29	2,83	1,05	0,82	0,07
Л. 247/97-2-22	3,02	0,98	0,97	0,02
Л. 247/97-2-27	3,37	0,57	0,91	0,03
Л. 247/97-2-45	3,49	1,32	1,25	0,01
Омская 35	2,98	1,01	0,74	0,06
Л. 247/97-2-10	3,67*	1,51	1,21	0,04
Л. 247/97-2-31	3,30	1,49	0,62	0,16
Л. 247/97-2-32	3,17	0,67	1,19	0,05
Л. 247/97-2-35	3,21	0,74	1,13	0,01
Л. 247/97-2-40	3,33	1,35	0,98	0,15

Примечание. Разница по сравнению с сортом яровой мягкой пшеницы Омская 35 достоверно больше при * $P < 0,05$.

Из результатов данного раздела работы следует, что линии Л. 242/97-2-45 и Л. 242/97-2-10 относятся к наиболее ценным в селекционном плане генотипам, поскольку характеризуются высоким адаптивным потенциалом.

Анализ линий яровой мягкой пшеницы Омская 37 на устойчивость к засухе. В эту часть работы было включено 4 линии сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 – среднеспелая линия Л.242/97-2-45 и три среднепоздние линии – Л.247/97-2-10, Л.242/97-2-13 и Л.242/97-2-35. В качестве стандарта использован среднепоздний сорт яровой мягкой пшеницы Омская 18, который характеризуется повышенной устойчивостью к засухе. Оценку линий на

засухоустойчивость проводили по результатам тестирования *in vitro* и по урожайности в разные по влагообеспеченности годы (2009 и 2010 гг.). 2009 г. характеризовался достаточной влагообеспеченностью, что создавало благоприятные условия для выращивания пшеницы. Условия 2010 г. были менее благоприятными из-за недостаточной влагообеспеченности.

При тестировании *in vitro* изучаемых линий к неблагоприятным абиотическим факторам среды показателем устойчивости генотипов к засухе служило проявление побегообразования у эксплантов из зрелых зародышей при культивировании их на каллусогенной среде, содержащей 2,4-Д (Россеев и др., 2010). По данным проведенного тестирования, линия Л. 242/97-2-13 отнесена к генотипам с повышенной устойчивостью к засухе. Индекс устойчивости этой линии достоверно не отличается от индекса устойчивости засухоустойчивого сорта Омская 18 (табл. 3).

У трех других линий, Л.242/97-2-10, Л.242/97-2-35 и Л. 242/97-2-45, индексы устойчивости достоверно ниже, чем у сорта Омская 18. Эти линии отнесены к генотипам со средней засухоустойчивостью. С этими результатами согласуются и данные, полученные при оценке урожайности линий в годы с разной влагообеспеченностью.

Урожайность засухоустойчивого сорта Омская 18 и засухоустойчивой линии Л.242/97-2-13 в год с недостаточной влагообеспеченностью (2010 г.) достоверно не отличалась от урожайности при благоприятных условиях выращивания пшеницы (2009 г.).

Другой была реакция на недостаток влаги у линий со средней засухоустойчивостью (Л.242/97-2-10, Л.242/97-2-35, Л.242/97-2-45). В год с недостаточной влагообеспеченностью (2010 г.) урожайность этих линий была достоверно сниженной относительно предыдущего благоприятного по влагообеспеченности года (2009 г.). Поскольку изученные линии со средней засухоустойчивостью обладают комплексом хозяйственно ценных свойств, их рекомендуется использовать в селекционном процессе при создании сортов для лесостепной зоны, где по влагообеспеченности условия выращивания более благоприятные.

Обсуждение результатов

Отбор линий из сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 проводился в течение 6 лет, начиная с 2004 г. Первоначально из этого сорта по признакам продуктивности было выделено 500 линий, включенных в дальнейший селекционный процесс. На этапе, предшествующем проведению настоящей работы, было изучено 22 линии, которые характеризовал полиморфизм по показателям качества зерна и полевой устойчивости к мучнистой росе и бурой ржавчине в условиях Омской области (Белан и др., 2010). Кроме того, у 20 из этих линий была выявле-

Таблица 3

Результаты изучения линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 *in vitro* и в полевых условиях на устойчивость к засухе

Сорт, линия	Индекс устойчивости по оценке *in vitro*	Засухо-устойчивость	Урожайность, т/га	
			Достаточная влагообеспеченность, 2009 г.	Недостаточная влагообеспеченность, 2010 г.
Омская 18 (стандарт)	60 ± 1,7	Повышенная	2,92	2,70
Л.242/97-2-13	57 ± 1,2	Повышенная	2,90	2,45
Л.242/97-2-10	46 ± 1,5	Средняя	4,15***	2,03
Л.242/97-2-35	48 ± 1,4	Средняя	3,15**	2,31
Л.242/97-2-45	40 ± 1,2	Средняя	3,50***	1,72
$НСР_{05}$	4,2		0,31	0,33

Примечание. Разница по сравнению с урожайностью 2010 г. достоверно больше при ** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$.

на так же, как и у исходного сорта Омская 37 (Трубачеева и др., 2011), пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL (Белан и др., 2010). В настоящую работу было включено 9 линий, несущих эту транслокацию и характеризующихся высоким качеством зерна.

Изучение этих линий показало, что их характеризует устойчивость к омским популяциям бурой ржавчины в течение всего онтогенеза, а в стадии взрослых растений – и к омским популяциям мучнистой росы и стеблевой ржавчины. Более того, некоторые из изученных линий оказались устойчивыми или проявили умеренную устойчивость на инфекционном фоне при выращивании растений в Кении к расе стеблевой ржавчины TTKST (*Ug99+Sr24*), для которой характерна комбинированная вирулентность по отношению к генотипам мягкой пшеницы, несущим гены *Sr31* и *Sr24* (Jin *et al*., 2008). У изученных линий из-за наличия короткого плеча хромосомы 1RS в составе пшенично-ржаной транслокации присутствует ген *Sr31*. Из этого следует, что эти линии должны нести и другие гены, ответственные за устойчивость мягкой пшеницы к стеблевой ржавчине.

С-окрашивание хромосом у умеренно устойчивых линий Л.247/97-2-10, Л.242/97-2-45 и устойчивой линии Л.242/97-2-35 выявило в их кариотипах, наряду с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL, и пшенично-пырейную транслокацию 7DL-7Ai. Сегмент хромосомы пырея, входящий в состав этой транслокации, был перенесен в геном мягкой пшеницы от пырея *Thinopyrum ponticum* (= *Agropyron elongatum*; = *Thinopyrum elongatum*) (Sharma *et al*., 1966).

Этот сегмент несет два сцепленных гена: ген *Lr19*, ответственный за устойчивость к бурой ржавчине, и ген *Sr25*, определяющий устойчивость к стеблевой ржавчине (Friebe *et al*., 1994; Liu *et al*., 2010). Ген *Sr25* является одним из немногих генов, который обеспечивает устойчивость мягкой пшеницы к патогенам стеблевой ржавчины, в том числе и к появившейся в последние годы агрессивной расе Ug99+Sr24 (TTKST) (Yin *et al*., 2007). Можно считать, что наличие пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai и объясняет устойчивость сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 и изученных в данной работе линий к разным популяциям стеблевой ржавчины, включая и расу Ug99+Sr24 (TTKST). Сделанное заключение согласуется с результатами, полученными при изучении интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции НИИСХ Юго-Востока на устойчивость к этой расе стеблевой ржавчины (Сибикеев и др., 2011).

Устойчивость к бурой ржавчине, характерная для изученных линий сорта Омская 37, связана, скорее всего, с функционированием комплекса генов, локализованных на сегменте хромосомы пырея (*Lr19*) и коротком плече хромосомы ржи 1RS (*Lr26*), ответственных за устойчивость к этому патогену. Известно, что, несмотря на то что каждый из этих генов утратил свою эффективность, их комбинация (пирамида генов) обеспечивает высокую эффективность против популяций листовой ржавчины (Сюков, Зубов, 2008). В эту пирамиду может входить и ген *Lr10*, поскольку в родословной сорта Омская 37 присутствует сорт яровой мягкой пшеницы Омская 20, носитель этого гена (Гультяева и др., 2009).

Что касается устойчивости линий к мучнистой росе, то она могла быть обусловлена у изученных линий действием гена *Pm8*, локализованного на коротком плече хромосомы 1RS, входящей в состав пшенично-ржаной транслокации (Singh *et al*., 1990).

Обобщая полученные данные, следует отметить, что проведенный отбор и изучение линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37 дали возможность охарактеризовать их с точки зрения селекционной ценности и включить в дальнейший селекционный процесс. Важным практическим результатом стало выделение среднепоздней линии Л.242/97-2-10, у которой повышенная урожайность сочетается с устойчивостью к листовым патогенам, а по данным, опубликованным ранее (Белан и др., 2010), с высоким качеством зерна и высокими хлебопекарными свойствами. Эти особенности линии Л.247/97-2-10 позволили передать ее в 2010 г. на Государственное сортоиспытание в качестве сорта яровой мягкой пшеницы Омская 41.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Интеграционной программы СО РАН и Россельхозакадемии и Госконкракта № 16.512.11.2224.

Литература

Абугалиева А.И., Зеленский Ю.И., Савин Т.В. Классификация сортов яровой мягкой пшеницы Международных питомников казахстанско-российской сети по показателям качества зерна. Астана, 2010. 61 с.

Бебякин В.М., Кулеватова Т.Б., Старичкова Н.И. Методические подходы, методы и критерии оценки адаптивности растений // Изв. Сарат. ун-та. 2005. Т. 5. Сер. Химия. Биология. Экология. Вып. 2. С. 69–71.

Белан И.А., Россеева Л.П., Трубачеева Н.В. и др. Особенности хозяйственно ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 4. С. 632–640.

Бойко В.Д., Курдюкова Т.А., Черемисина С.П. и др. Рекомендации по возделыванию сортов сельскохозяйственных культур и результаты сортоиспытания в Омской области за 2009 год. Инспектура по Ом. обл. Ом. филиал ФГУ «Гос. комиссия РФ по испытанию и охране селекционных достижений». Омск, 2009. 140 с.

Гультяева Е.И., Канюка И.А., Алпатьева Н.В. и др. Молекулярные подходы в идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у российских сортов пшеницы // Докл. РАСХН. 2009. № 5. С. 23–26.

Зыкин В.А., Россеева Л.П., Белан И.А., Кадиков Р.К. Методика оценки селекционных форм и сортов мягкой пшеницы при испытании на отличимость, однородность и устойчивость к факторам среды // Метод. рекоменд., СО РАСХН, СибНИИСХ, ФГОУ ВПО БГАУ. УФА, 2004. 39 с.

Колмаков Ю.В. Оценка материала пшеницы в селекции и повышение потенциала его качества в зернопроизводстве и хлебопечении. Омск: Изд-во ФГОУ ВПО Ом ГАУ, 2007. 268 с.

Макарова Н.В., Трофимец В.Я. Статистика в Excel: Уч. пособие. М.: Финансы и статистика, 2003. 386 с.

Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур. Вып. 1. Общая часть. М., 1985. 269 с.

Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы // Микология и фитопатология. 1970. Т.4. № 3. С. 269–270.

Россеев В.М., Белан И.А., Россеева Л.П. Тестирование *in vitro* яровой мягкой пшеницы и ячменя на устойчивость к неблагоприятным абиотическим факторам среды // Докл. РАСХН. 2010. № 3. С. 14–16.

Россеева Л.П., Мешкова Л.В., Белан И.А. Устойчивость яровой мягкой пшеницы к возбудителю бурой ржавчины в Западной Сибири // Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 180-летию основания сибирской аграрной науки «Аграрная наука Сибири XXI века. Омск, ГНУ СибНИИСХ СО РАСХН, 29–30 июля 2008 г. Омск, 2008. С. 195–200.

Сибикеев С.Н., Маркелова Т.С., Дружин А.Е. и др. Оценка набора интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы селекции НИИСХ Юго-Востока на устойчивость к стеблевой ржавчине Ug99 + Sr24 (TTKST) // Докл. РАСХН. 2011. № 2. С. 3–5.

Сюков В.В., Зубов Д.Е. Генетическая коллекция мягкой пшеницы по устойчивости к бурой листовой ржавчине // Метод. рекомендации. Самара: СамНЦ РАН, 2008. 24 с.

Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А. и др. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. С. 18–24.

Хангильдин В.В. Гомеостатичность и структура урожая зерна у сортов яровой пшеницы в условиях Башкирии // Физиологические и биохимичекие аспекты гетерозиса и гомеостаза растений. Уфа, 1976. С. 210–230.

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Чурсин А.С. и др. Представляет ли стеблевая ржавчина угрозу урожаю пшеницы в условиях Западной Сибири // Усп. соврем. естествознания. 2010. № 2. С. 56–60.

Щербаков В.К. Эволюционно-генетическая теория биологических систем гомеостаз, значение для развития теории селекции // Вест. с.-х. науки. 1981. № 3. С. 56–67.

Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Inraspecific karyotypes divergence in *Triticum araraticum* // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. No 1. P. 117–145.

Friebe B., Jiang J., Knott D.R., Gill B.S. Compensation indexes of radiation-induced wheat *Agropyron elongatum* translocations conferring resistance to leaf rust and steam rust // Crop Sci. 1994. V. 34. P. 400–404.

Hoffmann B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1R // Cereal Res. Commun. 2008. V. 36. P. 269–278.

Jin Y., Singh R.P., Ward R.W. *et al*. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2007. V. 91. P. 1096–1099.

Jin Y., Szabo L.J., Pretotius Z.A. *et al*. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2008. V. 92. P. 923–926.

Liu S., Yu L.-X., Singh R.P., Jin Y., Sorrels M.E., Anderson J.A. Diagnostic and co-dominant PCR markers for wheat stem rust resistance genes *Sr25* and *Sr26* // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 120. P. 691-697.

Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia triticina* Er. // Phytopathology. 1926. V. 16. No 1. P. 822–833.

Monneveux P., Reynolds M.P., Zaharieva M., Mujeeb-Kazi A. Effect of T1BL.1RS hromosome translocation on bread wheat grain yield and physiological related traits in warm environment // Cereal Res. Commun. 2003. V. 31. P. 371–378.

Morgounov A., Ablova I., Babayants L. *et al.* Genetic protection of wheat from rusts and development of resistant varieties in Russia and Ukraine // Euphytica. 2011. V. 179. P. 297–311.

Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. Sec. C Bot. Sci. 1948. V. 26. P. 496–500.

Pretorius Z.A., Park R.F. Origin, evolution, distribution and virulence of Ug99 and the global stem rust monitoring

system // Proc. Intern. Conf. on Wheat Stem Rust Ug99-A. Threat to Food Security / Eds G.P. Singh, K.V. Prabhu, Anju M. Singh. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India. 2008. P. 1–8.

Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Patne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia triticina* f. sp. *tritici* in Uganda // Plant Disease. 2000. V. 84. P. 203.

Rabinovich S.V. Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L.// Euphytica. 1998. V. 100. P. 323–340.

Sharma D., Knott D.R. The transfer of leaf rust resistance from Agropyron to Triticum by irradiation // Can. J. Genet. Cytol. 1966. V. 8. P. 137–143.

Shlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2011. V05-08. 1–14. http://www.desicca.de/Wheat-rye introgression.

Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, steam and stripe rust and ω-secalins on the short arm of rye chromosome 1R // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 80. P. 609–616.

Singrun C., Rauch P., Morgounov A. *et al*. Identification of powdery mildew and leaf resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.). Wheat varieties from the Caucasus, Central and Inner Asia // Genet. Res. and Crop Evol. 2004. V. 51. P. 355–370.

EXAMINATION OF ADAPTIVE AND AGRONOMIC CHARACTERS IN LINES OF COMMON WHEAT OMSKAYA 37 BEARING TRANSLOCATIONS 1RS.1BL AND 7DL-7Ai

I.A. Belan[1], L.P. Rosseeva[1], V.M. Rosseev[1], E.D.Badaeva[2], Y.I. Zelenskiy[3], N.P. Blokhina[1], S.S. Shepelev[1], L.A. Pershina[4, 5]

[1] Siberian Agricultural Research Institute, SB RAAS, Omsk, Russia, e-mail: belan_skg@mail.ru;
[2] Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia;
[3] CIMMYT, PO 1443, 010000, Astana, Kazakhstan;
[4] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;
[5] Novosibirsk State University, Cytology and Genetics Department, Novosibirsk, Russia

Summary

Lines derived from spring bread wheat Omskaya 37 and possessing wheat-rye translocation 1RS.1BL have been studied and tested for resistance to fungal pathogens, drought, crop yield, and parameters characterizing ecological plasticity and stability. Three lines have been studied with the use of the C-banding technique. It is shown that these lines, in addition to wheat-rye translocation 1RS.1BL possess wheat-wheatgrass translocation 7DL-7Ai, where a segment of chromosome 7Ai of *Agropyron elongatum* (= *Thinopyrum elongatum*; = *Thinopyrum ponticum*) is translocated to the long arm of wheat chromosome 7D. It is concluded that the complex stability of Omskaya 37 and its promising lines is related to the influence of a cluster of genes located on segments of rye and *Agropyron* chromosomes involved in the respective wheat–alien translocations. Several promising lines are recommended for further use in breeding programs. One of the lines we consider here, Lutescens 242/97-2-10, is submitted to state variety trial for registration as spring wheat variety Omskaya 41.

Key words: lines of Omskaya 37 common wheat, commercially valuable traits, 1RS.1BL, 7DL-7Ai.

УДК 633.11:575.1

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНОВ *Wx* В КОЛЛЕКЦИИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ КРАСНОДАРСКОГО НИИСХ им. П.П. ЛУКЬЯНЕНКО

© 2012 г. **М.В. Климушина[1], Н.И. Гладких[1], М.Г. Дивашук[1], Л.А. Беспалова[2], А.В. Васильев[2], Г.И. Карлов[1]**

[1] РГАУ – МСХА им. К.А. Тимирязева, Центр молекулярной биотехнологии, Москва, Россия, e-mail: mklimushina@gmail.com;
[2] ГНУ Краснодарский НИИСХ им. П.П. Лукьяненко РАСХН, Краснодар, Россия

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 26 декабря 2011 г.

В работе представлены данные по изучению аллелей генов *Wx* коллекции из 99 сортов и линий мягкой пшеницы селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко. С помощью двух молекулярных маркеров к гену *Wx-A1* было выявлено, что сорта Старшина и Сила несут в своем геноме нуль-аллели по данному гену. На основании данных по амплификации четырех различных молекулярных маркеров установлено, что сорта Нота и Ласточка несут в своем геноме аллель *Wx-B1e*. Сортов, несущих нуль-аллели гена *Wx-B1*, обнаружено не было. По гену *Wx-D1* были выявлены только аллели дикого типа.

Ключевые слова: мягкая пшеница, молекулярные маркеры, гены *Wx*.

Введение

Основная часть питательных веществ мягкой пшеницы (*Triricum aestivum* L.) содержится в запасающем органе зерновки – эндосперме, основным компонентом которого является крахмал. Крахмал накапливается в виде гранул, которые состоят из полисахаридов двух типов – разветвленного амилопектина и линейной амилозы. Содержание амилозы составляет 20–25 % массы крахмала, а амилопектина – 70–75 % (James *et al*., 2003). Изменение содержания амилозы оказывает значительное влияние на технологические свойства крахмала и муки пшеницы. Ключевым ферментом в синтезе амилозы является гранул-связанная синтаза крахмала (GBSSI), также известная как белок Waxy (Shure *et al*., 1983). В геноме мягкой пшеницы три гомеологичных гена кодируют изоформы GBSSI фермента. Данные гены, получившие название *Wx,* расположены в хромосомах 7AS (*Wx-A1*), 4AL (*Wx-B1*) и 7DS (*Wx-D1*) (Chao *et al*., 1989). У кукурузы, ячменя, риса, овса и затем у пшеницы были обнаружены мутанты по генам *Wx*, у которых наблюдалось снижение содержания или полное отсутствие амилозы (Graybosh, 1998). Установлено, что у пшеницы каждый из генов *Wx* имеет несколько аллелей: активный аллель (*a*), кодирующий синтез белка Waxy; неактивный (*в* – нуль-аллель), при котором синтез функционального белка Waxy отсутствует; функциональные аллели с различной ферментативной активностью белка Waxy. Мягкая пшеница с одним или двумя нефункциональными генами (нуль-аллелями) синтезирует крахмал с пониженным уровнем амилозы, обладающий рядом характеристик, необходимых для производства высококачественной лапши, особенно для стран Юго-Восточной Азии, где этот продукт является традиционным (Epstein *et al*., 2002; Liu *et al*., 2003). Кроме того, было выявлено определенное положительное влияние наличия нуль-аллелей на хлебопекарные и мукомольные качества пшеницы, так как крахмал с пониженным содержанием амилозы более чувствителен к механическому воздействию. При помоле происходит разрушение гранул крахмала, что увеличивает площадь поверхности и приводит к повышению водопоглотительной способности

и амилолитической активности муки, создавая тем самым благоприятные условия для высокой активности дрожжей в тесте (Graybosh, 1998). Есть данные о том, что пониженное содержание амилозы положительно сказывается на увеличении срока хранения хлебобулочных изделий, так как именно амилоза способствует очерствению хлеба (Nakamura *et al*., 1995, 2002). Помимо нуль-аллелей, по всем локусам генов был выявлен также ряд других функциональных аллельных вариантов (Rodríguez-Quijano *et al*., 1998; Takeshi, 2006; Vanzetti *et al*., 2009; Guzmán *et al*., 2010). Влияние данных аллелей на содержание амилозы в крахмале пшеницы до конца еще не изучено. В коллекциях сортов пшеницы из разных стран были найдены различные комбинации активных и неактивных аллелей *Wx*. Выявлено, что более 15 % сортов китайской, турецкой, аргентинской и корейской селекции несут нуль-аллель по гену *Wx-A1* (Yamamori *et al*., 1994; Vanzetti *et al*., 2009). Около 20 % сортов с нуль-аллелем по гену *Wx-B1* наблюдается среди коллекций австралийской, индийской и японской селекции (Nakamura *et al*., 1992; Yamamori *et al*., 1994). Единственный в мире сорт, содержащий нуль-аллель по гену *Wx-D1*, был найден в Китае (Nakamura *et al*., 1995). Для оценки аллельного состояния генов *Wx* использовались как гель-электрофорез белка, одномерный или двухмерный (Rodríguez-Quijano *et al*., 1998; Demeke *et al.*, 2000; Urbano *et al*., 2002), так и молекулярное маркирование с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Briney *et al.*, 1998; Boggini *et al.*, 2001; Nakamura *et al.*, 2002). В последнее время наиболее широкое распространение получили именно методы молекулярного маркирования, которые используются для идентификации аллельного состояния генов *Wx* и в MAS-селекции (селекции с помощью молекулярных маркеров).

Целью нашей работы была характеристика аллельного состояния генов *Wx* коллекции мягкой озимой пшеницы КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко с помощью молекулярных маркеров. Скрининг данной коллекции позволит получить первичную информацию, которая может быть использована для селекции сортов озимой пшеницы с модифицированным составом крахмала с использованием молекулярных маркеров.

Материалы и методы

Растительный материал и выделение ДНК. В исследованиях использовали коллекцию из 99 краснозерных сортов мягкой пшеницы селекции Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. ДНК выделяли из проростков по методу Bernatzky и Tanksley (1986).

Праймеры и условия ПЦР. Используемые праймеры и условия проведения полимеразной цепной реакции указаны в таблице. ПЦР проводили в Tetrad 2 Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при условиях, рекомендуемых авторами праймеров. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 1 × буфер для *Taq*-ДНК-полимеразы (Силекс, Москва), 1,0 U *Taq*-ДНК-полимеразы (Силекс, Москва), 200 μM каждого dNTP (Promega), 0,2 μM каждого праймера и 100–150 нг ДНК-матрицы. В реакции с праймерами 4F, 4R концентрация хлорида магния составляла 3,0 мМ, в остальных случаях 2,5 мМ. Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2 %-м агарозном геле в трис-боратном буферном растворе (TBE). В качестве маркера молекулярного веса использовали «100 bp Ladder» («Fermentas», Литва).

Результаты

Ген *Wx-A1*. Скрининг коллекции на аллельное состояние гена *Wx-A1* проводили с помощью молекулярного маркера, разработанного Nakamura с соавт. (2002). При использовании данного молекулярного маркера у аллеля дикого типа *Wx-A1a* амплифицируются фрагменты размером 389 п.н., а у нуль-аллеля – 370 п.н. (рис. 1, а).

Для верификации полученных результатов на образцах, у которых продукты амплификации отличались от дикого типа, мы использовали молекулярный маркер, модифицированный Vanzetti с соавт. (2009). После проведения ПЦР с данным молекулярным маркером размер ампликонов у *Wx-A1a* и нуль-аллеля различался незначительно, поэтому для лучшей визуализации после амплификации проводился гидролиз ПЦР-продукта с эндонуклеазой рестрикции *Hin*dIII (рис. 1, б).

Таким образом, с помощью двух молекулярных маркеров к гену *Wx-A1* было выявлено, что из 99 проанализированных сортов только

Таблица

Используемые праймеры и условия проведения ПЦР

Гены *Wx*	Праймеры	Условия ПЦР
Wx-A1	**AFC** и **AR2** (Nakamura *et al*., 2002)	95 ºС – 5 мин; 32 цикла: 95 ºС – 30 с, 65 ºС – 30 с, 72 ºС – 2 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	Wx-A1b-F-MH* **Wx-A1b-R-MH*** (Vanzetti *et al*., 2009)	94 ºС – 3 мин; 40 циклов: 94 ºС – 45 с, 55 ºС – 30 с, 72 ºС – 60 с; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
Wx-B1	**BDFL** и **BRD** (Nakamura *et al*., 2002)	95 ºС – 5 мин; 32 цикла: 95 ºС – 30 с, 65 ºС – 30 с, 72 ºС – 2 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	4F и **4R** (McLauchlan *et al*., 2001)	94 ºС – 3 мин; 30 циклов: 94 ºС – 60 с, 58 ºС – 60 с, 72 ºС – 30 с; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	BDFL и **BRC1** (Saito *et al*., 2009)	95 ºС – 5 мин; 32 цикла: 95 ºС – 30 с, 65 ºС – 30 с, 72 ºС – 2 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	Wx-B1L и **Wx-B1R** (Vanzetti *et al*., 2009)	95 ºС – 5 мин; 32 цикла: 95 ºС – 30 с, 65 ºС – 30 с, 72 ºС – 2 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
Wx-D1	**Wx-D1-2-F**, **Wx-D1-2-R** (Shariflou *et al*., 2001)	95 ºС – 3 мин; 40 циклов: 94 ºС – 30 с, 55 ºС – 45 с, 72 ºС – 1 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	Wx-D1-1-F, **Wx-D1-1-R** (Vrinten *et al*., 1999)	95 ºС – 3 мин; 40 циклов: 94 ºС – 30 с, 55 ºС – 45 с, 72 ºС – 1 мин; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин
	BDFL и **DRSL** (Nakamura *et al*., 2002)	94 ºС – 5 мин; 32 цикла: 94 ºС – 30 с, 58 ºС – 30 с, 72 ºС – 120 с; 1 цикл: 72 ºС – 7 мин

* После амплификации проводился гидролиз ПЦР-продукта эндонуклеазой рестрикции *Hind*III («Fermentas», Литва) при 37 ºС в течение 1 часа. Фрагменты ДНК, полученные в результате гидролиза, разделяли в агарозном геле.

два, Старшина и Сила, имеют нуль-аллели по данному гену. Все остальные сорта коллекции несли аллели дикого типа гена *Wx-A1*.

Ген *Wx-B1*. Для анализа локуса *Wx-B1* необходимо использовать сочетание молекулярных маркеров, что позволяет выявить не только нуль-аллели, но и функциональные аллельные варианты, отличные от аллеля дикого типа, так как молекулярные маркеры, разработанные McLauchlan с соавт. (2001) и Nakamura с соавт. (2002), не позволяют различить нуль-аллель *Wx-B1b* и функциональный аллель *Wx-B1e* и дают ложноположительные результаты присутствия нуль-аллеля (рис. 2, а, б) (Vanzetti *et al*., 2009; Дивашук и др., 2011).

Saito с соавт. (2009) разработали кодоминантный маркер нуль-аллеля *Wx-B1*. При его использовании в ПЦР амплифицируются фрагменты длиной 668 п.н. при наличии нуль-аллеля и 778 п.н. при наличии аллеля дикого типа в локусе *Wx-B1*. Размер продукта амплификации у образца, несущего аллель *Wx-B1e*, составляет 804 п.н. (Дивашук и др., 2011) (рис. 2, в). Кроме того, Vanzetti с соавт. (2009) была предложена пара праймеров Wx-B1L/Wx-B1R для идентификации трех аллелей: *Wx-B1a*, *Wx-B1b* и *Wx-B1e*.

На основании амплификации с использованием четырех различных систем молекулярных маркеров нами было установлено, что только 2 сорта из 99 сортов Краснодарского НИИСХ им. П.П. Лукьяненко – Нота и Ласточка – несут в своем геноме аллель *Wx-B1e* (рис. 2). Сортов, несущих нуль-аллели в локусе *Wx-B1*, выявлено не было.

Ген *Wx-D1*. Для определения аллельного состояния гена *Wx-D1* использовали три молекулярных маркера (табл.). Было показано, что все сорта исследуемой коллекции несли аллели *Wx-D1a* – аллели дикого типа.

Обсуждение

При молекулярно-генетическом анализе 99 сортов из коллекции мягких пшениц селекции КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко, показано, что два сорта имеют аллели *Wx-B1e* гена *Wx-B1* и два сорта несут нуль-аллели *Wx-A1b* гена *Wx-A1*.

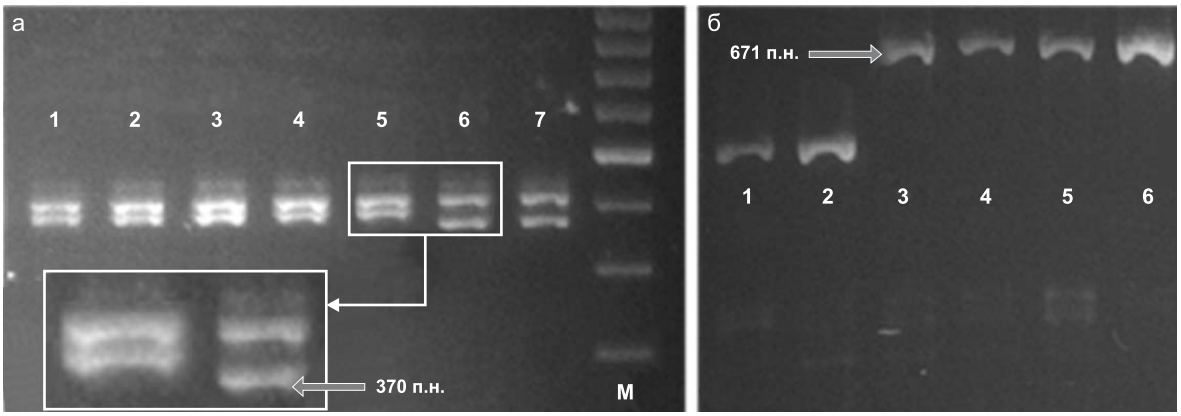


Рис. 1. Электрофореграмма: а – продуктов ПЦР, полученных с праймерами AFC и AR2 (1 – сорт Безостая 1, 2 – сорт Кособрюховка, 3 – сорт Васса, 4 – сорт Фишт, 5 – сорт Леда, 6 – сорт Сила, 7 – сорт Старшина; М – маркер длины фрагментов ДНК); б – ампликонов, полученных с праймерами Wx-A1b-F-MH и Wx-A1b-R-MH и обработанных эндонуклеазой рестрикции *Hin*dIII (1, 2 – сорт Безостая 1; 3, 4 – сорт Сила, 5, 6 – сорт Старшина). Серая стрелка – фрагменты, соответствующие наличию аллеля *Wx-A1b*.

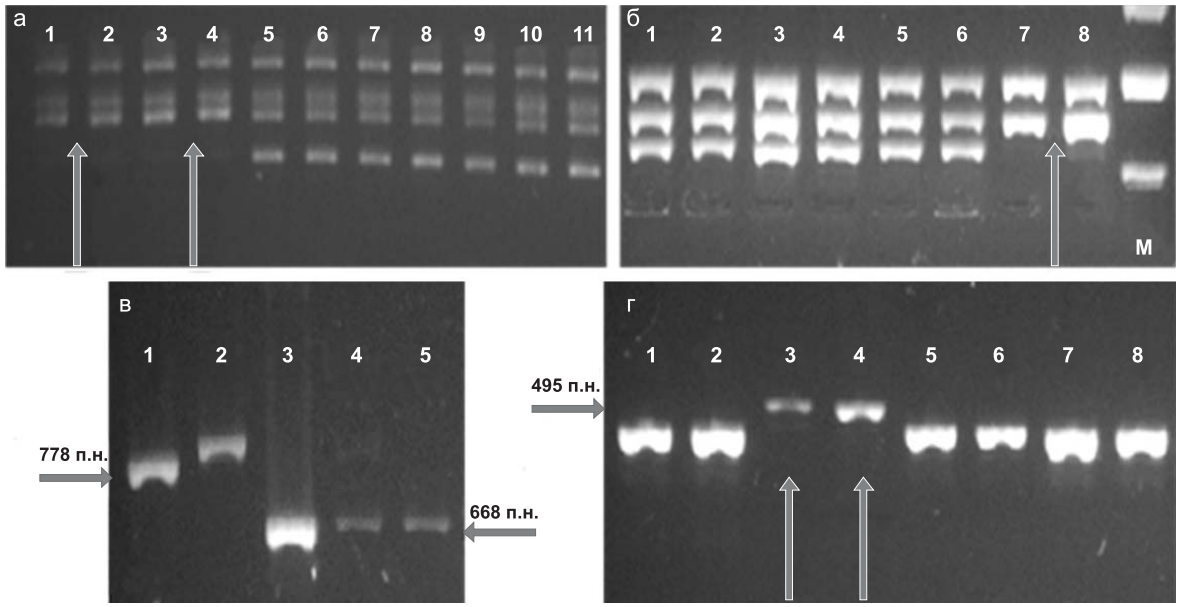


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных с праймерами 4F и 4R.

а – 4F и 4R (1, 2 – сорт Ласточка; 3, 4 – сорт Нота; 5, 6 – сорт Безостая 1; 7, 8 – сорт Кособрюховка; 9, 10 – сорт Васса; 11 – сорт Фишт); б – BDFL и BRD (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Кособрюховка; 3 – сорт Васса; 4 – сорт Фишт; 5 – сорт Сила; 6 –сорт Старшина; 7 – сорт Ласточка; 8 – сорт Нота; М – маркер длины фрагментов ДНК); в – BDFL и BRC1 (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Ласточка; 3–5 – контрольный образец, несущий нуль-аллель Wx-B1b Hokkai 252); г – Wx-B1L и Wx-B1R (1 – сорт Безостая 1; 2 – сорт Кособрюховка; 3 – сорт Ласточка; 4 – сорт Нота; 5 – сорт Сила; 6 – сорт Старшина; 7 – сорт Васса; 8 – сорт Фишт). Серая стрелка – тип амплификации, соответствующий аллелям, отличным от дикого типа.

В то же время в коллекциях сортов азиатских стран обнаруживалось до двадцати процентов сортов, несущих нуль-аллели по генам *Wx-A1* и *Wx-B1* (Nakamura *et al*., 1992; Yamamori *et al*., 1994). Полученные нами результаты можно объяснить тем, что пониженное содержание амилозы, которое обусловливается наличием нуль-аллелей генов *Wx* в геноме, оказывает вы-

раженное положительное влияние на качество лапши удон, основного продукта, на производство которого используется мягкая пшеница в азиатских странах. А основное использование мягкой пшеницы в России – это, прежде всего, хлебопечение. В этом случае выраженного положительного влияния на хлебопекарные качества пшеницы наличие только одного нуль-аллеля не оказывает и, соответственно, давление искусственного отбора в этом направлении отсутствует. Также следует учитывать, что основные источники нуль-аллелей – это белозерные сорта азиатского происхождения. В России селекция пшеницы традиционно ориентируется на краснозерные сорта ввиду ряда их преимуществ. Поэтому и вероятность нейтрального привнесения нуль-аллеля в результате селекционных скрещиваний была крайне мала. В сорт Ласточка аллель *Wx-B1e*, вероятнее всего, пришел из родительской формы аргентинской яровой пшеницы (http://genbank.vurv.cz). Аллельный вариант *Wx-B1e* встречается среди сортов аргентинской селекции (Vanzetti *et al*., 2009). В случае сорта Нота таких очевидных путей привнесения редкого для данного региона аллеля не прослеживается (http://genbank.vurv.cz). В сорт Старшина нуль-аллель *Wx-A1b*, вероятнее всего, был привнесен через родительский сорт Colt (http://genbank.vurv.cz).

Полученная в данной работе информация об аллельном состоянии по генам *Wx* в сортах КНИИСХ им. П.П. Лукьяненко позволит наметить отправные точки нового направления селекции мягкой озимой пшеницы – селекции сортов с модифицированным составом крахмала с использованием в качестве основы высокоурожайных и качественных сортов Старшина и Сила и привлечением источников нуль-аллелей по другим генам *Wx*.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.», государственный контракт № 16.518.11.7089 от 29 августа 2011 г.

Литература

Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля *Wx-B1e* мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // Генетика. 2011. Т. 47. № 12. С. 1611–1615.

Bernatzky R., Tanksley S.D. Toward a saturated linkage map in tomato based on isozyme and random cDNA sequences // Genetics. 1986. V. 112. P. 887–898.

Boggini G., Cattaneo M., Paganoni C., Vaccino P. Genetic variation for waxy proteins and starch properties in Italian wheat germplasm // Euphytica. 2001. V. 119. P. 113–116.

Briney A., Wilson R., Potter R.H. *et al*. A PCR-based marker for selection of starch and potential noodle quality in wheat // Mol. Breeding. 1998. V. 4. P. 427–433.

Chao S., Sharp P., Worland E. *et al*. RELP-based genetic map of wheat homeologous group 7 chromosomes // Teor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 495–504.

Demeke T., Hucl P., Chibbar R.N. Frequent absence of GBSSI isoprotein in endosperm starch of Canadian wheat cultivars // Starch. 2000. V. 52. P. 349–352.

Epstein J., Morris C.F., Huber K.C. Instrumental texture of white salted noodles prepared from recombinant inbred lines of wheat differing in the three granule bound starch synthase (waxy) genes // J. Cereal Sci. 2002. V. 35. P. 51–63.

Graybosh R.A. Waxy wheats: origin, properties and prospects // Trends Food Sci. Technol. 1998. V. 9. P. 135–142.

Guzmán C., Caballero L., Alvarez J.B. Molecular characterization of the *Wx-B1* allelic variants identified in cultivated emmer wheat and comparison with those of durum wheat // Mol. Breeding. 2010. V. 28. P. 403–411.

James M., Denyer K., Myers A. Starch synthesis in the cereal endosperm // Curr. Opin. Plant Biol. 2003. V. 6. P. 215–222.

Liu J., He Z., Yang J. *et al*. Variation of starch property and its relationship with dry white Chinese noodle quality in common wheat // Agric. Sci. in China. 2003. V. 36. P. 1–7.

McLauchlan A., Ogbonnaya F.C., Hollingsworth B. *et al*. Development of robust PCR-based DNA markers for each homeoallele of granule-bond starch synthase and their application in wheat breeding programs // Aust. J. Agric. Res. 2001. V. 52. P. 1409–1416.

Nakamura T., Yamamori M., Hidaka S., Hoshino T. Expression of HMW Wx protein in Japanese common wheat (*Triticum aestivurn* L.) cultivars // Jpn. J. Breed. 1992. V. 42. P. 681–685.

Nakamura T., Jamamori M., Hirano H. *et al*. Production of waxy (amylase-free) wheat // Mol. Gen. Genet. 1995. V. 248. P. 253–259.

Nakamura T., Vrinten P., Saito M., Konda M. Rapid classification of partial waxy wheats using PCR-based markers // Genome. 2002. V. 45. P. 1150–1156.

Rodríguez-Quijano M., Nieto-Taladriz M.T., Carrillo J.M. Polymorphism of waxy proteins in Iberian hexaploid wheats // Plant Breeding. 1998. V. 117. P. 341–344.

Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. *et al*. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs// Mol. Breeding. 2009. V. 23. P. 209–217.

Shariflou M.R., Hassani M.E., Sharp P.J. A PCR-based DNA marker for detection of mutant and normal alleles of the

Wx-D1 gene of wheat // Plant Breeding. 2001. V. 120. No 2. P. 121–124.

Shure M., Wessler S., Fedoroff N. Molecular identification and isolation of waxy locus in maize // Cell. 1983. V. 35. P. 225–233.

Takeshi Y. Waxy and low-amylose mutants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and their starch, flour and grain properties // JARQ 40. 2006. V. 40. P. 327–331.

Urbano M., Margiotta B., Colaprico G., Lafiandra D. Waxy proteins in diploid, tetraploid and hexaploid wheats // Plant Breeding. 2002. V. 121. P. 465–469.

Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez-Quijano M. *et al*. Genetic variability for *waxy* genes in Argentinean bread wheat germplas // Electronic J. Biotechnol. 2009. V. 12. P. 1–9.

Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // Mol. General Genet. 1999. V. 261. P. 463–471.

Yamamori M., Nakamura T., Endo T.R., Nagamine T. Waxy protein deficiency and chromosomal location of coding genes in common wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 89. P. 179–184. http://genbank.vurv.cz

DISTRIBUTION OF ALLELIC VARIANTS OF *Wx* GENES IN THE COMMON WHEAT COLLECTION MADE AT THE KRASNODAR LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE

M.V. Klimushina[1], N.I. Gladkih[1], M.G. Divashuk[1], L.A. Bespalova[2], A.V. Vasilyev[2], G.I. Karlov[1]

[1] Russian State Agrarian University–Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Center for Molecular Biotechnology, Moscow, Russia, e-mail: mklimushina@gmail.com;
[2] Department of Wheat and Triticale Breeding,
Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia

Summary

Molecular marker-based identification of allelic variants of *Wx* genes has been performed in the collection of 99 common wheat cultivars and breeding lines developed at the Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture.

Use of two molecular markers to the *Wx-A1* gene shows that cultivars ‘Starshina’ and ‘Sila’ carry null alleles of *Wx-A1*. Studies with four systems of molecular markers indicate that cultivars ‘Nota’ and ‘Lastochka’ possess the *Wx-B1e* allele. No cultivars with null-alleles of *Wx-B1* have been found. Only wild-type alleles are present in the *Wx-D1* locus.

Key words: common wheat, molecular markers, *Wx* genes.

УДК: 575.21:577.1:633.111

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ ПРИЗНАКОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ ТРИТОНОМ Х-100 У МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

© 2012 г. **К.Х. Махмудова[1], Е.Д. Богданова[1], С.С. Кирикович[2], Е.В. Левитес[2]**

[1] Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, Алматы, Казахстан, e-mail: carinamakh@mail.ru;
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 10 декабря 2011 г. Принята к публикации 26 декабря 2011 г.

Представлены результаты исследования нескольких поколений линий мягкой пшеницы, несущих изменения, индуцированные неионным детергентом Тритоном Х-100 (ТХ-100). Показано, что индуцированные изменения, отмеченные ранее в первых поколениях размножения линий, наблюдаются также в четвертом, пятом и шестом поколениях.

Ключевые слова: мягкая пшеница, индукция; Тритон Х-100, селекция, изменчивость, наследование изменений.

Введение

Известно, что изменения агроклиматических условий и стремительно меняющиеся требования рынка приводят к постоянному сокращению срока жизни новых сортов. В таких условиях селекция пшеницы, как и любой другой сельскохозяйственной культуры, остро нуждается в разнообразном исходном материале, обладающем комплексом ценных хозяйственно-биологических признаков. Основное внимание селекционеров при создании новых сортов пшеницы обращено на повышение массы зерна в колосе. Согласно литературным данным, *потенциальная* урожайность яровой мягкой пшеницы достигла довольно высокого уровня – 10–12 т/га (Павлова, 2010). Дальнейшее повышение урожайности связывают с созданием высокоинтенсивных сортов, способных отвечать большими прибавками урожая на дополнительные вложения в агротехнику. Продуктивность сорта в целом определяется рядом признаков: продуктивной кустистостью, количеством колосков в колосе, числом зерен в колосе, массой 1000 зерен, продуктивностью главного колоса и растения в целом. Каждый признак вносит определенный вклад в формирование продуктивности растения. Успех селекции обеспечивается наличием разнообразного исходного материала, его генетической изученностью и использованием новых подходов, позволяющих расширять изменчивость выбранной культуры и выявлять перспективные селекционные формы. Хотя основным источником исходного материала зачастую является мировая коллекция, существует острая необходимость разработки разнообразных методов индукции стабильных изменений важных признаков, определяющих урожайность.

Известно, что стабильные наследуемые изменения у растений могут быть получены воздействием различных химических веществ, в частности эпимутагенов. Например, 5-азацитидин, вызывающий деметилирование остатков цитозина в молекуле ДНК и активирование ранее неактивных генов, приводит к наследуемому изменению многих морфофизиологических признаков (Jones, 1985; Janousek *et al.*, 1996). Обработка растений яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) сорта Казахстанская-126

растворами никотиновой кислоты привела к возникновению формы пшеницы Генотроф-1 с измененными морфофизиологическими признаками, с повышенной жизнеспособностью, большей устойчивостью к экстремальным воздействиям окружающей среды по сравнению с исходным сортом (Богданова, 1992, 2003; Богданова и др., 2009). Показано, что эти изменения сохранялись в течение 57 поколений (Богданова, 2003), к настоящему времени получено 65-е поколение. Наследуемые изменения могут быть вызваны также изменением соотношения компонентов питания растений (Durrant, 1962; Durrant, Timmis, 1973). Резкое изменение минерального питания проростков различных линий льна вызывает появление мощных высокорослых растений, у которых были увеличены вес и размер семян, характер опушения листьев; возникшие изменения оказались наследуемыми (Durrant, 1962; Durrant, Timmis, 1973). Разнообразие факторов, позволяющих получать наследуемые изменения, свидетельствует о множестве путей воздействия окружающей среды на растения и множестве механизмов ответа растений на эти воздействия.

Эти данные послужили основанием для поиска новых способов воздействия на геном пшеницы. Теоретическим обоснованием для представленного нами нового подхода стали результаты исследований, свидетельствующие о значительной роли ядерной мембраны в структурно-функциональной организации генома эукариот (Kimoto, 1958; Comings, Kakefuda, 1968; Груздев, Кикнадзе, 1970; Мосолов, 1972; Bourgeois, Hubert, 1988; Стегний, 1993; Taddei *et al.*, 2004; Levites, 2005). В связи с этим в качестве вещества, вызывающего изменения в структуре генома, был выбран Тритон Х-100 (ТХ-100), способный отделять белки и нуклеопротеиды от мембран. Исследования, проведенные нами на пшенице и сахарной свекле, показали эффективность ТХ-100 как эпимутагена. Так, было показано, что обработка растений пшеницы на стадии прорастания семян и на стадии начала колошения приводит к разнообразным изменениям структуры колоса и эти изменения передаются в следующие поколения (Махмудова, 2007; Махмудова и др., 2009). Воздействие ТХ-100 на сахарную свеклу приводило с высокой частотой к изменению морфологии корня и листьев, признака «стерильность–фертильность» пыльцы, динамики прорастания (Kirikovich, Levites, 2009; Кирикович, Левитес, 2010). В потомстве, полученном от саморепродукции обработанных с помощью ТХ-100 растений сахарной свеклы, выявлено нарушение экспрессии ферментного локуса, контролирующего глюкозофосфатизомеразу (GPI2): в спектре GPI2 наблюдалось появление изоферментов с эпигенетически измененной электрофоретической подвижностью (Левитес, Кирикович, 2010). Эти данные говорят о том, что в основе этих морфологических изменений вполне вероятно лежат изменения в организации растительного генома.

Целью данной работы было: оценить степень стабильности изменений, индуцированных ранее у мягкой пшеницы с помощью Тритона Х-100.

Материалы и методы

Объектом исследований являлись линии, полученные под воздействием ТХ-100 на растения яровой мягкой пшеницы сорта Алем, созданного Е.Д. Богдановой. Воздействие на пшеницу проводили только в первый год эксперимента в 2005 г. (Махмудова, 2007; Махмудова и др., 2009) путем замачивания семян в водных растворах с различными концентрациями ТХ-100 (1; 0,1 и 0,01 %) в течение 24 ч при температуре 25–30 ºС. Контролем служили сухие и замоченные в воде семена. В фазе кущения провели опрыскивание вегетирующих растений соответствующими растворами ТХ-100 (1; 0,1 и 0,01 %). Использовали рядковый посев с расстоянием между рядами 15 см и расстоянием между растениями 5 см. Опыты закладывали рендомизированно. По каждому варианту высевали по 50 семян в двукратной повторности. В период вегетации проводили фенологические наблюдения за сроками появления всходов, кущения, выхода флагового листа и налива зерна. С каждой делянки брали пробы для проведения снопового анализа. Анализировали по 25 растений с каждой делянки. В последующие годы обработка раствором ТХ-100 не проводилась, а посев потомств от измененных растений проводили в 3-кратной повторности по 25 зерен, анализируя морфологические и физиологические

признаки растений. В процессе размножения потомств E_2–E_5 обработанных растений были созданы линии пшеницы, несущие измененные признаки.

Плотность колоса рассчитывали по формуле Д = (А–1) × 10/Б, где Д – индекс плотности (количество колосков на 10 см колосового стержня); А – количество колосков в колосе; Б – длина колоса в сантиметрах. У мягкой пшеницы колос считается рыхлым, если на 10 см колосового стержня приходится до 16 колосков, среднеплотным – при 17–22, плотным – при 23–28 и очень плотным – при наличии свыше 28 колосков на 10 см колосового стержня.

Достоверность отличия фактических данных от теоретически ожидаемых оценивали по общепринятым методикам (Лакин, 1973).

Почвенно-климатические условия проведения исследований

Полевая часть работ проходила в Казахском научно-исследовательском институте земледелия и растениеводства (КазНИИЗР). Экспериментальный участок расположен в зоне предгорной равнины на высоте 740 м над уровнем моря. Почвы этой зоны – светло-каштановые, суглинистые, реже супесчаные. Содержание гумуса в верхнем слое почвы достигает 3 %. Среднее годовое количество осадков составляет 414 мм с колебаниями от 332 до 644 мм. Распределение осадков неравномерное, в основном они приходятся на апрель–начало июня. Максимальная температура воздуха в июле–августе 40 ºС. Отмечены очень резкие суточные колебания температуры воздуха, что приводит к обильному образованию ночной росы. В июне–июле наблюдаются суховеи. Длина безморозного периода в среднем 140 дней с колебаниями от 110 до 185 сут. Первые осенние заморозки наблюдаются обычно в начале или середине октября. Снеговой покров устанавливается в конце ноября, а порой и в конце декабря, и исчезает в марте. Глубина его составляет 25–30 см, а в малоснежные зимы – 10–15 см. Сухая осень неблагоприятна для посева озимых на неполивных землях; в этих условиях всходы появляются только весной. Осенние поливы создают хорошие условия для перезимовки всходов. Случаи гибели озимых и даже яровых пшениц на поливных землях при осеннем посеве очень редки.

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что обработка растений раствором ТХ-100 приводит к изменению целого ряда морфологических признаков, в том числе и признаков колоса (Махмудова, 2007; Махмудова и др., 2009). У обработанных растений обнаружены признаки «сквердхедный колос» и «удвоенные колоски» (рис. а, б).

Обработка исходного сорта яровой мягкой пшеницы Алем 1 %-м раствором ТХ-100 вызвала полную гибель растений. После обработки исходного сорта яровой мягкой пшеницы Алем 0,1 %- и 0,01 %-м растворами ТХ-100 были получены следующие типы колоса: сквердхедный с удвоенными колосками; сквердхедный без удвоенных колосков; длинный рыхлый с удвоенными колосками; длинный рыхлый без удвоенных колосков; среднеплотный с удвоенными колосками; среднеплотный без удвоенных колосков (Махмудова, 2007).

Следует отметить, что исходный сорт Алем обладает таким морфологическим признаком, как удвоенный колосок типа *duospiculum* – дополнительный колосок в позиции над основным; сорта и линии, полученные на основе линии Генотроф-1, часто несут этот признак. Частота встречаемости этого признака у выживших обработанных растений первого поколения выше, чем у исходного сорта: при использовании 0,1 %-го раствора ТХ-100 этот признак несут 90,9 % растений, а при использовании 0,01 %-го раствора ТХ-100 соответственно 72,7 % растений, в то время как в исходном сорте Алем частота данного признака составляет 1 % (Махмудова, 2007).

Обработанные раствором ТХ-100 растения с измененным типом колоса превосходят исходный сорт Алем по числу зерен в колосе (Махмудова, 2007; Махмудова и др., 2009). Возврата к типу колоса исходного сорта Алем во втором поколении не обнаружено. Поколения растений после обработки мы обозначили E_1, E_2 и т. д. Результаты изучения 4-го и 5-го поколений созданных линий представлены в табл. 1–3. Можно видеть, что потомства обработанных растений сохраняют в этих поколениях

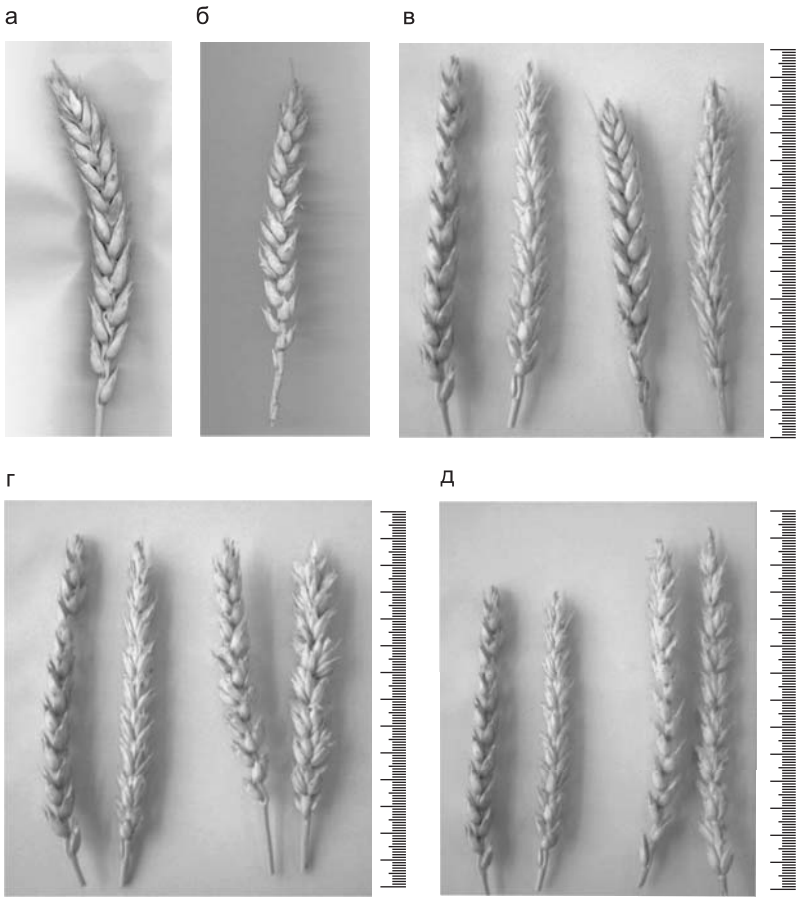


Рис. Колосья линий мягкой пшеницы, обработанных растворами ТХ-100.

а – сверхедный колос линии 1-09 (обработка 0,1 %-м раствором ТХ-100); б – колос линии 10-09 с удвоенными колосками (указано стрелкой), полученный при обработке 0,01 %-м раствором ТХ-100); в – колосья исходного сорта Алем (два слева) и сверхедные колосья линии 1-09 (два справа), полученные при обработке 0,1 %-м раствором ТХ-100, E_6; г – колосья исходного сорта Алем (два слева) и рыхлые колосья линии 10–09 (два справа) с удвоенными колосками (указаны стрелкой), полученные при обработке 0,01 %-м раствором ТХ-100, E_6; д – колосья исходного сорта Алем (два слева) и длинные рыхлые колосья линии 7-09 без удвоенных колосков (два справа), полученные при обработке 0,01 %-м раствором ТХ-100, E_6.

преимущество над исходным сортом Алем по таким показателям, как число зерен в колосе и масса зерна в колосе (табл. 1 и 2).

У линий 1-09, 6-09 и 7-09, хорошо зарекомендовавших себя в яровых посевах, число зерен в главном колосе составляет соответственно 60,3 ± 0,9; 40,4 ± 0,6; 49,4 ± 0,7, в то время как в контрольном сорте Алем этот показатель составляет 30,4 ± 0,8 (табл. 1). Масса зерна главного колоса у этих линий – 2,5 ± 0,1; 2,0 ± 0,1 и 2,0 ± 0,1 соответственно, а у сорта Алем – 1,0 ± 0,1 г. Минимальное число зерен выявлено в линии 6-09, оно составляло 40,4 ± 0,6, однако и оно достоверно превышает аналогичный показатель у контрольного сорта. У линий 8-09, 9-09 и 10-09, планируемых для озимых посевов, число зерен в главном колосе составляет соответственно: 47,0 ± 0,7; 49,2 ± 0,5; 43,0 ± 0,5. Масса зерна главного колоса у этих линий – 2,0 ± 0,1, 2,1 ± 0,1, 2,0 ± 0,1 (табл. 1). Все эти показатели достоверно отличаются от показателей контрольного сорта Алем.

Характеристика урожайности линий пятого поколения E_5 дана в табл. 2.

У линий ярового направления 1-09, 6-09 и 7-09 сохраняется достоверное превышение над исходным сортом Алем по числу зерен в главном колосе, хотя достоверное превышение над

Таблица 1

Структурный анализ четвертого поколения растений мягкой пшеницы, индуцированных детергентом ТХ-100 (2009 г.)

Сорт, линия	Длина стебля	Кустистость, шт.	Главный колос			
			длина, см	число колосков	число зерен	масса зерна, г
Контроль (исходный сорт)						
Алем	69,8 ± 1,2	3,9 ± 0,1	8,5 ± 0,6	16,0 ± 0,8	30,4 ± 0,8	1,02 ± 0,13
Четвертое поколение						
1-09	85,2 ± 1,9	4,4 ± 0,2	9,3 ± 0,5	19,3 ± 0,7	60,3 ± 0,9	2,5 ± 0,1
2-09	81,3 ± 2,0	4,2 ± 0,2	9,9 ± 0,5	19,5 ± 0,8	67,0 ± 0,9	2,5 ± 0,1
3-09	80,8 ± 1,3	4,1 ± 0,2	9,1 ± 0,4	19,2 ± 0,8	56,4 ± 0,8	2,1 ± 0,1
4-09	82,0 ± 1,7	3,6 ± 0,2	9,7 ± 0,6	19,5 ± 0,7	60,5 ± 0,8	2,3 ± 0,1
5-09	81,9 ± 1,7	3,6 ± 0,2	9,4 ± 0,6	20,2 ± 0,8	57,2 ± 0,7	2,05 ± 0,1
6-09	81,4 ± 1,2	3,6 ± 0,2	9,1 ± 0,6	17,5 ± 0,8	40,4 ± 0,6	2,0 ± 0,1
7-09	88,4 ± 2,0	3,7 ± 0,1	10,1 ± 0,6	17,6 ± 0,7	49,4 ± 0,7	2,0 ± 0,1
8-09	87,5 ± 1,3	3,4 ± 0,1	9,3 ± 0,4	16,6 ± 0,7	47,0 ± 0,7	2,0 ± 0,1
9-09	91,9 ± 2,0	4,0 ± 0,1	10,1 ± 0,5	18,8 ± 0,7	49,2 ± 0,5	2,1 ± 0,1
10-09	84,9 ± 2,0	3,6 ± 0,1	8,7 ± 0,5	17,0 ± 0,7	43,0 ± 0,5	2,0 ± 0,1
11-09	82,8 ± 1,3	3,4 ± 0,1	9,8 ± 0,6	17,6 ± 0,8	43,8 ± 0,5	2,0 ± 0,1

Доверительная вероятность $P = 0,95$.

сортом Алем по массе зерна в главном колосе отмечено только у линии 7-09 (табл. 2). Линии озимого направления 8-09, 9-09 и 10-09 также достоверно превышают исходный сорт Алем по числу зерен в главном колосе, но достоверное превышение над сортом Алем по массе зерна в главном колосе отмечено только у линии 9-09 (табл. 2). Таким образом, в пятом после обработки Тритоном Х-100 поколении растений сохраняется повышенное число зерен в главном колосе, хотя масса зерна в нем у некоторых линий не отличается от исходного сорта.

Отбор проводится не только по таким признакам, как скверхедный колос, длинный рыхлый колос и рыхлый колос, удвоенные колоски, число зерен в колосе и масса зерна, но и по качеству зерна (стекловидное, имеющее сомкнутую бороздку). В итоге для дальнейших исследований в поколении E_6 отобраны три линии, хорошо ведущие себя в яровом посеве (1-09, 6-09, 7-09), и три линии, хорошо показавшие себя в озимом посеве 2007 г. (8-09, 9-09 и 10-09). В табл. 3 представлены описание этих линий и частота встречаемости признака «удвоенный колосок» в E_6. Было проанализировано по 45 растений в каждом варианте опыта.

Разная реакция исследованных линий на воздействие ТХ-100 может указывать на сложный полигенный контроль этих признаков. Можно предположить, что в разных линиях воздействию ТХ-100 подверглись различные гены из тех генетических систем, которые определяют данные признаки. По-видимому, изменения некоторых из этих генов нестабильны, и их экспрессия постепенно снижается. Линии, обладающие стабильно высокой озерненностью, представляют особый интерес; они будут использоваться в различных селекционных программах.

Изменению подверглись не только морфологические, но и физиологические признаки. Наблюдения за сроками колошения и созревания показали, что потомства растений мягкой пшеницы, обработанных детергентом ТХ-100, стали позднее колоситься и созревать в среднем на 7 дней позднее. Это хорошо продемонстрировано на линиях ярового направления (табл. 4).

С практической точки зрения такой признак, как позднеспелость, в природно-климатических условиях Алматинской области считается нежелательным, поэтому измененные формы будут вовлечены в скрещивания с раннеспелыми

Таблица 2

Анализ элементов урожайности пятого поколения растений мягкой пшеницы, индуцированных детергентом ТХ-100 (2010 г.)

Сорт, линия	Длина стебля, см	Кустистость, шт.	В главном колосе			
			длина, см	число колосков, шт.	число зерен, шт.	масса зерна, г
Контроль (исходный сорт)						
Алем	84,4 ± 0,8	3,4 ± 1,4	11,5 ± 0,6	19,4 ± 0,8	55,4 ± 0,8	1,75 ± 0,4
Пятое поколение						
1-09	81,6 ± 0,8	3,2 ± 0,5	10,8 ± 0,8	19,9 ± 1,6	63,3 ± 1,9	2,1 ± 0,4
2-09	75,4 ± 1,9	3,1 ± 0,3	11,1 ± 0,4	19,6 ± 2,0	67,5 ± 2,7	2,2 ± 0,4
3-09	76,2 ± 2,4	3,0 ± 1,9	10,2 ± 1,3	20,1 ± 2,2	75,9 ± 2,8	2,2 ± 1,1
4-09	82,2 ± 1,1	3,7 ± 0,7	10,7 ± 1,1	19,6 ± 1,4	69,5 ± 0,8	2,1 ± 0,5
5-09	86,4 ± 0,8	3,4 ± 1,4	11,1 ± 0,3	20,0 ± 2,5	76,4 ± 2,7	2,5 ± 0,3
6-09	86,0 ± 1,9	3,3 ± 0,7	10,5 ± 2,3	18,4 ± 0,8	58,9 ± 2,2	2,1 ± 0,2
7-09	92,1 ± 0,9	3,6 ± 0,8	12,6 ± 1,3	19,4 ± 2,0	70,1 ± 2,2	2,6 ± 0,3
8-09	94,9 ± 2,2	4,3 ± 1,3	12,6 ± 1,0	19,7 ± 2,6	71,2 ± 1,8	2,5 ± 0,5
9-09	95,5 ± 2,7	3,1 ± 0,9	12,7 ± 1,9	20,1 ± 2,2	69,5 ± 2,7	2,7 ± 0,5
10-09	92,9 ± 2,8	3,6 ± 2,0	11,7 ± 1,3	20,6 ± 2,0	71,2 ± 2,8	2,7 ± 0,6
11-09	89,7 ± 2,6	4,1 ± 1,5	12,5 ± 1,4	19,8 ± 1,8	66,5 ± 1,4	2,5 ± 0,2

Доверительная вероятность $P = 0,95$.

Таблица 3

Описание колоса линий шестого поколения растений мягкой пшеницы, индуцированных детергентом ТХ-100 (2011 г.)

Вариант опыта	Частота встречаемости признака «удвоенный колосок», %	Описание колоса
Сорт Алем	1,0	Среднеплотный, пирамидальный, прямой, не поникает
Линия 1-09	–	Средней длины, плотный, сверхедный
Линия 6-09	22,2	Рыхлый, длинный, пирамидальный
Линия 7-09	15,5	
Линия 8-09	14,2	Рыхлый, длинный, пирамидальный
Линия 9-09	20,5	
Линия 10-09	36,4	Рыхлый, средней длины, веретеновидный

Таблица 4

Элементы продуктивности, сроки колошения и созревания поколения E_4 растений мягкой пшеницы, индуцированных детергентом ТХ-100 (2009 г.)

Образец/ концентрация раствора	Главный колос			Дата колошения	Дата созревания
	длина, см	число колосков, шт.	число зерен, шт.		
Алем (контроль)	12,1 ± 0,2	20,0 ± 0,4	61,0 ± 1,2	17.06.09	06.08.09
1-09 (0,1 %)	12,5 ± 0,1	25,0 ± 0,3	67,0 ± 1,3	23.06.09	13.08.09
6-09 (0,01 %)	12,9 ± 0,3	20,0 ± 0,2	66,0 ± 0,8	23.06.09	13.08.09
7-09 (0,01 %)	12,0 ± 0,3	20,0 ± 0,2	68,0 ± 1,9	23.06.09	13.08.09

сортами. Признак «удвоенный колосок» может быть востребован в прикладной селекции только в том случае если образуются полноценные дополнительные колоски. Но сами полученные изменения представляют интерес с теоретической точки зрения как вклад в изучение изменчивости в целом.

Таким образом, индуцированные неионным детергентом ТХ-100 изменения морфологии колоса у растений пшеницы сорта Алем сохранились в E_4 и в ряде линий и в E_5 после обработки поколений. Во всех линиях в E_4 и в ряде линий E_5 отмечено увеличение числа зерен в колосе по сравнению с исходным сортом (табл. 1, 2), кроме того, в E_4 все линии превосходили контрольный сорт по массе зерна с главного колоса, и в E_5 часть линий также достоверно превосходила контроль по массе зерна с главного колоса. К настоящему времени получено 6-е поколение растений мягкой пшеницы (E_6), индуцированных детергентом ТХ-100 (материал проходит обработку). У экспериментально полученных форм E_6 отмечены сохранение типов колоса и наличие удвоенных колосков (рис. в–д).

Можно предположить, что обработка детергентом ТХ-100 вывела сравнительно молодой сорт Алем (год выделения элитного растения – 1991 г.) из состояния биологического равновесия, позволив выделиться фенотипам, присущим ранее формам, которые были вовлечены в скрещивания при создании самого сорта Алем и его родителей. В нашем распоряжении есть одногодичные неопубликованные экспериментальные данные по обработке эпимутагенами более старых сортов не казахстанской селекции, в этом случае не обнаружено изменений в морфологии колоса, но отмечено запоздание в сроках колошения. Также есть неопубликованные данные по обработке молодого сорта яровой мягкой пшеницы Дастархан (год выделения элитного растения – 2001 г.), в этом случае отмечено появление удвоенных колосков. Наиболее интересным остается вариант обработки сорта Алем. Полученные данные позволяют предположить, что описанным выше методом можно восстанавливать и использовать генетический потенциал молодых сортов, заложенный природой в исходных родительских формах, расширяя, таким образом, спектр изменчивости.

Известно, что геном служит основным носителем информации о ходе онтогенеза растения от семени до семени. Однако реализация заключенной в геноме информации зависит не только от конкретных генов, но также и от внешних условий. Полученную изменчивость мы относим к эпигенетической; в 2008 г. нами был получен патент на использование ТХ-100 в качестве эпимутагена (А. с. 2322801). Характерной особенностью ТХ-100 как эпимутагена является то, что он действует не на хромосомы и ДНК, а на процесс их взаимодействия с ядерной мембраной и ядерным матриксом. Учитывая тот факт, что ядерная мембрана играет большую роль в структурно-функциональной организации генома, можно утверждать, что ТХ-100 способен вызывать широкий спектр эпигенетических изменений. Так, ранее с помощью модифицированного метода ISSR-амплификации нами было показано, что воздействие раствором ТХ-100 вызывает изменения ПЦР-профилей ферментных локусов *Me1* и *Adh1* у линий пшеницы с измененной морфологией (Makhmudova *et al.*, 2011). Наличие в одних и тех же линиях пшеницы изменений как морфологических признаков, так и ПЦР-профилей ферментных локусов позволяет предположить, что в основе всех этих изменений лежат одни и те же процессы на уровне организации хромосом. Наследование вызванных ТХ-100 морфологических и морфофизиологических изменений в течение шести поколений позволяет заключить, что ядерная мембрана принимает участие в передаче наследственной информации и несет на себе участки, состояние которых воспроизводится при клеточных делениях, что является основой для передачи индуцированных изменений как в клеточных, так и в половых поколениях.

С практической точки зрения высокая частота индуцируемых эпигенетических изменений является важной. Если обычные мутационные события происходят с частотой порядка 10^{-6}–10^{-5}, то эпигенетические изменения происходят с частотой нескольких процентов. Высокая частота изменений и их стабильность в ряду последующих поколений являются основой получения наследуемых изменений у растений, которые могут представлять собой исходный материал как для фундаментальных исследований, так и для селекции.

Работа частично финансировалась грантом № 99 по интеграционному проекту СО РАН 2009–2011 гг.

Литература

Авторское свидетельство 2322801. Способ индукции эпигенетической изменчивости у мягкой пшеницы / К.Х. Махмудова, Е.Д. Богданова, Е.В. Левитес. Опубл. в Бюл. 2008. № 12.

Богданова Е.Д. Генетическая изменчивость пшеницы, индуцированная никотиновой кислотой и ее производными: Дис. … д-ра биол. наук. Новосибирск: Ин-т цитологии и генетики СО РАН, 1992. 331 с.

Богданова Е.Д. Эпигенетическая изменчивость, индуцированная никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. 2003. Т. 39. № 9. С. 1221–1227.

Богданова Е.Д., Левитес Е.В., Махмудова К.Х. Маркерные признаки изменчивости, индуцированной никотиновой кислотой у *Triticum aestivum* L. // Генетика. 2009. Т. 45. № 3. С. 354–359.

Груздев А.Д., Кикнадзе И.И. О связи политенных хромосом с мембраной ядра // Цитология. 1970. Т. 12. № 7. С. 919.

Кирикович С.С., Левитес Е.В. Морфологические и физиологические изменения у *Beta vulgaris* L. под действием Тритона Х-100 // Экологическое равновесие и устойчивое развитие территории: Сб. науч. тр. СПб: ЛГУ им. А.С. Пушкина, 2010. С. 268–272.

Лакин Г.Ф. Биометрия: учебное пособие для вузов. М.: Высш. шк., 1973. 342 с.

Левитес Е.В., Кирикович С.С. Наследуемый эффект воздействия Тритона Х-100 на экспрессию локуса *Gpi2* у сахарной свеклы // Фактори експериментальної еволюції організмів: Збірник наукових праць. Київ: Логос, 2010. С. 50–54.

Махмудова К.Х. Наследование эпигенетических изменений у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.): Дис. … канд. биол. наук. Алматы, 2007. 103 с.

Махмудова К.Х., Богданова Е.Д., Левитес Е.В. Индукция тритоном Х-100 наследуемых изменений морфологических признаков у *Triticum aestivum* L. // Генетика. 2009. Т. 45. № 4. С. 564–568.

Мосолов А.Н. Новый подход к решению проблемы пространственного расположения хромосом в интерфазном ядре (полярная модель интерфазного ядра) // Цитология. 1972. Т. 14. № 5. С. 542–552.

Павлова О.С. Исходный материал для селекции яровой мягкой пшеницы на продуктивность в условиях Центрального Нечерноземья: Дис. ... канд. с.-х. наук. Рязань, 2010. 196 с.

Стегний В.Н. Архитектоника генома, системные мутации и эволюция. Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. 111 с.

Bourgeois C.A., Hubert J. Spatial relationship between the nucleolus and the nuclear envelope: structural aspect and functional significance // Int. Rev. Cytol. 1988. V. 111. P. 1.

Comings D.E., Kakefuda T.J. Initiation of DNA replication at the nuclear membrane in human cells // J. Mol. Biol. 1968. V. 33. P. 225.

Durrant A. The environmental induction of heritable changes in Linum // Heredity. 1962. V. 17. N 1. P. 27–61.

Durrant A., Timmis J.N. Genetic control of environmentally induced changes in *Linum* // Heredity. 1973. V. 30. No 3. P. 369–379.

Jones P.A. Altering gene expression with 5-azacytidine // Cell. 1985. V. 40. P. 485–486.

Janousek B., Siroky J., Vyskot B. Epigenetic control of sexual phenotype in dioecious plant, *Melandrium album* // Mol. Gen. Genet. 1996. V. 250. P. 483–490.

Kimoto Y. An attachment of the salivary gland chromosomes to the nuclear membrane found in *Chironomus dorsalis* // Cytologia. 1958. V. 23. P. 478.

Kirikovich S.S., Levites E.V. Effect of epimutagene Triton X-100 on morphological traits in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) // Sugar Tech. 2009. V. 11. No 3. P. 307–310.

Levites E.V. Sugar beet plants produced by agamospermy as a model for studying genome structure and function in higher plants // Sugar Tech. 2005. V. 7. No 2/3. P. 67–70.

Makhmudova K.Kh., Vinichenko N.A., Bogdanova E.D. *et al.* Changes in the organization of isozyme loci *Me1* and *Adh1* induced with Triton X-100 in common wheat lines // Adv. Biosci. Biotechnol. 2011. V. 2. No 3. P. 128–131.

Taddei A., Hediger F., Neumann F.R., Gasser, S.M. The function of nuclear architecture: a genetic approach // Annu. Rev. Genet. 2004. V. 38. P. 305–345.

ESTIMATION OF THE STABILITY OF TRAITS INDUCED BY TRITON X-100 IN COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

K.Kh. Makhmudova[1], E.D. Bogdanova[1], S.S. Kirikovich[2], E.V. Levites[2]

[1] Institute of Plant Biology and Biotechnology, Ministry of Education and Science, Almaty, Kazakhstan, e-mail: carinamakh@mail.ru;
[2] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: levites@bionet.nsc.ru

Summary

Studies of several generations of common wheat lines carrying changes induced by nonionic detergent Triton X-100 (TX-100) are reported. It is shown that the induced changes recorded in the first generations are also observed in the fourth, fifth and sixth generations.

Key words: common wheat; induction; Triton X-100; breeding; variability; inheritance of changes.

УДК 633.1:575.116:575.26

ГЕНЫ, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИЕ ОКРАСКУ РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНОВ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. **Е.К. Хлесткина**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 21 октября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Окраска некоторых органов пшеницы имеет адаптивное значение. Признаки окраски широко используются в таксономии и для паспортизации сортов пшеницы, а также являются удобной моделью для генетических и молекулярно-генетических исследований. В обзоре представлены данные по хромосомной локализации, генетическому картированию и структурно-функциональной организации всех известных генов, определяющих окраску у пшеницы. К настоящему времени определена локализация около 30 генов пшеницы, детерминирующих окраску различных органов. Данные гены представлены главным образом гомеологичными локусами в геномах A, B и D, большинство из которых расположены в ген-богатых районах 1S0.8 и 7S0.4 генома пшеницы. Сравнительное картирование у разных видов злаков указывает на то, что ортологичные гены, контролирующие окраску, могут как встречаться у отдельных представителей (гомеологичный ряд генов *Rg* выявлен только у пшениц и эгилопсов, *R* – у пшениц, эгилопсов и ржи), так и быть широко представленными во всем семействе злаков (гены, определяющие фенотип по признакам антоциановой окраски). Данные по сравнительному картированию в сочетании с результатами последних работ, направленных на клонирование и исследование функции генов, детерминирующих окраску органов пшеницы, дают основание считать, что эти гены относятся к семействам Myb- и Myc-подобных генов, кодирующих активаторы транскрипции структурных генов биосинтеза флавоноидных пигментов у растений.

Ключевые слова: пшеница, морфологические признаки, окраска, хромосомная локализация генов, молекулярно-генетическое картирование.

Введение

У пшеницы окрашенными могут быть зерно, колосковые чешуи, колеоптиле, стебель, лист, ушки листового влагалища, пыльники (рис. 1). Различные аллели в локусах, определяющих признаки окраски, дают легко различимые фенотипы, поэтому признаки окраски широко используются для таксономической классификации (например, признак окраски колоса используется для определения подвидов пшеницы) и паспортизации сортов (окраска колеоптиле и ушек листового влагалища).

Окраска некоторых органов пшеницы имеет адаптивное значение. Еще Ч. Дарвин, ссылаясь на «Gardener's Chronicle», сообщал о многочисленных наблюдениях относительно большей жизнеспособности в районах с холодным климатом красноколосой пшеницы по сравнению с белоколосой (Darwin, 1883). Позже Е.Н. Синская (1925) в своей работе «О полевых культурах Алтая» отмечала, что в данном регионе основной фон составляет остистая красноколосая пшеница – var. *ferrugineum*. При этом попытки местных земледельцев распространить другую разновидность – белоколосую var. *lutescence* – затруднены, так как *lutescence* сильнее страдает от заморозков и быстро вытесняется более приспособленной к местным условиям красноколосой пшеницей. В руководстве по апробации сельскохозяйственных культур (Якубцинер, Савицкий, 1947) отмечается, что в СССР красноколосые сорта мягкой пшеницы тяготеют к северу и более возвышенным зонам, а в Сибири в яровых посевах имеют распространение или продвигаются сорта, которые имеют чешую

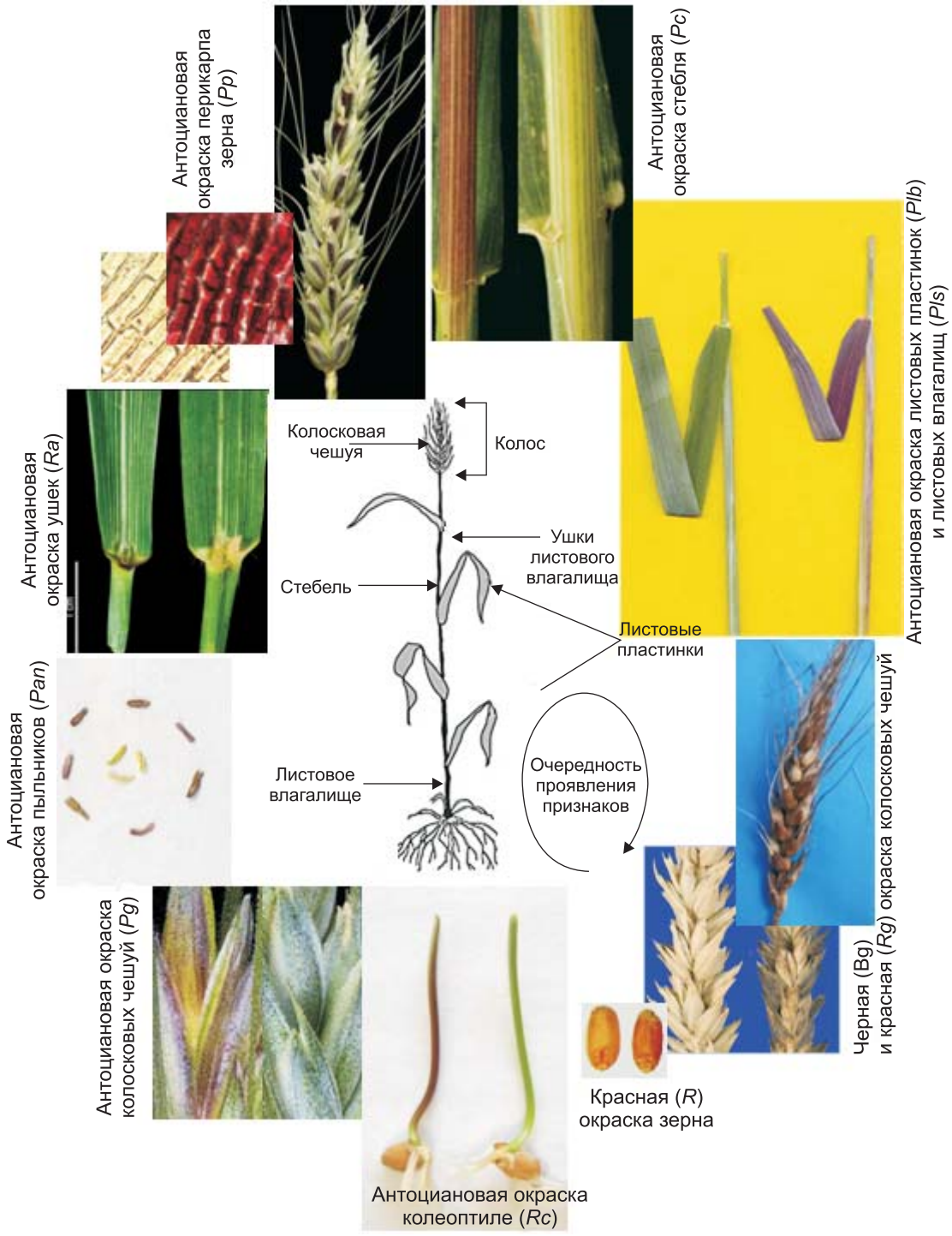


Рис. 1. Признаки окраски у пшеницы.

серо-дымчатой окраски. Позднее Мартынов и Добротворская (1997), изучив распространение морфологических признаков колоса мягкой пшеницы на территории бывшего СССР, сделали вывод о том, что в регионах с недостаточной теплообеспеченностью вегетационного периода частота аллелей, определяющих красную окраску колоса, значительно повышается по сравнению с другими регионами.

Известно свойство высокой устойчивости краснозерных сортов пшеницы к прорастанию на корню (Freed *et al.*, 1976). О селективном

преимуществе краснозерных сортов пшеницы в районах с повышенной влажностью свидетельствуют результаты исследований частот встречаемости доминантных аллелей в локусах, детерминирующих красную окраску зерна (Пухальский, 1984), и соотношения краснозерных и белозерных сортов в регионах, контрастных по количеству осадков, на территории бывшего СССР (Мартынов, Добротворская, 1997). Также отмечалось, что растения мягкой пшеницы, имеющие интенсивную фиолетовую окраску колеоптиле, стебля и пыльников, проявляют устойчивость к твердой и пыльной головне (Богданова и др., 2002).

Интерес к признакам окраски обусловлен еще и тем, что они представляют удобную модель для генетических и молекулярно-генетических исследований. Самые первые работы по генетике пшеницы были посвящены окраске колоса и зерна (Tschermak, 1901; Spillman, 1902; Biffen, 1905; Nilsson-Ehle, 1909, 1914; Howard A., Howard G., 1912, 1915). Изучение данных признаков позволило впервые описать явление полимерии (Nilsson-Ehle, 1909, 1914). С участием генов, детерминирующих окраску, проводились построение первых генетических карт мягкой пшеницы (Law, Wolfe, 1966) и создание коллекций изогенных линий твердой (Watanabe, 1994) и мягкой пшеницы (Коваль, 1997; Arbuzova *et al*., 1998). В последние годы система генов, детерминирующих окраску, используется в качестве модели для изучения механизмов согласованной работы гомеологичных генов при формировании признаков мягкой пшеницы, и особенностей экспрессии гомеологичных генов злаков различного происхождения в геноме пшеницы (Khlestkina *et al*., 2008b, 2009e; Khlestkina, 2010).

Гены, определяющие красную окраску зерна пшеницы. Первые работы по исследованию генетических основ признака красной окраски зерна пшеницы восходят к началу XX в. Р. Биффен наблюдал моногенный доминантный характер наследования окраски зерна (Biffen, 1905). В 1914 г. Г. Нильссон-Эле впервые сообщил о наличии трех независимых доминантных генов, определяющих красную окраску зерна у пшеницы (Nilsson-Ehle, 1914), показав при этом увеличение периода покоя семян пшеницы в зависимости от дозы гена, контролирующего данный признак.

Вплоть до середины XX в. велись обширные работы по изучению наследования красной окраски зерна с помощью классического генетического анализа. Выявлялись сорта с доминантными аллелями в 1, 2 или 3 локусах, определяющих окраску (Ausemus, 1946). Получение анеуплоидных линий пшеницы Эрни Сирсом и развитие метода моносомного анализа позволили установить хромосомную локализацию данных генов. Так, было установлено, что краснозерный сорт мягкой пшеницы Chinese Spring несет один ген (*R1* – red grain), определяющий данный признак, который локализуется в хромосоме 3D (Sears, 1954). Затем, помимо гена *R1*, были локализованы и два других гена – *R2* в хромосоме 3A и *R3* в хромосоме 3B (Allan, Vogel, 1965; Metzger, Silbaugh, 1970).

Создание RFLP (restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов) карт пшеницы позволило картировать гены *R* в дистальных районах длинных плеч хромосом 3 гомеологической группы вблизи RFLP-локуса *Xbcd131* (Gale *et al*., 1995; Flintham, Gale, 1995). Одинаковое расположение генов *R* на хромосомах 3A, 3B и 3D позволило отнести их к одной гомеологической группе генов, в связи с чем им были присвоены новые названия *R-A1* (бывший *R2*), *R-B1* (*R3*) и *R-D1* (*R1*) согласно правилам обозначения гомеологичных генов пшеницы (McIntosh *et al*., 1998). У тетраплоидной пшеницы проведены детальное физическое картирование гена *R-A1* (Kuraparthy *et al*., 2008) и микросателлитное картирование гена *R-B1* (Nalam *et al*., 2006). У синтетической аллогексаплоидной пшеницы с помощью микросателлитных маркеров картирован ген *R-D1*, унаследованный от *Aegilops tauschii* (Li *et al*., 2010). Гены *R* располагаются в ген-богатом районе генома пшеницы 3L0.9, который содержит в том числе гены, контролирующие устойчивость к бурой (*Lr24* в хромосоме 3D) и стеблевой (*Sr24*–3D, *Sr35*–3A) ржавчине (McIntosh *et al*., 2008; Erayaman *et al*., 2004). Ген, определяющий красную окраску зерна ржи (*R-R1*), гомеологичный генам *R-1* пшеницы, локализован в хромосоме 6R (Miller, 1984). Гены, контролирующие похожий признак у других видов злаков, например гены *Re2*/*Pre2* ячменя и ген *P* кукурузы, локализованы в негомеологичной позиции (Lundqvist *et al*., 1996; Davis *et al*., 1999).

Параллельно с генетическими исследованиями проводился и биохимический анализ пигментов зерна пшеницы. На основании позитивной корреляции между интенсивностью красной (красно-коричневой) окраски зерна и количеством флавоноидных соединений катехина и катехинтанина в незрелом зерне было установлено, что основным пигментом, окрашивающим оболочку зерна пшеницы, является красно-коричневый флавоноидный пигмент, производный катехинов (Miyamoto, Everson, 1958). Авторы предположили, что данный пигмент может относиться к флобафенам. Однако в настоящее время известно, что флобафен является производным флаван-4-олов, а не флаван-3-олов (катехинов; Winkel-Shirley, 2001, 2002), обнаруженных в оболочке зерна (Miyamoto, Everson, 1958). Поэтому можно предположить, что оболочка зерна окрашена не флобафенами, а проантоцианидинами, производными катехинов, которые наряду с флобафенами являются красно-коричневыми пигментами.

Развитие методов структурно-функциональной геномики позволило выйти в последние годы на новый уровень изучения генов, определяющих красную окраску зерна. Так, при использовании изогенных линий по окраске зерна (Коваль и др., 1997) было установлено, что гены *R* кодируют Myb-подобные факторы транскрипции, регулирующие экспрессию генов биосинтеза флавоноидов *Chs*, *Chi*, *F3h* и *Dfr* (Himi *et al*., 2005, 2011; Himi, Noda, 2005); описаны структурные изменения генов *R*, определяющие их рецессивное состояние. Тот факт, что ген *R* регулирует транскрипцию гена *F3h*, участие которого в биосинтезе флобафенов не требуется, но является необходимым для получения проантоцианидинов (Winkel-Shirley, 2001, 2002), еще раз указывает на то, что красная окраска зерна пшеницы обусловлена накоплением проантоцианидинов, а не флобафенов.

Гены, определяющие окраску колоса и остей пшеницы. Еще до переоткрытия законов Менделя Г. де Вильморен и В. Римпау описали результаты скрещивания белоколосых пшениц с красноколосыми (Zeven, 1983). Вывод о моногенном доминантном характере наследования красной окраски колоса впервые сделал Э. Чермак (Tschermak, 1901), затем Р. Биффен (Biffen, 1905). Впоследствии ряд исследователей также наблюдали моногибридный характер расщепления по данному признаку при скрещивании многих красноколосых сортов мягкой пшеницы с белоколосыми (Филипченко, 1934; Вавилов, 1935; Ausemus *et al*., 1946). Вместе с тем Нильссон-Эле (Nilsson-Ehle, 1909) наряду с расщеплением 3 : 1 обнаружил при скрещивании некоторых красноколосых сортов с белоколосыми расщепление 15 : 1 с различными градациями красной окраски. Аналогичное явление, впервые установленное Нильссоном-Эле для красной окраски зерна и заключающееся в контролировании признака двумя независимыми и однозначными по своему действию генами, позднее получило название полимерии. После Нильссона-Эле наличие в геноме мягкой пшеницы доминантных аллелей в двух локусах, определяющих красную окраску колоса, обнаружили и другие исследователи (Howard A., Howard G., 1912; Kiessling, 1914; Malinowski, 1914). У сортов твердой пшеницы выявлялся моногенный (Howard A., Howard G., 1912; Kiessling, 1914) или дигенный (Malinowski, 1914) характер наследования красной окраски колоса.

Параллельно с изучением наследования красной окраски колоса проводилось исследование генетических основ признака черной окраски колоса, имеющего моногенный характер наследования (Biffen, 1905; Engledow, 1914; Kezer, Boyack, 1918; Percival, 1921) и тесно сцепленного с признаком опушения колосковых чешуй у твердой (Engledow, 1914; Kezer, Boyack, 1918; Kadam, 1936) и мягкой (Sikka *et al*., 1961; Панин, Нецветаев, 1986) пшеницы. В отдельных случаях наблюдалась рекомбинация между локусами, детерминирующими черную окраску и опушение колосковых чешуй (у тетраплоидной пшеницы – 2,4 %; Ваценко, 1934; у диплоидной – 6,1 %; Kuspira *et al*., 1989).

Развитие методов анеуплоидного генетического анализа позволило локализовать ген, определяющий опушение колоса (*Hg* – hairy glume), а вместе с ним и тесно сцепленный ген, определяющий черную окраску колоса (*Bg* – black glume), в хромосоме 1A мягкой пшеницы (Burnham, 1962; Law, Chapman, 1974). Первый ген, определяющий красную окраску колоса (*Rg1*), был локализован в хромосоме 1B мягкой пшеницы (Unrau, 1950; Metzger, Silbaugh, 1970; Алиев, Мусаев, 1981; Efremova *et al*., 1998) в

плече 1BS (Fletcher, McIntosh, 1974). Второй ген (*Rg2*) был локализован в хромосоме 1D (Kerber, Dyck, 1969; Rowland, Kerber, 1974) в плече 1DS (Jones *et al*., 1990) у искусственных аллогексаплоидов, созданных на основе тетраплоидной пшеницы и *Ae. tauschii* (красная окраска наследовалась от *Ae. tauschii*). Третий ген (*Rg3*) был выявлен в коротком плече хромосомы 1AS (Елохина, 1990; Собко, Созинов, 1993; Efremova *et al*., 1998). С помощью моносомного анализа был локализован ген, определяющий серо-дымчатую окраску колоса в хромосоме 1DS (Пшеничникова и др., 2005).

Развитие методов молекулярно-генетического картирования позволило установить более точную внутрихромосомную локализацию генов *Bg* у *Triticum monococcum* (van Deynze *et al*., 1995), *T. timopheevii* (Salina *et al*., 2006) и *T. aestivum* (Хлесткина и др., 2000; Khlestkina *et al*., 2006, 2009d); *Rg1* у *T. durum* (Blanco *et al*., 1998) и *T. aestivum* (Хлесткина и др., 2000; Khlestkina *et al*., 2006, 2009d); *Rg2* у *T. aestivum* (Arzani *et al*., 2004; Khlestkina *et al*., 2006, 2009c); *Rg3* у *T. aestivum* (Khlestkina *et al*., 2006) и гена, детерминирующего серо-дымчатую окраску колоса у *T. aestivum* (Khlestkina *et al*., 2006). Наличие общих маркеров в хромосоме 1A позволило провести сравнение результатов картирования гена *Bg* у разных видов пшеницы (рис. 2). Видно, что порядок генов/маркеров одинаков у гексаплоидной, тетраплоидной и диплоидной пшениц, хотя расстояние между генами/маркерами варьирует, являясь наименьшим (1,5 сМ) между *Bg* и *Xgwm0136* у *T. aestivum* и наибольшим (12,5 сМ) у *T. durum* (рис. 2).

Гены, определяющие черную, красную и серо-дымчатую окраску колосковых чешуй, были картированы в гомеологичных позициях в дистальных районах хромосом 1AS, 1BS и 1DS мягкой пшеницы. Доказано, что *Rg3* и *Bg* являются разными аллелями одного и того же локуса. Согласно правилам обозначения генов пшеницы, данный локус получил наименование *Rg-A1* с обозначением *Rg-A1a* аллеля, определяющего отсутствие окраски, *Rg-A1b* вместо *Rg3* и *Rg-A1c* вместо *Bg*. Также показано, что ген *Rg2* и ген, определяющий серо-дымчатую окраску колоса, картированные в хромосоме 1D, являются аллельными (обозначены *Rg-D1b* и *Rg-D1c* соответственно). Гомеологичный ген в хромосоме 1B (*Rg1*) был обозначен *Rg-B1* (Khlestkina *et al*., 2006, 2009c, d).

Гены, определяющие окраску колосковых чешуй, гомеологичные генам *Rg* мягкой пшеницы, изученным в настоящей работе, выявлены только у пшениц (van Deynze *et al*., 1995; Korzun *et al*., 1999; Khlestkina *et al*., 2006, 2009b; Salina *et al*., 2006d) и эгилопсов (Arzani *et al*., 2004; Khlestkina *et al*., 2006, 2009c). Гены, контролирующие похожий признак у других видов злаков (*B*/*Blp* и *Re2*/*Pre2* ячменя, *P* кукурузы), локализованы в негомеологичной позиции (Ahn *et al*., 1993; Lundqvist *et al*., 1996; Davis *et al*., 1999).

Сравнительный анализ транскрипции структурных генов биосинтеза флавоноидных пигментов в колосковых чешуях изогенных линий, отличающихся аллельным состоянием локусов *Rg-A1* и *Rg-D1*, выявил участие генов *Rg* в активации транскрипции генов биосинтеза флавоноидных пигментов флобафенов и/или 3-дезоксиантоцианидинов в колосковых чешуях (Khlestkina, 2010).

В отличие от окраски колоса окраска остей пшеницы остается мало изученной с генети-

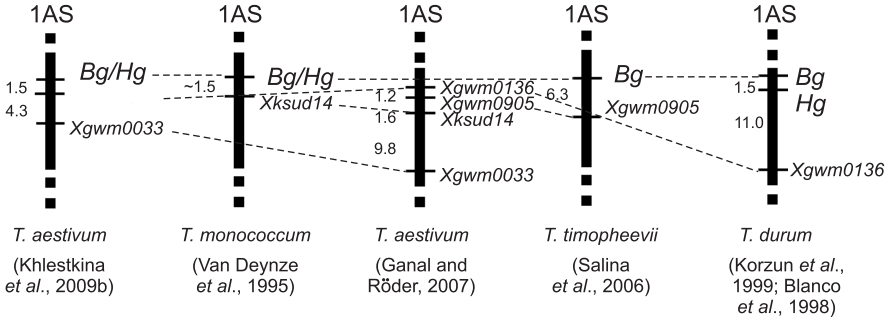


Рис. 2. Локализация генов, определяющих черную окраску (*Bg*) и опушение (*Hg*) колоса, на генетических картах хромосомы 1A диплоидной, тетраплоидных и гексаплоидной пшеницы.

ческой точки зрения, хотя считается, что эти признаки связаны между собой. Действительно, у остистых форм пшеницы с окрашенным колосом нередко наблюдается и окраска остей (McIntosh *et al*., 2008). В противоположность более ранним сообщениям о моногенном доминантном характере наследования окраски остей у твердой и мягкой пшениц (Ausemus, 1946) В. Панин и В. Нецветаев (1986) наблюдали присутствие у пшеницы трех комплементарных генов, определяющих черную окраску остей (*Bla1*, *Bla2* и *Bla3*), один из которых (*Bla1* – black awn) им удалось локализовать в хромосоме 1AS. Позже на молекулярно-генетической карте мягкой пшеницы (Röder *et al*., 1998) вблизи локусов *Gli-1* были выявлены 3 QTL-локуса *Raw* (red awn), определяющих красную окраску остей (*QRaw.ipk-1A*, *QRaw.ipk-1B* и *QRaw.ipk-1D*; Börner *et al*., 2002). Однако с помощью той же самой картирующей популяции был выявлен только один локус, определяющий красную окраску колоса (по локализации совпадающий с *QRaw.ipk-1D*), а не три локуса, как следовало бы ожидать в случае плейотропного влияния одного и того же гена на окраску и колоса, и остей (Börner *et al*., 2002).

Локусы *Rg* и *Raw* (Börner *et al*., 2002; Khlestkina *et al*., 2006) располагаются в ген-богатом районе генома пшеницы 1S0.8, который, как известно, содержит наибольшее число фенотипических маркеров (32) по сравнению с остальными 47 ген-богатыми районами пшеницы (Erayman *et al*., 2004). Из этих фенотипических маркеров наиболее близко к генам *Rg* и *Raw* расположены гены, контролирующие устойчивость к бурой ржавчине (*Lr10*) и мучнистой росе (*Pm3*) (хромосома 1AS), к желтой ржавчине (*Yr10* и *Yr15*; 1BS), к бурой (*Lr21*) и желтой (*Yr10b*) ржавчине (хромосома1DS; Erayaman *et al*., 2004; McIntosh *et al*., 2008). Кроме того, ген *Rg-A1* является тесносцепленным с геном *Hg*, контролирующим опушение колосковых чешуй (Khlestkina *et al*., 2006), и все локусы *Rg-1* тесно сцеплены с локусами *Gli-1*, кодирующими запасные белки зерна глиадины (Leisle *et al*., 1985; Панин, Нецветаев, 1986; Payne *et al*., 1986; Собко, Созинов, 1993, 1997; Кудрявцев, Попова, 1994; Pshenichnikova, Maystrenko, 1995; Пшеничникова и др., 2005).

Гены, определяющие антоциановую окраску различных органов пшеницы. Впервые характер наследования антоциановой (красной) окраски колеоптиле был изучен Гоулденом с соавторами (Goulden *et al*., 1928), установившими роль двух факторов, определяющих развитие данного признака у сорта Н-44 мягкой пшеницы. Впоследствии выявлялись как моногенный (Ausemus *et al*., 1946; Zeven, 1973), так и дигенный (Quisenberry, 1931; Churchward, 1938; Sutka, 1977) характер наследования, отмечалось неполное доминирование окраски (Jha, 1964; Sutka, 1977) и сообщалось о сцеплении окраски колеоптиле с устойчивостью к стеблевой и бурой ржавчине (Goulden *et al*., 1928; Wu, Ausemus, 1930), с признаком «удлиненный колос» (Matsumura, 1950).

Э. Сирс (Sears, 1954) с помощью созданных им анеуплоидных линий пшеницы показал, что в хромосоме 7A сорта Hope локализован ген, определяющий красную окраску колеоптиле. Впоследствии с помощью биохимического анализа замещенных линий Chinese Spring (Hope) было установлено участие хромосом 7A и 7B сорта Hope в контроле антоциановой пигментации колеоптиле (Gale, Flavell, 1971). Гены, локализованные в хромосомах 7A и 7B, получили обозначение *Rc1* и *Rc2* (red coleoptile) соответственно. На основе анеуплоидного генетического анализа, проведенного при использовании синтетической гексаплоидной пшеницы, удалось доказать существование в хромосоме 7D третьего гена *Rc* (*Rc3*), ответственного за формирование данного признака, унаследованного от диплоидного предка D-генома *Ae. tauschii* (Jha, 1964). С помощью телоцентрических линий *Rc3* был картирован в хромосоме 7DS на расстоянии около 10 рекомбинационных единиц от центромеры (Rowland, Kerber, 1974). Гены-супрессоры антоциановой пигментации выявлены в хромосомах 2A, 2B, 2D, 3B и 6A *T. spelta* (Tahir, Tsunewaki, 1969) и 2A, 2B, 2D, 4B и 6A *T. aestivum* (Sutka, 1977).

В популяциях, используемых для картирования RFLP-маркеров мягкой пшеницы (Chao *et al*., 1989; Nelson *et al*., 1995), обнаружилось расщепление среди прочих признаков и по окраске колеоптиле. В результате С. Чао с соавт. картировали ген *Rc3* на расстоянии 3сМ от RFLP-маркера *Xpsr108* в хромосоме 7DS мягкой пшеницы (Chao *et al*., 1989), а Дж. Нельсон с соавторами, используя QTL-анализ, локализовали

ген *Rc1* в районе RFLP-маркера *Xcdo17* в хромосоме 7AS (Nelson *et al*., 1995). Ген *Rc2* оставался некартированным, пока не было осуществлено сравнительное картирование всех трех генов *Rc1*, *Rc2* и *Rc3* с помощью SSR-маркеров (Khlestkina *et al*., 2002a, b). В результате было установлено, что данные гены локализуются в прицентромерных районах хромосом 7AS, 7BS и 7DS на почти одинаковом расстоянии (около 15–21 сМ) от центромеры. Таким образом, было показано, что *Rc1*, *Rc2* и *Rc3* являются гомеоаллельными локусами, в связи с чем им были присвоены новые обозначения *Rc-A1*, *Rc-B1* и *Rc-D1* соответственно (Khlestkina *et al*., 2002a, b). QTL-локусы, определяющие красную окраску колеоптиле, были выявлены в хромосомах 7AS, 7DS и 4BL (Khlestkina *et al*., 2002a) при использовании популяции ITMI (Röder *et al*., 1998). Локус в хромосоме 4BL совпадает по локализации с геном, ингибирующим окраску колеоптиле, описанным ранее (Sutka *et al*., 1977). У диплоидной пшеницы ген *Rc-A1* был картирован в хромосоме 7AS (Singh *et al*., 2007). У эгилопсов секции Sitopsis окраска колеоптиле контролируется хромосомой 7S (Friebe *et al*., 1993, 1995, 2000; Khlestkina *et al*., 2009b), у ржи – хромосомой 4R (Zeller, Koller, 1981; Miller, 1984; Khlestkina *et al*., 2009e) и локализуется в участке длинного плеча 4RL (Khlestkina *et al*., 2009e), соответствующего короткому плечу хромосомы 7 остальных видов *Triticeae* (Devos *et al*., 1993) (табл. 1).

В первых работах, направленных на изучение наследования окраски колеоптиле, сообщалось о тесном сцеплении данного признака с окраской стебля (Clark, 1924; Worzella, 1937, 1942; Chin, 1944a), пыльников (Chin, 1944b) и перикарпа зерна (Шрайбер, 1931), тогда как с окраской ушек листового влагалища сцепления не наблюдалось. Позже выяснилось, что гены, определяющие красную окраску ушек, локализованы в других гомеологичных группах: *Ra* (red auricle) в хромосоме 1D (Гуляева, 1984); *Ra2* – в 4B и *Ra3* – в 6B (Melz, Thiele, 1990), тогда как гены, детерминирующие окраску стебля, пыльников и перикарпа, относятся, как и гены *Rc*, к 7-й гомеологической группе хромосом. Так, ген, определяющий антоциановую окраску стебля (*Pc1* – purple culm), был локализован в хромосоме 7B сорта Hope (Kuspira, Unrau, 1958). Позже *Pc1* был картирован в коротком плече данной хромосомы на расстоянии 31 рекомбинационная единица от центромеры (Law, Wolfe, 1966). Локализация другого гена, определяющего окраску колоса (*Pc2*), была определена в хромосоме 7D (Майстренко, 1992; Maystrenko, Laikova, 1995; Лайкова и др., 2005) у ряда сортов и линий, у которых окраска стебля была сцеплена с антоциановой пигментацией пыльников (purple anther – ген *Pan1*). Возможность плейотропного влияния одного и того же гена на окраску и пыльников и стебля была отвергнута, так как в потомстве F_2, полученном от скрещивания окрашенных сортов с неокрашенными, наблюдались рекомбинантные генотипы *Pc2Pc2/pan1pan1* и *pc2pc2/Pan1Pan1* (Майстренко, 1992). С помощью моносомного анализа в хромосоме 7B был локализован один из двух комплементарных генов (*Pp1* – purple pericarp), детерминирующих пурпурную окраску перикарпа (Piech, Evans, 1979; Arbuzova *et al*., 1998). Локализация второго комплементарного гена (о возможном наличии двух доминантных генов *Pp* с комплементарным взаимодействием первыми сообщали McIntosh, Backer (1967); Bolton (1970) оставалась спорной (в хромосоме 6A – *Pp2* и 2A – *Pp3* (Arbuzova *et al*., 1998), до тех пор пока не было установлено, что гены *Pp2* и *Pp3* являются разными аллелями одного и того же локуса (*Pp3*) в хромосоме 2A (Dobrovolskaya *et al*., 2006).

Использование RFLP-маркеров позволило картировать ген *Pc1* в хромосоме 7BS у мягкой (Chao *et al*., 1989) и твердой (Blanco *et al*., 1998) пшениц, а также новый ген *Pan2* в хромосоме 7AS твердой пшеницы (Blanco *et al*., 1998). В пользу существования локуса *Pc* в хромосоме 7A свидетельствовало выявление в данной хромосоме QTL-локуса, контролирующего окраску стебля (Lohwasser *et al*., 2004).

С помощью микросателлитных маркеров проведено сравнительное картирование трех генов *Pc*, гена *Pan1*, генов *Rc-1* и ряда новых локусов, детерминирующих антоциановую пигментацию листовых пластинок (*Plb* – purple leaf blade), листовых влагалищ (*Pls* – purple leaf blade), перикарпа зерна и колосковых чешуй (*Pg* – purple glume) (Khlestkina *et al*., 2009b, 2010a, b; Tereshchenko *et al*., 2012b). При этом характер наследования признаков антоциановой окраски листовых пластинок, листовых влагалищ и

колосковых чешуй был изучен впервые. Фенотипический анализ F_2 популяции тетраплоидной пшеницы *T. durum* показал, что данный признак контролируется одним доминантным геном, обозначенным *Pg*, а картирование позволило выявить локализацию данного гена в хромосоме 2A в тесном сцеплении с геном *Pp3* (Khlestkina *et al*., 2010a). На основе схожей функции и хромосомной локализации предполагаемыми ортологами генов *Pp3* и *Pg* могут являться гены, кодирующие Myc-подобные гены-регуляторы биосинтеза антоцианов риса (*Pb*/*Ra*) и кукурузы (*Lc*/*R*) (Dooner, Kermicle, 1976; Ludwig *et al*., 1989; Hu *et al*., 1996; Wang, Shu, 2007). У ржи и ячменя антоциановую окраску зерна контролируют хромосомы 2R и 2H (de Vries, Sybenga, 1984), что согласуется с локализацией гена *Pp3* в хромосоме 2A мягкой пшеницы (Dobrovolskaya *et al*., 2006; Khlestkina *et al*., 2010a) (табл. 2).

Фенотипический анализ нескольких F_2 популяций мягкой и твердой пшениц показал, что признаки антоциановой окраски листовых пластинок и листовых влагалищ наследуются моногенно с доминированием окрашенных форм. Микросателлитное картирование позволило локализовать гены, определяющие антоциановую окраску листовых пластинок (*Plb-1*), листовых влагалищ (*Pls-1*), колеоптиле (*Rc-1*) и стебля (*Pc-1*), в коротком плече каждой из хромосом 7-й гомеологической группы (Khlestkina *et al*., 2008a, 2009b, 2010a, b). В некоторых популяциях между данными признаками окраски рекомбинация не наблюдалась. В хромосоме 7B твердой пшеницы вместе с кластером генов *Pls-B1*, *Plb-B1*, *Pc-B1* и *Rc-B1* колокализовался один из двух комплементарных доминантных генов, определяющих антоциановую окраску перикарпа зерна, обозначенный *Pp-B1* (Khlestkina *et al*., 2010a).

В хромосоме 7D мягкой пшеницы вместе с кластером генов *Pls-D1*, *Plb-D1*, *Pc-D1* и *Rc-D1* также колокализовался один из двух комплементарных доминантных генов, определяющих антоциановую окраску перикарпа зерна, обозначенный *Pp-D1*, и ген, определяющий окраску пыльников, *Pan1* (*Pan-D1*) (Khlestkina *et al*., 2009b; Tereshchenko *et al*., 2012b). Отметим, что донорами функциональных аллелей одного из двух комплементарных генов *Pp3* или *Pp-1* могут являться виды злаков, для которых пурпурная окраска перикарпа зерна нехарактерна (*T. timopheevii* и *Ae. speltoides* соответственно) (Tereshchenko *et al*., 2012a). Необходимость одновременного присутствия функциональных аллелей двух комплементарных генов из разных геномов (A и B или A и D) объясняет тот факт, что формы с пурпурной окраской перикарпа зерна выявляются лишь среди аллополиплоидных видов *T. durum* и *T. aestivum* (Zeven, 1991; Arbuzova *et al*., 1998; Tereshchenko *et al*., 2012a, b).

Кластеры генов, определяющих антоциановую окраску колеоптиле, стебля, пыльников, листовых пластинок и листовых влагалищ, располагаются в хромосомах 7A, 7B и 7D в гомеологичных позициях относительно друг друга (Khlestkina *et al*., 2009b, 2010a, b; Tereshchenko *et al*., 2012b). Данные гены колокализуются с гомологами генов *C1*/*Pl*, кодирующих Myb-подобные регуляторные факторы биосинтеза антоцианов у кукурузы, выявленными ранее у пшеницы с помощью блот-гибридизации (Li *et al*., 1999; Khlestkina *et al*., 2008a). Гены *Pc-1*, *Pan-1*, *Plb-1*, *Pls-1*, *Rc-1* и *Pp1-1* могли произойти в результате дупликации гена-гомолога *C1*/*Pl*, расположенного в коротком плече хромосомы 7 диплоидного предка группы видов *Triticum-Aegilops*, вследствие неравного кроссинговера и последующей тканевой специализации образовавшихся копий. Сравнительное изучение влияния доминантных и рецессивных аллелей в локусах *Rc-A1*, *Rc-B1* и *Rc-D1* на транскрипционную активность структурных генов биосинтеза антоцианов в колеоптиле пшеницы (Khlestkina *et al*., 2008b, 2009e, 2010b) подтвердило регуляторную роль генов *Rc* в биосинтезе антоцианов. С помощью анализа содержания антоцианов в колеоптиле (Khlestkina *et al*., 2011) и эффекта разных аллелей *Rc* на транскрипцию структурных генов биосинтеза антоцианов (Khlestkina *et al*., 2010b) выявлен множественный аллелизм в локусах *Rc*.

Кластеры генов, контролирующих антоциановую окраску, относятся к ген-богатому району 7S0.4 генома пшеницы (Erayman *et al*., 2004), где также локализуются гены, контролирующие развитие растений, качество зерна, урожайность и устойчивость пшеницы к различным заболеваниям. Так, в районе 7S0.4 хромосомы 7AS располагаются локусы, контролирующие длину колоса (Wang *et al*., 2002), массу зерна

Таблица 1

Гены-ортологи, контролирующие антоциановую окраску колеоптиле, стебля, листа и пыльников у разных видов злаков

Характеристика генов	Пшеница *Triticum aesivum*	Эгилопсы *Aegilops speltoides*, *Aegilops longissima*, *Aegilops sharonensis*	Рожь *Secale cereale*	Ячмень *Hordeum vulgare*	Кукуруза *Zea mays*	
Обозначение гена (генов)	*Pc-1*, *Pan-1*, *Plb-1*, *Pls-1*, *Rc-1* и *Pp-1*	*Rc-S1* у *Ae. speltoides* также *Pc-S1*, *Pan-S1*, *Plb-S1*, *Pls-S1* и *Pp-S1*	*Rc-R1*	*Ant1*	*C1*	*Pl*
Контролирует антоциановую окраску	стебля, пыльников, листовых пластинок, листовых влагалищ, колеоптиле и перикарпа зерна	колеоптиле, стебля, пыльников, листовых пластинок, листовых влагалищ и перикарпа зерна*	колеоптиле, стебля	стебля	щитка и алейронового слоя	листовой обертки початка, колеоптиле, листовых влагалищ, пыльников, стебля, листовых пластинок
Локализация. Ссылка на лит. источник	A, 7B, 7D (Khlestkina *et al*., 2008a, 2009b, 2010a, b)	7S (Friebe *et al*., 1993, 1995, 2000; Khlestkina *et al*., 2009b; Tereshchenko *et al*., 2012a)	4R (Zeller, Koller, 1981; Khlestkina *et al*., 2009e)	7H (Lundqvist *et al*., 1996)	9 (Cone *et al*., 1993)	6 (Cone *et al*., 1993)
Колинеарность данных участков геномов злаков. Ссылка на лит. источник	Devos *et al*., 1993, 1994					

* Окраска перикарпа зерна проявляется только при переносе гена *Pp-S1* в генотип пшеницы, имеющий комплементарный ген *Pp3*.

Таблица 2

Гены-ортологи, контролирующие антоциановую окраску перикарпа зерна и колосковой/цветковой чешуи у разных видов злаков

Характеристика генов	Пшеница *Triticum aestivum*	Пшеница *Triticum durum*	Рожь *Secale cereale*	Ячмень *Hordeum vulgare*	Рис *Oriza sativa*	Кукуруза *Zea mays*
Обозначение гена (генов)	*Pp3*	*Pp3* и *Pg*	Нет обозначения	*Pvc* и *Pre2* (*Re2*)	*Pb* (*Ra*)	*Lc* (*R*)
Контролирует антоциановую окраску	перикарпа зерна	перикарпа зерна и колосковой чешуи	перикарпа зерна	перикарпа зерна и нижней цветковой чешуи	перикарпа зерна	перикарпа зерна, верхней и нижней цветковой и колосковой чешуй, а также ушек листового влагалища, лигулы и главной жилки листа
Локализация. Ссылка на лит. источник	2A (Dobrovolskaya *et al*., 2006)	2A (Khlestkina *et al*., 2010a)	2R (de Vries, Sybenga, 1984)	2H (Lundqvist *et al*., 1996)	4 (Wang, Shu, 2007)	10 (Dooner, Kermicle, 1976)
Колинеарность данных участков геномов злаков. Ссылка на лит. источник	Ahn, Tanksley, 1993; Devos *et al*., 1993; Hu *et al*., 1996; Stein *et al*., 2007					

(Pshenichnikova *et al.*, 2009), содержание белка в зерне (Blanco *et al*., 2002) и чувствительность к фотопериоду (Kuchel *et al*., 2006). В аналогичном районе хромосомы 7BS располагаются гены, контролирующие содержание белка в зерне (Blanco *et al*., 2002; Khlestkina *et al*., 2009a) и чувствительность к фотопериоду (Khlestkina *et al*., 2009a), а в 7DS – гены, контролирующие массу зерна (Röder *et al*., 2008), устойчивость к септориозу, бурой ржавчине, церкоспореллезу и тле (Worland *et al*., 1988; Ellerbrook, Worland, 2001; Arraiano *et al*., 2001; Liu *et al*., 2001, 2002; Adhikari *et al*., 2004; Simon *et al*., 2010).

Таким образом, многие гены, детерминирующие окраску, являются тесно-сцепленными с хозяйственно ценными генами и могут служить морфологическими маркерами при отборе форм пшеницы, несущих полезные признаки.

Таблица 3

Гены, определяющие фенотип пшеницы по признакам окраски, их геномная и хромосомная локализация у разных видов

Признак	Геном A	Геномы B или S	Геном D
Красная окраска зерна	*R-A1* (3A)$^{Ta,\ Td}$ (Flintham, Gale, 1995; Kuraparthy *et al*., 2008)*	*R-B1* (3B)$^{Ta,\ Td}$ (Flintham, Gale, 1995; Nalam *et al*., 2006)*	*R-D1* (3D)$^{Ta,\ At}$ (Flintham, Gale, 1995; Li *et al*., 2010)*
Окраска колоса (красная, черная или серо-дымчатая)	*Rg-A1* (1A)$^{Ta,\ Td,\ Tt,\ Tm}$ (van Deynze *et al*., 1995; Blanco *et al*., 1998; Salina *et al*., 2006; Khlestkina *et al*., 2006)*	*Rg-B1* (1B)$^{Ta,\ Td}$ (Khlestkina *et al*., 2006)*	*Rg-D1* (1D)$^{Ta,\ At}$ (Khlestkina *et al*., 2006, 2009c)*
Окраска остей (красная или черная)	*QRaw.ipk-1A* (1A)^{Td} (Börner *et al*., 2002)* и *Bla1* (1A)^{Td} (Панин, Нецветаев, 1986)**	*QRaw.ipk-1B* (1B)^{Td} (Börner *et al*., 2002)*	*QRaw.ipk-1D* (1D)^{At} (Börner *et al*., 2002)*
Красная окраска колеоптиле	*Rc-A1* (7A)$^{Ta,\ Td,\ Tb}$ Khlestkina *et al*., 2002a; Singh *et al*., 2007)*	*Rc-B1* (7B)$^{Ta,\ Td}$ (Khlestkina *et al*., 2002a; Хлесткина, 2011)* и *Rc-S1* (7S)^{As} (Friebe *et al*., 2000)**	*Rc-D1* (7D)$^{Ta,\ At}$ Khlestkina *et al*., 2002a)*
Пурпурная окраска стебля	*Pc-A1* (7A)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2010b)*	*Pc-B1* (7B)$^{Ta,\ Td}$ (Khlestkina *et al*., 2009b, 2010a)* и *Pc-S1* (7S)^{As} (Tereshchenko *et al*., 2012a)**	*Pc-D1* (7D)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2009b)*
Пурпурная окраска пыльников	*Pan-A1* (7A)^{Td} (Blanco *et al*., 1998)*	*Pan-S1* (7S)^{As} (Tereshchenko *et al*., 2012a)**	*Pan-D1* (7D)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2009b)*
Пурпурная окраска листовых пластинок	*Plb-A1* (7A)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2010b)*	*Plb-B1* (7B)$^{Ta,\ Td}$ (Khlestkina *et al*., 2009b, 2010a)* и *Plb-S1* (7S)^{As} (Tereshchenko *et al*., 2012a)**	*Plb-D1* (7D)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2009b)*
Пурпурная окраска листовых влагалищ	*Pls-A1* (7A)^{Ta} (Khlestkina *et al*., 2010b)*	*Pls-B1* (7B)$^{Ta,\ Td}$ (Khlestkina *et al*., 2009b, 2010a)* и *Pls-S1* (7S)^{As} (Tereshchenko *et al*., 2012a)**	*Pls-D1* (7D)^{Ta} (Хлесткина, 2011)*
Пурпурная окраска перикарпа зерна	*Pp3* (2A)$^{Ta,\ Td,\ Tt}$ (Dobrovolskaya *et al*., 2006; Khlestkina *et al*., 2010a; Tereshchenko *et al*., 2012a)*	*Pp-B1* (7B)^{Td} (Khlestkina *et al*., 2010a)* и *Pp-S1* (7S)^{As} (Tereshchenko *et al*., 2012a)**	*Pp-D1* (7D)^{Ta} (Tereshchenko *et al*., 2012b)*
Пурпурная окраска колоса	*Pg* (2A)^{Td} (Khlestkina *et al*., 2010a)*	Нет	Нет
Красная окраска ушек листового влагалища	Нет	*Ra2* (4B)^{Ta} и *Ra3* (6B)^{Ta} (Melz, Thiele, 1990)**	*Ra1* (1D)^{Ta} (Гуляева, 1984)**
Голубая окраска алейронового слоя зерна	*Ba* (blue aleurone, 4A)^{Tb} (Dubcovsky *et al*., 1996; Singh *et al*., 2007)*	Нет	Нет

Ta – *T. aestivum*, Tb – *T. boeoticum*, Td – *T. durum*, Tm – *T. monococcum*, Tt – *T. timopheevii*, Tu – *T. urartu*, As – *Ae. speltoides*, t – *Ae. tauschii*. Приведены ссылки на работы по картированию* (если гены не картированы, то по локализации**) соответствующих генов.

Заключение

В табл. 3 суммированы данные по числу и локализации генов, определяющих фенотип пшеницы по признакам окраски. Видно, что большинство известных на данный момент генов представлено в виде гомеологичных копий в геномах A, B и D. Исключение составляют гены, встречающиеся только в геноме A (*Ba*, *Pg* и *Pp3*), и мало изученные гены *Ra*, выявленные в разных хромосомах геномов B (2 локуса) и D (1 локус).

Сравнительное картирование у разных видов злаков показало, что ортологичные гены, контролирующие окраску, могут как встречаться у отдельных представителей злаковых растений (гомеологичный ряд генов *Rg* выявлен только у пшениц и эгилопсов, *R* – у пшениц, эгилопсов и ржи), так и быть широко представленными во всем семействе злаков (гены, детерминирующие антоциановую окраску различных органов).

Накопленные к настоящему моменту знания позволяют считать, что гены, определяющие разнообразие форм пшеницы по окраске, являются регуляторными и кодируют Myb- или Myc-подобные активаторы транскрипции структурных генов биосинтеза различных классов флавоноидных пигментов.

Литература

Алиев Э.Б., Мусаев А.Д. Идентификация гена *Rg1*, контролирующего окраску колоса у ярового сорта мягкой пшеницы Диамант 2 // Изв. СО АН СССР. 1981. № 10. С. 87–92.

Богданова Е.Д., Сарбаев А.Т., Махмудова К.Х. Устойчивость пшеницы к твердой головне // Матер. науч. генет. конф. Москва, 26–27 февраля 2002. М., 2002. С. 43–44.

Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. С. 70–87.

Ваценко А.А. Наследование опушения чешуй и черной окраски колоса у твердых пшениц *Triticum durum* Desf. // Докл. АН СССР. 1934. Т. 4. С. 338–342.

Гуляева З.Б. Локализация генов, контролирующих опушение колосковых чешуй и окраску ушек листового влагалища у озимого сорта Ульяновка // Тр. прикл. ботан. генет. селекции. Л., 1984. Т. 85. С. 95–96.

Елохина Л.П. Генетический контроль окраски колоса мягкой яровой пшеницы Мильтурум 553 // Роль науки в интенсификации сельского хозяйства: Сб. тр. конф. Ч. 1. Омск, 20–21 апреля 1989. Новосибирск, 1990. С. 13–14.

Коваль С.Ф. Каталог изогенных линий яровой мягкой пшеницы Новосибирская 67 и принципы их использования в эксперименте // Генетика. 1997. Т. 33. С. 1168–1173.

Кудрявцев А.М., Попова Т.А. Генетическое сцепление между глиадинкодирующими генами и генами окраски и опушения колоса у яровой твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1587–1592.

Лайкова Л.И., Арбузова В.С., Ефремова Т.Т., Попова О.М. Генетический анализ окраски стебля и пыльников у растений мягкой пшеницы // Генетика. 2005. Т. 41. С. 1428–1433.

Майстренко О.И. Использование цитогенетических методов в исследовании онтогенеза мягкой пшеницы // Онтогенетика высших растений: Сб. тр. конф. Кишинев: Штиинца, 1992. С. 98–113.

Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Особенности распространения морфологических признаков колоса мягкой пшеницы на территории бывшего СССР // Генетика. 1997. Т. 33. С. 350–357.

Панин В.М., Нецветаев В.П. Генетический контроль глиадина и некоторых форм морфологических признаков колоса у твердой озимой пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ (Одесса). 1986. № 2. С. 31–36.

Пухальский В.А. Число генов окраски зерна у сортов яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Генетика. 1984. Т. 20. С. 457–461.

Пшеничникова Т.А., Бокарев И.Е., Щукина Л.В. Гибридологический и моносомный анализ признака дымчатой окраски колоса у мягкой пшеницы // Генетика. 2005. Т. 41. С. 1147–1149.

Синская Е. О полевых культурах Алтая (краткий отчет о поездке летом 1924 г.) // Тр. прикл. ботан. селекции. 1925. Т. 14. С. 359–376.

Собко Т.А., Созинов А.А. Генетический контроль морфологических признаков колоса и взаимосвязь аллельной изменчивости маркерных локусов хромосом 1A и 1B озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. 1993. Т. 27. С. 15–22.

Собко Т.А., Созинов А.А. Картирование локусов, контролирующих морфологические признаки колоса и запасные белки зерна, в хромосоме 1A озимой мягкой пшеницы // Цитология и генетика. 1997. Т. 31. С. 18–26.

Филипченко Ю.А. Генетика мягких пшениц. М.; Л.: Сельхозгиз, 1934. 262 с.

Хлесткина Е.К., Салина Е.А., Пшеничникова Т.А. и др. Анализ изогенных линий мягкой пшеницы, несущих доминантные аллели генов *Bg*, *Hg* и *Rg1*, с помощью микросателлитных и белковых маркеров // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1374–1379.

Хлесткина Е.К. Геномная локализация и структурно-функциональные особенности генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и ее сородичей: Дис. … д-ра биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 2011. 325 с.

Шрайбер Л.Л. Антоцианы // Пшеницы Абиссинии и их положение в общей системе пшениц (К познанию 28-хромосомной группы культурных пшениц) / Ред. Н.И. Вавилов. Л.: ВИР, 1931. С. 16–17.

Якубцинер М.М., Савицкий М.С. Зерновые культуры // Руководство по апробации сельскохозяйственных культур. М.: Сельхозгиз, 1947. С. 20.

Adhikari T.B., Cavaletto J., Dubcovsky J. *et al*. Molecular mapping of the *Stb4* gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat // Phytopathology. 2004. V. 94. P. 1198–1206.

Ahn S., Tanksley S.D. Comparative linkage maps of the rice and maize genomes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1993.

V. 90. P. 7980–7984.
Allan R.E., Vogel O.A. Monosomic analysis of red seed color in wheat // Crop Sci. 1965. V. 5. P. 474–475.
Arbuzova V.S., Maystrenko O.I., Popova O.M. Development of near-isogenic lines of the common wheat cultivar 'Saratovskaya 29' // Cereal Res. Commun. 1998. V. 26. P. 39–46.
Arraiano L.S., Worland A.J., Ellerbrook C., Brown J.K.M. Chromosomal location of a gene for resistance to septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat 'Synthetic 6x' // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 758–764.
Arzani A., Peng J.H., Lapitan N.L.V. DNA and morphological markers for a Russian wheat aphid resistance gene // Euphytica. 2004. V. 139. P. 167–172.
Ausemus E.R., Harrington Y.B., Worzella W.S., Reitz R.L. A summary of genetic studies in hexaploid and tetraploid wheats // J. Amer. Soc. Agron. 1946. V. 38. P. 1082–1099.
Biffen R.H. Mendel's law of inheritance and wheat breeding // J. Agr. Sci. 1905. V. 1. P. 48.
Blanco A., Bellomo M.P., Cenci A. *et al*. A genetic linkage map of durum wheat // Theor. Appl. Genet. 1998. V. 97. P. 721–728.
Blanco A., Pasqualone A., Troccoli A. *et al*. Detection of grain protein content QTLs across environments in tetraploid wheats // Plant Mol. Biol. 2002. V. 48. P. 615–623.
Bolton F.E. Inheritance of blue aleurone and purple pericarp in hexaploid wheat // Plant Breed. Abstr. 1970. V. 40. P. 2684.
Börner A., Schumann E., Гьrste A. *et al*. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 921–936.
Burnham C.R. Discussions in Cytogenetics. Minneapolis: Burgess Publ. Co., 1962. 375 p.
Chao S., Sharp P.J., Worland A.J. *et al*. RFLP-based genetic maps of wheat homoeologous group 7 chromosomes // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 495–504.
Chin K.-C. Le pigment pourpre dans le hybrides de bles europeens, africains et canadiens // C. r. Acad. Sci. Paris. 1944a. V. 219. P. 78–80.
Chin K.-C. Relations phylogenetiques entre *Tr. vulgare* et le *Tr. monococcum* d'apres le pigment pourpre // C.r. Acad. Sci. Paris. 1944b. V. 218. P. 975.
Churchward J.G. Studies on physiologic specialization of the organisms causing bunt in wheat, and the genetic resistance to this and certain others wheat diseases. Part II. Genetical studies // Roy. Soc. N. S. Wales J. 1938. V. 71. P. 547–590.
Clark J.A. Segregation and correlated inheritance in crosses between Kota and Hard Federation wheats for rust and drought resistance // J. Agric. Res. 1924. V. 29. P. 1047.
Cone K.C., Cocciolone S.M., Burr F.A., Burr B. Maize anthocyanin regulatory gene *pl* is a duplicate of c1 that functions in the plant // Plant Cell. 1993. V. 5. P. 1795–1805.
Darwin C. The Variation of Animals and Plants under Domestication. N.Y.: D. Appelton and Co, 1883. 495 p.
Davis G.L., McMullen M.D., Baysdorfer C. *et al*. A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map // Genetics. 1999. V. 152. P. 1137–72.
de Vries J.N., Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using translocation tester set // Z. Pflanzenzücht. 1984. V. 192. P. 117–139.
Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N. *et al*. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat // Theor. Appl. Genet. 1993. V. 85. P. 673–680.
Devos K.M., Chap S., Li Q.Y. *et al*. Relationship between chromosome 9 of maize and wheat homoeologous group 7 chromosomes // Genetics. 1994. V. 138. P. 1287–1292.
Dobrovolskaya O.B., Arbuzova V.S., Lohwasser U. *et al*. Microsatellite mapping of complementary genes for purple grain colour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Euphytica. 2006. V. 150. P. 355–364.
Dooner H.K., Kermicle J.L. Displaced and tandem duplications in the long arm of chromosome 10 in maize // Genetics. 1976. V. 82. P. 309–322.
Dubcovsky J., Luo M.C., Zhong G.Y. *et al*. Genetic map of diploid wheat, *Triticum monococcum* L., and its comparison with maps of *Hordeum vulgare* L. // Genetics. 1996. V. 143. P. 983–999.
Efremova T.T., Maystrenko O.I., Arbuzova V.S., Laikova L.I. Genetic analysis of glume colour in common wheat cultivars from the former USSR // Euphytica. 1998. V. 102. P. 211–218.
Ellerbrook C., Worland A.J. Using precise genetic stocks to study the genetics of disease resistance in wheat // EWAC Newslett. 2001. V. 11. P. 31–37.
Engledow F.L. A case of repulsion in wheat // Cambridge Phil. Soc. Proc. 1914. V. 17. P. 433–435.
Erayman M., Sandhu D., Sidhu D. *et al*. Demarcating the gene-rich regions of the wheat genome // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. P. 3546–3565.
Fletcher R.J., McIntosh R.A. Isolation and identification of the chromosome arm bearing *Rg* determining glume color in Federation wheat // EWAC Newslett. 1974. V. 4. P. 65–66.
Flintham J.E., Gale M.D. Dormancy gene maps in homoeologous cereal genomes // Proc. 7th Intern. Symp. on pre-harvest sprouting in cereals. Japan, Osaka, 1995. P. 143–149.
Freed R.D., Everson E.H., Ringlund K., Gullord M. Seed coat color in wheat and the relationship to seed dormancy at maturity // Cereal Res. Commun. 1976. V. 4. P. 147–149.
Friebe B., Tuleen N., Jiadg J., Gill B.S. Standard karyotype of *Triticum longissimum* and relationship with *T. aestivum* // Genome. 1993. V. 36. P. 731–742.
Friebe B., Tuleen N.A., Gill B.S. Standard karyotype of *Triricum searsii* and its relationship with other S-genome species and common wheat // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 248–254.
Friebe B., Qi L.L., Nasuda S. *et al*. Development of a complete set of *Triticum aestivum-Aegilops speltoides* chromosome addition lines // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 51–58.
Gale M.D., Flavell R.B. The genetic control of anthocyanin biosythesis by homoeologous chromosomes in wheat // Genet. Res. Camb. 1971. V. 18. P. 237–244.
Gale M.D., Atkinson M.D., Chinoy C.N. *et al*. Genetic maps of hexaploid wheat / Eds Z.S. Li, Z.Y. Xin. Proc. 8th Int. Wheat genet. symp. Beijing: China Agricultural Scientech Press, 1995. P. 1333–1500.
Ganal M., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in

wheat breeding // Genomics-assisted crop improvement / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. V. 2. Genomics applications in crops. Dordrecht (The Netherlands): Springer, 2007. P. 1–24.

Goulden C.H., Neatby K.W., Welsh J.N. The inheritance of resistance to *Puccinia graminis tritici* in a cross between to varieties of *Triticum vulgare* // Phytopathol. 1928. V. 18. P. 627.

Himi E., Noda K. Red grain colour gene (*R*) of wheat is a Myb-type transcription factor // Euphytica. 2005. V. 143. P. 239–242.

Himi E., Nisar A., Noda K. Colour genes (*R* and *Rc*) for grain and coleoptile upregulate flavonoid biosynthesis genes in wheat // Genome. 2005. V. 48. P. 747–754.

Himi E., Maekawa M., Miura H., Noda K. Development of PCR markers for Tamyb10 related to *R-1*, red grain color gene in wheat // Theor. Appl. Genet. 2011. V. 122. P. 1561–1576.

Howard A., Howard G. On the inheritance of some characters in wheat. I. // India Dept. Agr. Mem. Bot. Ser. 1912. V. 5. P. 1–47.

Howard A., Howard G. On the inheritance of some characters in wheat. II. // India Dept. Agr. Mem. Bot. Ser. 1915. V. 7. P. 273–285.

Hu J., Anderson B., Wessler R. Isolation and characterization of rice *R* genes: evidence for distinct evolutionary paths in rice and maize // Genetics. 1996. V. 142. P. 1021–1031.

Jha K.K. The association of a gene for purple coleoptile with chromosome 7D of common wheat // Can. J. Genet. Cytol. 1964. V. 6. P. 370–372.

Jones S.S., Dvorak J., Qualset C.O. Linkage relations of *Gli-D1*, *Rg2*, and *Lr21* on the short arm of chromosome 1D in wheat // Genome. 1990. V. 33. P. 937–940.

Kadam B.S. Genetics in Bansi wheat of the Bombay-Deccan and synthetic Khapli. Part I // Proc. Indian Acad. Sci. 1936. V. 4. P. 357–369.

Kerber E.R., Dyck P.L. Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa* // Can. J. Genet. Cytol. 1969. V. 11. P. 639–647.

Kezer A., Boyack B. Mendelian inheritance in wheat and barley crosses, with probable error studies on class frequencies // Colo. Agr. Exp. Sta. Bul. 1918. P. 249.

Khlestkina E.K. Regulatory-target gene relationships in allopolyploid and hybrid genomes // Advances in Genetics Research / Ed. K.V. Urbano. N.Y.: NOVA Science Publishers, 2010. V. 3. P. 311–328.

Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Röder M.S., Börner A. Molecular mapping, phenotypic expression and geographical distribution of genes determining anthocyanin pigmentation of coleoptiles in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2002a. V. 104. P. 632–637.

Khlestkina E.K., Pestsova E.G., Salina E.A. *et al*. Molecular mapping and tagging of wheat genes using RAPD, STS and SSR markers // Cell. Mol. Biol. Let. 2002b. V. 7. P. 795–802.

Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S. *et al*. Comparative mapping of genes for glume colouration and pubescence in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. P. 801–807.

Khlestkina E.K., Röder 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. Abbington. N.Y.: NOVA Science Publishers, Inc, 2008a. P. 155–175.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Salina E.A. Relationship between homoeologous regulatory and structural genes in allopolyploid genome – a case study in bread wheat // BMC Plant Biol. 2008b. V. 8. P. 88.

Khlestkina E.K., Giura A., Röder M. S., Börner A. A new gene controlling the flowering response to photoperiod in wheat // Euphytica. 2009a. V. 165. P. 579–585.

Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes // Cereal Res. Commun. 2009b. V. 37. P. 391–398.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Identification of glume coloration genes in synthetic hexaploid and common wheats // Wheat Inf. Serv. (eWIS) 2009c. V. 108. P. 1–3.

Khlestkina E.K., Salina E.A., Pshenichnikova T.A. *et al*. Glume coloration in wheat: allelism test, consensus mapping and its association with specific microsatellite allele // Cereal Res. Commun. 2009d. V. 37. P. 37–43.

Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Yu., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids // Mol. Genet. Genom. 2009e. V. 282. P. 475–485.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Börner A. Mapping genes controlling anthocyanin pigmentation on the glume and pericarp in tetraploid wheat (*Triticum durum* L.) // Euphytica. 2010a. V. 171. P. 65–69.

Khlestkina E.K., Röder M.S., Pshenichnikova T.A., Börner A. Functional diversity at *Rc* (red coleoptile) locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Mol. Breed. 2010b. V. 25. P. 125–132.

Khlestkina E.K., Antonova E.V., Pershina L.A. *et al*. Variability of *Rc* (red coleoptile) alleles in wheat and wheat-alien genetic stock collections // Cereal Res. Commun. 2011. V. 39. P. 465–474.

Kiessling L. Erbanalytische Untersuchungen über die Spelzenfarbe des weizens // Landw. Jahrbuch Bayern. 1914. Nr. 2. P. 102–170.

Korzun V., Röder M.S., Wendehake K. *et al*. Integration of dinucleotide microsatellites from hexaploid wheat into a genetic linkage map of durum wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 1202–1207.

Kuchel H., Hollamby G., Langridge P. *et al*. Identification of genetic loci associated with ear-emergence in bread wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. P. 1103–1112.

Kuraparthy V., Sood S., Gill B.S. Targeted genomic mapping of a red seed color gene (*R-A1*) in wheat // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 37–48.

Kuspira J., Maclagan J., Bhambhani R.N. *et al*. Genetic and cytogenetic analyses of the A genome of *Triticum monococcum* L. V. Inheritance and linkage relationships of genes determining the expression of 12 qualitative characters // Genome 1989. V. 32. P. 869–881.

Kuspira J., Unrau J. Determination of the number and dominance relationships of genes on substituted chromosomes in common wheat *Triticum aestivum* L. // Can. J. Plant Sci. 1958. V. 38. P. 119–205.

Law C.N., Chapman V. An inhibitor of glume colour // EWAC Newslett. 1974. V. 4. P. 8–9.

Law C.N., Wolfe M.C. Location of genetic factors for mildew resistance and ear emergence time on chromosome 7B of

wheat // Can. J. Genet. Cytol. 1966. V. 8. P. 462–470.
Leisle D., Kovacs M.I., Howes N. Inheritance and linkage relationships of gliadin proteins and glume color in durum wheat // Can. J. Genet. Cytol. 1985. V. 27. P. 716–721.
Li J., Wei H., Hu X. *et al*. Locus R-D1 conferring red-grain-color in synthetic derivative wheat Chuanmai 42 mapped with SSR markers // Mol. Plant Breed. 2010. V. 1. P. 16–20.
Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M. *et al*. Genomic mapping of defense response genes in wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 226–233.
Liu X.M., Smith C.M., Gill B.S., Tolmay V. Microsatellite markers linked to six Russian wheat aphid resistance genes in wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 102. P. 504–510.
Liu X.M., Smith C.M., Gill, B.S. Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes *Dn4* and *Dn6* // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 1042–1048.
Lohwasser U., Röder M.S., Börner A. QTL mapping of vegetative characters in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Gen. Var. Plant Breed.: proc. 17th EUCARPIA gen. congr. Tulln, 8–11 September, 2004. P. 195–198.
Ludwig S.R., Habera L.F., Dellaporta S.L., Wessler S.R. *Lc*, a member of the maize *R* gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 7092–7096.
Lundqvist U., Franckowiak J.D., Konishi T. New and revised descriptions of barley genes // Barley Genet. Newslett. 1996. V. 26. P. 22–43.
Malinowski E. Les hybrids du froment // Bull. Intern. Acad. Sci. Cracovie. 1914. V. 3. P. 410–450.
Matsumura S. Linkage studies in wheat, II. *P*-linkage and the manifold effects of *P* gene // Jap. J. Genet. 1950. V. 25. P. 111–118.
Maystrenko O.I., Laikova L.I. Chromosomal localization and linkage relationship of the *Pan1* and *Pc2* genes controlling anthocyanin pigmentation of the anthers and culm in common wheat // EWAC Newslett. 1995. V. 9. P. 120–122.
McIntosh R.A., Backer E.P. Inheritance of purple pericarp in wheat // Proc. Linnean Soc. 1967. V. 92. P. 204–208.
McIntosh R.A., Hart C.E., Devos K.M. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. IX Intern. Wheat Genet. Symp. V. 5. Saskatoon, 1998. 235 p.
McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat. 2008. [http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/]
Melz G., Thiele V. Chromosome locations of genes controlling 'purple leaf base' in rye and wheat // Euphytica. 1990. V. 49. P. 155–159.
Metzger R.J., Silbaugh B.A. Location of genes for seed coat color in hexaploid wheat *Triticum aestivum* L. // Crop Sci. 1970. V. 10. P. 495–496.
Miller T.E. The homoeologous relationship between the chromosomes of rye and wheat. Current status // Can. J. Genet. Cytol. 1984. V. 26. P. 578–589.
Miyamoto T., Everson E.H. Biochemical and physiological studies of wheat seed pigmentation // Agron. J. 1958. V. 50. P. 733–734.
Nalam V.J., Vales M.I., Watson C.J. *et al*. Map-based analysis of genes affecting the brittle rachis character in tetraploid wheat (*Triticum turgidum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 373–381.
Nelson J.C., Sorrels M.E., van Deynze A.E. *et al*. Molecular mapping of wheat: major genes and rearrangements in homoeologous groups 4, 5, and 7 // Genetics. 1995. V. 141. P. 721–731.
Nilsson-Ehle H. Kreuzungsversuchungen an Hafer und Weizen // Lands. Univ. Aersskrift N.F. Afd. 2 (2), 1909. 122 p.
Nilsson-Ehle H. Zur Kenntnis der mit der keimungsphysiologie des weizens in zusammenhang stehenden inneren faktoren // Z. Pflanzenzьct. 1914. V. 2. P. 153–187.
Payne P.I., Holt L.M., Johnson R., Snape J.W. Linkage mapping of four gene loci *Glu-B1*, *Gli-B1*, *Rg1*, and *Yr10* on chromosome 1B of bread wheat // Genet. Agrar. 1986. V. 40. P. 231–242.
Percival J. The Wheat Plant: A Monograph. London: Duckworth and Co, 1921. 463 p.
Piech J., Evans L.E. Monosomic analysis of purple grain colour in hexaploid wheat // J. Pflanzenzucht. 1979. V. 82. P. 212–217.
Pshenichnikova T.A., Maystrenko O.I. Inheritance of genes coding for gliadin proteins and glume colour introgressed into *Triticum aestivum* from a synthetic wheat // Plant Breed. 1995. V. 114. P. 501–504.
Pshenichnikova T.A., Ermakova M.F., Chistyakova A.K. *et al*. Mapping of QTLs associated with the important agronomic traits using recombinant substitution dihaploid lines Saratovskaya 29 (Janetzkis Probat 4D) // Abstr. German-Russian Forum Biotechnology (GRFB). Novosibirsk, 15–19 June, 2009. P. 39.
Quisenberry K.S. Inheritance of winter hardiness, growth habit and stem rust reaction in crosses between Minhardi winter and H-44 spring wheats // Tech. Bull. U.S.D.A. 1931. No 218. P. 1–45.
Röder M.S., Korzun V., Wendehake K. *et al*. A microsatellite map of wheat // Genetics. 1998. V. 149. P. 2007–2023.
Röder M.S., Huang X.Q., Börner A. Fine mapping of the region on wheat chromosome 7D controlling grain weight // Funct. Integr. Genomics. 2008. V. 8. P. 79–86.
Rowland G.G., Kerber E.R. Telocentric mapping in hexaploid wheat of genes for leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa* // Can. J. Genet. Cytol. 1974. V. 16. P. 137–144.
Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization // Funct. Integr. Genomics. 2006. V. 6. P. 71–80.
Sears E.R. The aneuploids of common wheat // Univ. Mo. Agr. Sta. Res. Bul. 1954. V. 572. P. 1–59.
Sikka S.M., Jain K.B.L., Parmer K.S. Inheritance of some morphological characters in intervarietal crosses of *Triticum aestivum* L. // J. Indian Bot. Soc. 1961. V. 40. P. 217–233.
Simon M.R., Khlestkina E.K., Castillo N.S., Börner A. Mapping quantitative resistance to septoria tritici blotch in spelt wheat // Eur. J. Plant Pathol. 2010. V. 128. P. 317–324.
Singh K., Ghai M., Garg M. *et al*. An integrated molecular linkage map of diploid wheat based on a *Triticum boeoticum* × *T. monococcum* RIL population // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 115. P. 301–312.
Spillman W.J. Quantitative studies on the transmission of parental characters to hybrid offspring // U.S.D.A. Off. Exp. Sta. Bul. 1902. No 115. P. 88–89.

Stein N., Prasad M., Scholz U. *et al*. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics // Theor. Appl. Genet. 2007. V. 114. P. 823–839.

Sutka J. The association of genes for purple coleoptile with chromosomes of the wheat variety Mironovskaya 808 // Euphytica. 1977. V. 26. P. 475–479.

Tahir C.M., Tsunewaki K. Monosomic analysis of *Triticum spelta* var. *duhamelianum*, a fertility-restorer for *T. timopheevi* cytoplasm // Jap. J. Genet. 1969. V. 44. P. 1–9.

Tereshchenko O.Y., Pshenichnikova T.A., Salina E.A., Khlestkina E.K. Development and molecular characterization of a novel wheat genotype having purple grain colour // Cereal Res. Commun. 2012a. V. 40. In press.

Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S. *et al*. The D genome of wheat carries one of the two complementary genes determining purple grain colour in wheat // Cereal Res. Commun. 2012b. V. 40. In press.

Tschermak E. Ueber Züchtung neuer Getreiderassen mittelst künstlicher Kreuzung // Zeitschr. Landw. Versuch. Oesterreich. 1901. V. 4. P. 1029–1060.

Unrau J. The use of monosomes and nullisomes in cytogenetic studies in common wheat // Sci. Agr. 1950. V. 30. P. 66–89.

van Deynze A.E., Dubovsky J., Gill K.S. *et al*.. Molecular-genetic maps for group 1 chromosomes of Triticeae species and their relation to chromosomes in rice and oat // Genome. 1995. V. 38. P. 45–59.

Wang C., Shu Q. Fine Mapping and candidate gene analysis of purple pericarp gene *Pb* in rice (*Oryza sativa* L.) // Chinese Sci. Bull. 2007. V. 52. P. 3097–3104.

Wang H.-J., Huang X.Q., Röder M.S., Börner A. Genetic mapping of loci determining long glumes in the genus *Triticum* // Euphytica. 2002. V. 123. P. 287–293.

Watanabe N. Near-isogenic lines of durum wheat: their development and plant characteristics // Euphytica. 1994. V. 72. P. 143–147.

Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 485–493.

Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 218–223.

Worland A.J., Law C.N., Hollins T.W. *et al*. Location of a gene for resistance to eyespot (*Pseudocercosporella herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat // Plant Breed. 1988. V. 101. P. 43–51.

Worzella W.W. Research in soft red winter wheat // Purdue Univ. Agr. Exp. Sta. Ann. Rep. 1937. V. 50. P. 26.

Worzella W.W. Inheritance and inter-relationship of components of quality, cold resistance and morphological characters in wheat hybrids // J. Agric. Res. 1942. V. 65. P. 501–522.

Wu C.S., Ausemus E.R. Inheritance of leaf rust and other characters in spring wheat cross // Agron. J. 1930. V. 45. P. 43–48.

Zeller F.J., Koller O.L. Identification of 4A/7R and 7B/4R wheat-rye chromosome translocation // Theor. Appl. Genet. 1981. V. 59. P. 33–37.

Zeven A.C. The colour of the coleoptile of wheat: a review and geographical distribution of the purple coleoptile of *Triticum aestivum* // Euphytica. 1973. V. 22. P. 471–478.

Zeven A.C. The character brown ear of bread wheat: a review // Euphytica. 1983. V. 32. P. 299–310.

Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review // Euphytica. 1991. V. 56. P. 243–258.

GENES DETERMINING COLORATION OF DIFFERENT ORGANS IN WHEAT

E. K. Khlestkina

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

Summary

Coloration of some wheat organs may be of adaptive significance. Coloration traits are widely used in wheat taxonomy and variety identification. They also provide a suitable model for genetic and molecular studies. Here, data on chromosome location, genetic mapping, and structural and functional organization of all known genes determining coloration in wheat are reviewed. To date, thirty genes determining coloration in wheat have been mapped. These genes are represented mainly by homoeologous loci in the A, B and D genomes, and most of them are located in the 1S0.8 and 7S0.4 gene-rich regions of wheat genome. Comparative mapping in cereals shows that some orthologous genes determining coloration occur in a few species (homoeologous series *Rg* has been found in wheat and *Aegilops* only, and *R*, in wheat, *Aegilops* and rye), whereas others (genes determining anthocyanin pigmentation) widely occur in Poaceae. The data on comparative mapping together with the results of recent studies dedicated to cloning and functions of genes determining coloration in wheat suggest that these genes belong to the Myb- and Myc-like families of genes, encoding transcriptional activators for structural genes involved in plant flavonoid pigments biosynthesis.

Key words: wheat, morphological traits, coloration, chromosome localization of genes, molecular mapping.

УДК 633.11:631.52:577.21:576.316:633.14

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЗАМЕЩЕНИЯ (1B)1R И ТРАНСЛОКАЦИИ 1BL.1RS У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ ЦИТОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ

© 2012 г. **И.И. Моцный[1], С.В. Чеботарь[2], Л.В. Сударчук[2], А.В. Галаев[2], Ю.М. Сиволап[2]**

[1] Селекционно-генетический институт – Национальный центр семеноводства и сортоизучения (СГИ–НЦСС), Одесса, Украина, e-mail: motsnyyii@gmail.com;
[2] Южный биотехнологический центр НААНУ, Одесса, Украина

Поступила в редакцию 17 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 января 2012 г.

Замещение хромосомы 1B пшеницы на хромосому 1R ржи и транслокация 1BL.1RS идентифицированы с помощью цитологического анализа и молекулярных маркеров у оригинальных интрогрессивных линий F_{∞}, полученных в результате сложных отдаленных скрещиваний с участием октоплоидного тритикале, твердой пшеницы и производных амфидиплоида (АД) *T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss. С очень низкой частотой (в 0,2–0,3 % материнских клеток пыльцы – МКП) наблюдалась конъюгация между короткими плечами 1BL.1RS и 1B хромосом мягкой пшеницы. Линии с транслокацией были устойчивы, а с целой хромосомой 1R – восприимчивы к листовой и стеблевой ржавчине, что связано с разным происхождением 1R-хромосом, вовлеченных в транслокацию или замещение. У некоторых интрогрессивных линий присутствует ген *Hg1*, контролирующий опушение колоса, переданный от сорта Гостианум 237. Опушение листа сверху, снизу и по краю листовой пластинки обнаружено у нескольких линий. Данные признаки перенесены от АД *T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss и, предположительно, происходят от *Ae. tauschii*.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, цитогенетический анализ, замещение (1B)1R, транслокация 1BL.1RS, устойчивость к видам ржавчины, ДНК-маркеры.

Введение

Одним из методов обогащения генофонда мягкой пшеницы является интрогрессия генетического материала от родственных видов. Наилучшие практические результаты получены при использовании в селекции пшеницы короткого плеча хромосомы 1R *Secale cereale* L. Данный сегмент хромосомы содержит гены, повышающие адаптивность мягкой пшеницы, в частности *Pm8*, *Yr9*, *Lr26* и *Sr31*, которые тесно сцеплены в коротком плече хромосомы 1R ржи (McIntosh *et al*., 2008) и происходят от сорта ржи Petkus. Также привнесение хромосомы 1RS в геном пшеницы способствует росту урожайности пшеницы, хотя и снижает качество муки. При этом указанный эффект на адаптивность и урожайность в значительной степени зависит от генотипа и условий выращивания материала (Lelley *et al*., 2004).

В результате отдаленной гибридизации октоплоидного тритикале АД825 с сортом твердой пшеницы Черномор и последующего переопыления материала производными амфидиплоида (АД) *T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss в отделе генетики СГИ–НЦСС (г. Одесса) создана коллекция первичных интрогрессивных линий, отличающихся высокой устойчивостью к листовой и стеблевой ржавчине, морозостойкостью, высоким содержанием белка и низким качеством зерна, а также опушением листа и колоса (Моцный и др., 2000а, б). Известно, что опушение листовых пластинок и колосковых чешуек контролируется генами *Hl* и *Hg* соответственно и является адаптивными признаками в условиях засухи (McIntosh *et al*., 2008).

Целью настоящего исследования были идентификация замещения хромосомы 1B пшеницы на хромосому 1R ржи и транслокации 1BL.1RS у данных линий с помощью цитологического

анализа и молекулярных маркеров, а также оценка влияния чужеродных интрогрессий на агрономические признаки в изменчивых условиях 2004–2009 гг.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужил набор оригинальных первичных интрогрессивных линий F_{∞} ($2n = 42$): Erythrospermum 200/97-2 (в дальнейшем E200/97-2), Erythrospermum 217/97 (E217/97), Hostianum 242/97-1 (H242/97-1), Hostianum 242/97-2 (H242/97-2), Hostianum 273/97 (H273/97), Hostianum 274/97 (H274/97) и OH232/03, коллекционные сестринские линии H74/90-245 и H74/90-258, линия сорта озимой мягкой пшеницы Одесская 267 (Од.267), а также гибриды F_1 между указанными линиями. Большинство первичных интрогрессивных линий были выделены от скрещивания Тритикале (8x) АД825 × *T. durum* Desf. Черномор после спонтанной гибридизации с коллекционными линиями H74/90-245 и H74/90-258 или без нее. Тритикале АД825 – это первичный амфидиплоид (*T. aestivum* L. Гостианум 237 × *Secale cereale* L. Воронежская СХИ) (Бадаев и др., 1982). Линии H74/90-245 и H74/90-258 были созданы в Институте пшеницы и подсолнечника «Добруджа» (Генерал Тошево, Болгария) от ступенчатых скрещиваний АД (*T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss.) с сортами мягкой пшеницы Tom Pouce Blanc, Аврора и Rusalka и получены от д-ра И. Панайотова. Обе линии отличаются высокой устойчивостью к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине, опушением листьев, характерным для *Ae. tauschii* (с расположением трихом снизу, сверху и по краю листовой пластинки), и наличием пшенично-ржаной транслокации 1BL.1RS от сорта Аврора (Моцный, Благодарова, 2004).

Материал был оценен на устойчивость к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине, наличие опушения колоса и листьев, проанализирован с применением нескольких ДНК-маркеров. Также интрогрессивные линии, Од.267 и гибриды F_1 были цитологически изучены рутинным ацетокарминовым методом (Паушева,1980). При этом исследования мейоза проводились на материале, зафиксированном в фиксаторе Карнуа (96 % этиловый спирт : хлороформ : ледяная уксусная кислота = 6 : 3 : 1). Пыльники окрашивали 2 %-м раствором ацетокармина после предобработки 4 %-ми железоаммонийными квасцами. Изучали 8–11 растений каждого образца или комбинации и не менее 30 четких пластинок с растения на стадии метафазы I (MI).

Фитопатологические оценки были выполнены в лаборатории (на стадии проростков) и в поле (на стадии взрослых растений) по интенсивности поражения растений с помощью интегрированной 9-балльной шкалы СЭВ согласно методическим рекомендациям (Методы селекции ..., 1988). Баллы соответствовали интенсивности поражения в процентах: 1 – 100, 4 – 40, 5 – 25, 6 – 15, 7 – 10, 8 – 5, 9 – 0. Оценку устойчивости к мучнистой росе проводили также в фазе всходов в поле поздней осенью, до наступления морозов, по интенсивности поражения отдельного листа. Устойчивость к листовой и стеблевой ржавчине оценивали на фоне природных популяций патогенов, а также на искусственном инфекционном фоне. При этом как в лаборатории, так и при искусственном заражении в поле использовалась смесь популяций рас патогенов, наиболее распространенных в условиях Одессы. Все фенотипические учеты были сделаны в полевых условиях в фазе колошения и цветения. Опушение отмечалось при рассмотрении с помощью увеличительного стекла колосковых чешуек, верхней и нижней поверхности листовой пластинки, края листа у его основания. Аббревиатура генов устойчивости и морфологических признаков приводится в соответствии с каталогом символов генов McIntosh с соавт. (2008).

Общая геномная ДНК была выделена из листового материала взрослых растений и проростков с применением CTAB-буфера, как описано в методике (Использование ПЦР …, 1998). С учетом происхождения линий (в родословной был сорт Аврора), наличия устойчивости к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине, а также картин мейоза (наличие спутника у одного из унивалентов в MI мейоза у гибридов F_1 от тест-кроссов) в материале предполагалось присутствие транслокации 1BL.1RS или замещения (1B)1R. Поэтому, а также в связи с известным расположением нескольких целевых генов следующие молекулярные маркеры

были выбраны для идентификации: микросателлитные маркеры ржи REMS1303, SR1R003 (Landjeva *et al*., 2006), секалин-специфичный STS-маркер –*ω-sec*-P3+*ω-sec*-P4 (Chai *et al*., 2006) и микросателлитные маркеры пшеницы: GWM18 (1BS) (Röder *et al*., 1998), TAGLUT (1AS) (Devos *et al*., 1995).

ПЦР проводили при использовании термоциклера «Tercik» (Россия), продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 10 %-м ПААГ как описано Сударчук с соавт. (2010). Размеры фрагментов были вычислены при сопоставлении с маркером молекулярной массы pUC 19/ MspI.

Присутствие хромосомных замещений и транслокаций в кариотипе линий было установлено цитологически по мейотическим конфигурациям в метафазе I (MI) гибридов F_1. Присутствие хромосомы 1RS было установлено по наличию продуктов микросателлитных маркеров ржи и секалин-специфичного STS-маркера. Причем результаты их анализа были суммированы, отсутствие продуктов амплификации по микросателлитному локусу *Xgwm18-1BS* также свидетельствовало в пользу замещения 1B на 1R.

Результаты и обсуждение

Изучение мейоза в MI у интрогрессивных линий, а также у гибридов F_1 (E200/97-2 × H242/97-2, H242/97-1 × H242/97-2, OH232/03 × H242/97-2 и H273/97 × H274/97) выявило часто встречаемую высшую ассоциацию хромосом – $21^{II}_{З}$ у всех 42-хромосомных растений P_1, P_2 и F_1 и, следовательно, гомогенность и идентичность геномного состава обеих групп линий. Исследование мейоза в MI у гибридов F_1 от тест-кросса с Од.267 выявило $2n = 42$ у большинства изученных растений и часто встречаемую высшую ассоциацию хромосом $19^{II}_{З}+1^{II}_{О}+2^{I}$ в комбинации Од.267 × H74/90-245, а также $19^{II}_{З}+2^{II}_{О}$ в комбинации Од.267 × H74/90-258 (табл. 1). Что касается оригинальных интрогрессивных линий, 20 закрытых бивалентов и 1 открытый бивалент (рис., а) наблюдались в виде высшей ассоциации в МКП гибридов F_1 между Од.267 и линиями E200/97-2, E217/97 (некоторые растения), H242/97-1, H242/97-2 и OH232/03. Следовательно, в кариотипе этих линий присутствует хромосома с транслокацией. У линии E217/97 эта же транслокация находится в гетерозиготном состоянии. Об этом свидетельствует

Таблица 1

Происхождение и результаты ПЦР-анализа изученных линий, а также высшие ассоциации хромосом (ВАХ) в MI мейоза их гибридов F_1 с Од.267

Материал	Происхождение	ВАХ[b]	1RS-маркеры[c]	*Xgwm18* 1BS	*Taglut* 1AS
Од.267	сорт (тестер)	$21^{II}_{З}$	–	186 [d]	126
Коллекционные линии					
H74/90-245	Tom Pouce Blanc × АД (*T. timopheevii*/ *Ae. tauschii*) × Аврора × Rusalka	$19^{II}_{З}+1^{II}_{О}+2^{I}$	+	–	137
H74/90-258		$19^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+	–	134
Первичные интрогрессивные линии F_{∞}					
E200/97-2[a]	АД825 × Черномор × (H74/90-245 или H74/90-258)	$20^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+	–	135
E217/97		$21^{II}_{З}$ или $20^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+/–	182,188	131
H242/97-1		$20^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+	–	128
H242/97-2	– « –	$20^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+	–	128
H273/97	АД825 × Черномор	$19^{II}_{З}+1^{II}_{О}+2^{I}$	+	–	128
H274/97	– « –	$19^{II}_{З}+1^{II}_{О}+2^{I}$	+	–	128
OH232/03	Од.267 × H74/90-258	$20^{II}_{З}+1^{II}_{О}$	+	–	131

[a] H – Hostianum, E – Erythrospermum. [b] Нижние индексы: $_{З}$ – закрытые биваленты, $_{О}$ – открытые биваленты. [c] REMS1303, SR1R003, *ω-sec*-P3+*ω-sec*-P4; + присутствие продуктов праймера, – отсутствие продуктов праймера. [d] Размер фрагмента (п.н.).

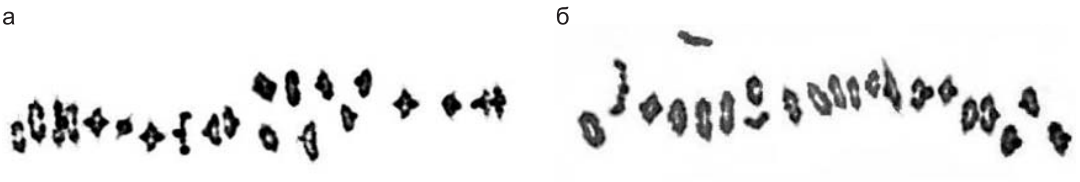


Рис. Высшие ассоциации хромосом в MI мейоза гибридов F_1 от скрещивания Од.267 с (а) линией Е200/97-2: $20^{II}_3+1^{II}_O$; (б) линией Н273/97: $19^{II}_3+1^{II}_O+2^{I}$.

сравнительно регулярный мейоз (21^{II}_3 высшая ассоциация и высокий уровень конъюгации), который наблюдался у части растений F_1 в тесткроссе Од.267 × Е217/97, а также у остальных растений в комбинации Е217/97 × Н242/97-2.

У гибридов F_1 (Н273/97 или Н274/97 × Од.267) независимо от линии обнаружено $19^{II}_3+1^{II}_O+2^{I}$ в виде высшей ассоциации (табл. 1, рис., б). В одной клетке наблюдалось $20^{II}_3+2^{I}$. При этом унивалентные хромосомы не конъюгировали между собой ни в одной из 322 изученных клеток, что свидетельствует о наличии у линий Н273/97 и Н274/97 пшенично-ржаного замещения. Иногда у одного из унивалентов отмечали наличие спутника. Очевидно, этот унивалент был представлен недостающей хромосомой пшеницы (1В или 6В), унаследованной с отцовской гаметой. Кроме замещения, у линий Н273/97 и Н274/97, видимо, присутствует структурная хромосомная перестройка, затрудняющая конъюгацию гомологичных хромосом у гибридов указанных линий с пшеницей (табл. 1). Практически полное отсутствие мультивалентов у линий и у гибридов F_1 указывает на отсутствие реципрокной транслокации, затрагивающей гомеологичные хромосомы пшеницы. У гибридов F_1 (Н273/97 или Н274/97 × Н242/97-2) высшая ассоциация хромосом в MI мейоза составляла $20^{II}_3+1^{II}_O$. Это позволило предположить наличие гомологии между интактной ржаной хромосомой, заместившей пшеничную, и ржаным сегментом транслокации.

Присутствие хромосомы 1RS у оригинальных интрогрессивных и коллекционных линий было установлено по наличию продуктов маркеров REMS1303, SR1R003, *ω-sec*-P3 + *ω-sec*-P4. Отсутствие ПЦР-продуктов по локусу *Xgwm18* (1BS) позволило идентифицировать 1В хромосомное замещение или транслокацию. Детекция ПЦР-продуктов маркера *Taglut* доказывает присутствие хромосомы 1А у всех изученных линий и свидетельствует в пользу замещения именно хромосомы 1В.

Таким образом, интрогрессивные и коллекционные линии, изученные в настоящем исследовании, имеют замещение хромосомы 1В пшеницы на хромосому 1R ржи или транслокацию 1BL.1RS (табл. 1). Это установлено цитологически и подтверждено с помощью ПЦР-маркеров. По нашему мнению, линиям Е200/97-2, Н242/97-1, Н242/97-2 и ОН232/03 транслокация была передана от коллекционных линий Н74/90-245 и Н74/90-258, куда она попала от сорта Аврора при отборе на устойчивость к видам ржавчины. Следовательно, короткое плечо хромосомы 1R происходит от сорта ржи Petkus. В то же время интактная хромосома 1R, характеризующая кариотип замещенных линий (Н273/97 и Н274/97), передана через тритикале (8х) АД825 и, следовательно, происходит от сорта ржи Воронежская СХИ. Известно, что такие перекомбинации хромосом иногда случаются при скрещиваниях пшеницы с рожью и тритикале (Bartoš, 1993).

Возможность рекомбинации между короткими плечами хромосом 1R и 1В не обсуждается в литературе. Только использование *ph*-мутантов позволило индуцировать аллосиндез (Koebner, Shepherd, 1986). В настоящем исследовании не наблюдалось ни одного случая конъюгации между интактными хромосомами 1R и 1В в комбинациях Н273/97 × Од.267 и Н274/97 × Од.267. И напротив, 21 закрытый бивалент был обнаружен в 3 мейотических МКП из 894 (0,3 %), изученных у гибридов F_1 от скрещивания Од.267 с интрогрессивными линиями Е200/97-2, Е217/97 (растения с транслокацией 1BL.1RS), Н242/97-1 и Н242/97-2. Эта же конфигурация была отмечена в 2 из 801 (0,2 %) МКП, изученных у гетерозиготных по транслокации гибридов F_1 Е217/97 (растения без транслокации) × Н242/97-2 (Motsnyy, 2004).

Следовательно, транслокация 1BL.1RS интрогрессивных линий может конъюгировать с хромосомой 1BS, хотя это явление наблюдается слишком редко для рекомбинации. Полученные результаты противоречат литературным данным (Рибалка и др., 2007) об отсутствии конъюгации телоцентрика 1BS сорта Chinese Spring с транслокацией 1BL.1RS сорта Кавказ.

В зависимости от структуры кариотипа интрогрессивные линии существенно различаются по устойчивости к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине, а также по наличию морфологических признаков – опушения колоса или листьев (табл. 2). Линии Е200/97-2, Н242/97-1, Н242/97-2, Н74/90-245 и Н74/90-258, содержащие транслокацию 1BL.1RS от сорта Аврора, показали высокую устойчивость ко всем изученным болезням, что отчасти детерминировано генным кластером *Pm8*, *Yr9*, *Lr26* и *Sr31*, тогда как сорт Од.267 был восприимчив. В отдельные годы линии Н273/97 и Н274/97 были умеренно устойчивы к мучнистой росе, умеренно поражались стеблевой ржавчиной (3–5 баллов), что, видимо, обусловлено варьированием расового состава и интенсивности естественного фона болезней. Наличие умеренной устойчивости может быть связано с присутствием ржаной замещенной хромосомы от тритикале АД825, так как взаимодействие пшеничных и ржаных хромосом часто сопровождается устойчивостью к мучнистой росе и стеблевой ржавчине. Каких-либо иных эффективных генов устойчивости к исследованным болезням данная хромосома явно не содержит, что проявилось в высокой восприимчивости линий к листовой ржавчине (2–3 балла). Линия Е217/97 проявляла умеренную устойчивость к мучнистой росе на стадии взрослых растений, а линия ОН232/03 была умеренно восприимчива к стеблевой ржавчине.

При анализе опушения листовой пластинки интрогрессивные линии Е217/97, Н273/97 и Н274/97 были определены как неопушенные, а Од.267 – со слабым опушением на верхней поверхности листа. Обнаружено, что линии Е200/97-2, Н242/97-1 и Н242/97-2 так же, как и коллекционные сестринские линии Н74/90-245 и Н74/90-258, имеют опушение на верхней и

Таблица 2

Устойчивость к болезням (в баллах) и наличие морфологических признаков у интрогрессивных линий

Материал	Мучнистая роса			Листовая ржавчина			Стеблевая ржавчина	Морфологические признаки	
	Проростки		Взрослые (поле)	Проростки (лаб.)	Взрослые (поле)				
	Лаб.	Поле			Ест.	Иск.	Взрослые (поле)	Hg	Hl
Од.267	3	3	3	3	3	1	3–4	–	+
Коллекционные сестринские линии									
Н74/90-245	6	7	9	6	6–9	8	8	–	++
Н74/90-258	6	8	8	6	7–9	8	8–9	+	++
Интрогрессивные линии F_∞									
Е200/97-2	3(6)	7(6)	8(5)	7(6)	8	8(6)	7–9	–	++
Е217/97	3	4	5–6	2	3	2	2	–	+
Н242/97-1	6	7	7	6	8	7	7–9	+	++
Н242/97-2	6	7	6	6	8	7	7–9	+	++
Н273/97	4	6	4–7	2	3–4	2	3–5	+	–(+)
Н274/97	4	4	4	2	3–4	2	3–5	+	–
ОН232/03	6	5	8	6	8	7	4–6	–	–

Лаб. – лабораторные данные; Ест. – естественная эпифитотия; Иск. – искусственный инфекционный фон; + слабое опушение листа сверху; ++ опушение листа сверху, снизу и по краю листовой пластинки; – нет опушения; + линия гетерогенная; Hg – опушение колосковых чешуй; Hl – опушение листовых пластинок.

нижней поверхности, а также по краю листовой пластики у ее основания. Это опушение листа унаследовано от АД (*T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss) и, следовательно, происходит от одной из его составных. Интрогрессивные линии разновидности *Hostianum* имеют короткое редкое опушение колоса, которое было унаследовано от сорта Гостианум 237 – одной из составных тритикале АД825. Это опушение контролируется известным геном *Hg1*, присутствующим у некоторых сортов пшеницы (McIntosh *et al*., 2008). Линии разновидности *Erythrospermum* были, соответственно, неопушенные.

Таким образом, использование цитологического и молекулярно-генетического анализа позволило идентифицировать замещение хромосомы 1B пшеницы на хромосому 1R ржи и транслокацию 1BL.1RS у оригинальных интрогрессивных линий. При этом с очень низкой частотой наблюдалась конъюгация между короткими плечами транслокации 1BL.1RS и интактной хромосомы 1B мягкой пшеницы. У интрогрессивных линий разновидности *Hostianum* имеется короткое редкое опушение колоса, которое контролируется геном *Hg1* и происходит от сорта Гостианум 237. Несколько линий имеют опушение сверху, снизу и по краю листовой пластинки, которое передано от АД (*T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss) и, предположительно, происходит от *Ae. tauschii*.

Литература

Бадаев Н.С., Бадаева Е.Д., Максимов Н.Г. и др. Изменение хромосом ржи в кариотипе тритикале // Докл. АН СССР. 1982. Т. 267. № 4. С. 953–956.

Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях / Под ред. Ю.М. Сиволапа. Киев: Аграрна наука, 1998. С. 8–33.

Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ / Л.Т. Бабаянц, А. Мештерхази, Ф. Ветхер и др. Прага, 1988. 321 с.

Моцный И.И., Благодарова Е.М. Наследование устойчивости к болезням и морфологических признаков у гибридов мягкой пшеницы с интрогрессивными линиями // Сб. науч. тр. СГИ-НАЦ СС. Одесса, 2004. Вып. 6 (46). С. 179–193.

Моцный И.И., Коваль Т.Н., Лыфенко С.Ф. Наследование морозо- зимостойкости отдаленными гибридами пшеницы с амфиплоидами // Цитология и генетика. 2000а. Т. 34. № 6. С. 9–20.

Моцный И.И., Лыфенко С.Ф., Коваль Т.Н. Наследование признаков устойчивости к грибным болезням отдаленными гибридами пшеницы с амфиплоидами // Цитология и генетика. 2000б. Т. 34. № 2. С. 46–56.

Паушева Э.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1980. 304 с.

Рибалка О., Литвиненко М., Червоніс М., Топораш І. Поставимо останню крапку в дискусії навколо тритикале сорту Житниця // Зерно і хліб. 2007. № 2 (46). С. 35–37.

Сударчук Л.В., Чеботарь С.В., Рыбалка А.И., Сиволап Ю.М. Детекция модифицированной транслокации 1RS.1BL с помощью молекулярных маркеров в селекционном материале мягкой пшеницы // Вестник Одесского гос. ун-та (биология), Одесса. 2010. Т. 15. Вып. 6. С. 39–47.

Bartoš P. Chromosome 1R of rye in wheat breeding // Plant Breeding Abstr. 1993. V. 63. P. 1203–1211.

Chai J.F., Zhou R.H., Jia J.Z., Liu X. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations // Plant Breeding. 2006. V. 125. P. 302–304.

Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J. *et al.* Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 90. P. 247–252.

Koebner R.M.D., Shepherd K.W. Controlled introgression to wheat from rye chromosome arm 1RS by inducing allosyndesis // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 73. P. 197–208.

Landjeva S., Korzun V., Tsanev V. *et al*. Distribution of the wheat-rye translocation 1BL.1RS among bread wheat varieties of Bulgaria // Plant Breeding. 2006. V. 125. P. 102–104.

Lelley T., Eder C., Grausgruber H. Influence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction // J. Cer. Sci. 2004. V. 39. P. 313–320.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al*. Catalogue of gene symbols for wheat // Proc. 11th Int. Wheat Genet. Symp. Brisbane, Qld Australia, 24–29 August, 2008. KOMUGI, Integrated wheat Sci. Database: http//www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/ top/

Motsnyy I.I. Inheritance of alien characteristics in hybrids between *T. aestivum* and wheat introgression lines // Annu. Wheat Newslett. (Kansas State Univ.). 2004. V. 50. P. 178–180.

Röder M.S., Korzun V., Wendehake K. *et al*. A microsatellite map of wheat // Genetics. 1998. V. 149. P. 2007–2023.

IDENTIFICATION OF A (1B)1R SUBSTITUTION AND 1BL.1RS TRANSLOCATION IN WINTER WHEAT INTROGRESSION LINES BY CYTOGENETIC AND MOLECULAR METHODS

I.I. Motsnyy[1], S.V. Chebotar[2], L.V. Sudarchuk[2], A.V. Galaev[2], Yu.M. Sivolap[2]

[1] Plant Breeding and Genetics Institute, Odessa, Ukraine, e-mail: motsnyyii@gmail.com;
[2] South Plant Biotechnology Center UAAS, Odessa, Ukraine

Summary

The (1B) 1R wheat-rye chromosome substitution and 1BL.1RS translocation have been identified in original introgression stocks using cytological and molecular marker analysis. The pairing between short arms of chromosomes 1BL.1RS and bread wheat chromosome 1B is observed at a very low frequency (in 0,2–0,3 % of pollen mother cells). The translocation stocks are resistant to leaf and stem rusts, and the substitution stocks are susceptible because of the different origins of the chromosomes 1R involved in the translocation or substitution. The *Hg1* gene for glume hairiness, inherited from cv. Hostianum 237, has been detected in some introgression stocks. Several stocks show hairiness on the leaf upper surface, lower surface and leaf margin. The character, probably originating from *Ae. tauschii*, was inherited from the synthetic wheat *T. timopheevii* Zhuk./*Aegilops tauschii* Coss.

Key words: *Triticum aestivum*, cytogenetic analysis, (1B)1R substitution, 1BL.1RS translocation, rust resistance, DNA markers.

УДК 631.52:604.6:577.214.625:633.11:004.65

ПРОМОТОРЫ ПШЕНИЦЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ

© 2012 г. **О.Г. Смирнова, А.В. Кочетов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: planta@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 14 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

Проведение экспериментов в области молекулярной генетики растений часто требует применения методов генной инженерии, в том числе использования трансгенных растений. Представлены данные о промоторах генов пшеницы с экспериментально проверенным паттерном экспрессии, аннотированных в базе данных TGP (TransGene Promoters). База TGP может быть использована в качестве источника информации при планировании генно-инженерных экспериментов различной направленности.

Ключевые слова: промоторы, пшеница, трансгенные растения, базы данных.

Введение

Промотор определяет пространственно-временной спектр и уровень экспрессии трансгена, находящегося под его контролем. В настоящее время при трансформации однодольных растений наиболее часто используется конститутивный промотор гена убиквитина (*Ubi*) кукурузы. Много усилий в последнее время прилагается для поиска более эффективных промоторов. Тканеспецифичная или регулируемая экспрессия трансгенов привлекательна для предотвращения потерь энергии, затрачиваемой растением на ненужное накопление трансгенного продукта, а также для предотвращения возможных побочных эффектов трансгенного продукта на растение. К настоящему времени в базе данных GenBank представлено более 500 нуклеотидных последовательностей промоторных районов различных генов пшеницы. Около 50 промоторов уже были проверены на функциональность в однодольных (пшеница, рис, ячмень, кукуруза, рожь) и двудольных (табак, арабидопсис, капуста, люцерна, огурец, томат, перец) видах. Важно отметить, что один и тот же промотор может обеспечивать различные паттерны экспрессии трансгена в разных видах растений. Активность промоторов изучают с использованием репортерных генов. В трансгенной конструкции репортерный ген располагается сразу за промотором, и количество нарабатываемого репортерным геном продукта коррелирует с активностью промотора. Как правило, при изучении активности промоторов пшеницы использовали ген фермента β-глюкуронидазы из *Escherichia coli*. В ряде случаев был использован ген зеленого флюоресцентного белка медузы *GFP*. В данной статье представлен обзор промоторов пшеницы, использованных в генетической инженерии растений. Представлены тканеспецифичные промоторы из семян, корней, пыльцы, репродуктивных органов, фотосинтетических тканей, эпидермиса пшеницы, а также промоторы, индуцируемые при абиотическом и биотическом стрессе. Приведены примеры и возможности целевого использования промоторов пшеницы для экспрессии трансгенов у растений.

Тканеспецифичные промоторы пшеницы

Эндосперм пшеницы является главным источником энергии и белков для большой части людей и домашних животных. Белки клейковины составляют около 80 % белков муки. Значительная часть тканеспецифичных промоторов пшеницы принадлежит генам запасных белков и других белков семян. Промоторы генов, кодирующих 1Dx5 и 1Bx17 субъединицы высокомолекулярного запасного белка глютенина, проявляют специфическую активность в эндосперме трансгенной пшеницы (Lamacchia *et*

al., 2001; Oszvald *et al.*, 2008a, b). Короткий фрагмент промотора TaHMWGlu1Bx17 (173 п.о.), связанный с первым интроном гена актина риса, имеет такой же уровень экспрессии, как и длинный 1890 п.о. TaHMWGlu1Bx17-промотор без интрона (Oszvald *et al.*, 2008a). Генетическая трансформация обеспечивает изменение состава зерна пшеницы за счет экспрессии новых генов или за счет снижения уровня нежелательных белков. Недостатком некоторых белков клейковины, таких, как α- и γ-глиадины, является способность вызывать повреждение ворсинок тонкой кишки и приводить к заболеванию целиакии. Много исследований направлено на улучшение качества зерна пшеницы. Промоторы α- и γ-глиадинов могут быть хорошими кандидатами для снижения уровня нежелательных глиадинов у пшеницы, экспрессируя в эндосперме соответствующие антисмысловые РНК (Van Herpen *et al*., 2008; Piston *et al*., 2009).

Белки пуроиндолины PinA и PinB определяют текстуру и мукомольные качества зерна пшеницы. Пуроиндолины были использованы для изменения текстуры зерна пшеницы, риса, кукурузы. У пшеницы промоторы пуроиндолинов активны только в эндосперме (Wiley *et al*., 2007). В семенах трансгенного риса, наряду с эндоспермом, промоторы пуроиндолинов проявляли активность в алейроновом слое и в клетках эпидермиса. Промотор PinA был также активен в эмбрионе, корнях проростков, листьях, сосудистых тканях цветковых чешуй и пыльце риса. Активность промотора PinA возрастала в листьях риса при механическом повреждении и заражении патогеном (Evrard *et al*., 2007). В трансгенных пшенице и ячмене TdPR60 промотор проявлял наибольшую активность в транспортных клетках эндосперма, в то время как у риса промотор TdPR60 был активен внутри эндосперма на ранних стадиях налива зерна (Kovalchuk *et al*., 2009).

Промоторы генов гистонов проявляют активность в тканях меристем и могут быть использованы для изучения влияния на клеточный цикл митогенов и стрессовых воздействий (Terada *et al.*, 1993; Ito *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1995; Huh *et al.*, 1997; Taoka *et al.*, 1998; Bilgin *et al.*, 1999). Сильная конститутивная активность промотора глутатионтрансферазы GstA1, сшитого с интроном гена *TaWIR1a*, наблюдалась в эпидермисе трансгенной пшеницы и ячменя (Altpeter *et al.*, 2005; Himmelbach *et al.*, 2007). Специфическая активность в эпидермисе может быть использована для экспрессии защитных белков, направленных против патогенной атаки. Промотор гена, специфичного для пыльцы белка PSG719, проявляет активность исключительно на поздних стадиях созревания пыльцы у трансгенного табака. Промотор может быть использован в сельском хозяйстве при создании форм с мужской стерильностью (Chen *et al.*, 2010). В трансгенном арабидопсисе промотор гена цитокининоксидазы/дегидрогеназы CKX2.1 преимущественно экспрессируется в репродуктивных органах и в сосудистых тканях семядолей и листьев розетки. На стадии взрослого растения активность промотора не наблюдается в листьях, стеблях и корнях (Zhang *et al.*, 2011). Промотор гена фруктозо-1,6-бифосфатазы FBPase имеет высокую активность в фотосинтетических тканях, меристемах побегов, латеральных почках и корнях трансгенного табака. Этот промотор был использован для наработки и изучения влияния вирусных белков на транспорт макромолекул между клетками (Lloyd *et al.*, 1991; Peleg *et al.*, 2007). Фрагмент промотора гена хлорофилл a/b связывающего белка Cab1 размером 268 п.о. функционирует как светочувствительный энхансер в фотосинтетических тканях трансгенного табака (Nagy *et al.*, 1987; Fejes *et al.*, 1990).

Кислые почвы снижают продуктивность растений из-за высокой концентрации в них растворимых катионов аллюминия, ингибирующих рост корней. Устойчивость пшеницы к $Al^{(3+)}$ коррелирует с экспрессией гена транспортера малата TaALMT1, который высвобождает анионы малата из кончиков корней. Анионы малата защищают чувствительные зоны роста корней, связываясь с $Al^{(3+)}$ в апопласте. Изучение трансгенных растений риса позволило установить, что тандемно повторенные элементы в аллельных вариантах промоторов гена TaALMT1 усиливают экспрессию (Ryan *et al.*, 2010). Данное исследование является примером того, как идеальные тандемные повторы в промоторных районах связаны с регуляцией транскрипции и фенотипическими изменениями в контексте эволюционной адаптации к основным абиотическим стрессам (табл.).

Таблица

Экспрессия промоторов пшеницы в трансгенных растениях

Промотор и его размер (п.о.)	Тканеспецифичная активность промотора и его регуляторы	Объект трансгенеза. Литературный источник
TaHMWGlu1Dx5 (1249), TaHMWGlu1Bx17 (1890) (HMW Glutelin)	Эндосперм	Пшеница, рис, ячмень (Lamacchia *et al*., 2001; Oszvald *et al*., 2008a, b)
TaLMWGlu1D1 (968, 356) (LMW Glutelin)	Эндосперм	Табак (Colot *et al*., 1987) Пшеница (Stoger *et al*., 1999, 2001)
γ-Gliadin (900)	Эндосперм	Пшеница (Piston *et al*., 2009)
α-Gliadin (592)	Эндосперм, алейрон	Пшеница (Van Herpen *et al*., 2008)
TaPinA (1214) (Puroindoline A)	Эндосперм. Индуктор – патоген, поранение	Пшеница, рис (Wiley *et al*., 2007; Evrard *et al*., 2007)
TaPinB (1063) (Puroindoline B)	Эндосперм	Пшеница, рис (Wiley *et al*., 2007; Evrard *et al*., 2007)
TdPR60 (2147) (Lipid transfer protein)	Зерно. Транспортные клетки эндосперма	Пшеница, ячмень, рис (Kovalchuk *et al*., 2009)
Ltp7.1a (748), Ltp7.2a, (1440), Ltp9.1a (1393), Ltp9.2d (1260), Ltp9.3e (827), Ltp9.4a (846) (Lipid transfer protein)	Щиток, эпикарпий, сосудистые ткани листьев, корней, цветов	Рис (Boutrot *et al*., 2007)
TaLtp1 (988) (Lipid transfer protein)	Семядоли, гипокотиль, молодые листья, цветы	Арабидопсис (Wang *et al*., 2010)
TH315 (845, 202) (Histone H1)	S-фаза клеточного цикла	Рис, табак (Taoka *et al*., 1998)
TH254 (1175), TH274, (1830) (Histone H2A)	S-фаза клеточного цикла. Проростки, цветы	Табак (Huh *et al*., 1997)
TH123 (1631) (Histone H2B)	Меристемы корней, листьев и цветов	Табак (Yang *et al*., 1995)
TaHistone H3 (1768)	Меристемы побегов, корней, молодые листья, цветы	Рис, табак (Terada *et al*., 1993; Ito *et al*., 1995)
TaHistone H4 (720)	S-фаза клеточного цикла. Регуляторы – ауксин и абсцизовая кислота	Кукуруза (Bilgin *et al*., 1999)
TaGstA1 (2295) (Glutathione S-transferase)	Эпидермис	Ячмень (Himmelbach *et al*., 2007) Пшеница (Altpeter *et al*., 2005; Schweizer, 2008)
TaPSG719 (1019) (Pollen-specific protein)	Пыльца	Табак (Chen *et al*., 2010)
TaCKX2.1 (1353) (Cytokinin oxidase)	Цветы, ткани сосудов	Арабидопсис (Zhang *et al*., 2011)
TaCab1 (843) (Chlorophyll a/b-binding protein)	Фотосинтетические ткани. Индуктор – свет	Табак (Nagy *et al*., 1987, Fejes *et al*., 1990)
TaFBPase (1673) (Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase)	Фотосинтетические ткани и меристемы	Табак (Lloyd *et al*., 1991)
TaGermin (1160) (Oxalate oxidase)	Индуктор – Cd, Cu, Co, поранение, вирус табачной мозаики	Табак (Berna, Bernier, 1999)
TaAIDFa (2730) (Dehydration responsive element-binding factor a)	Индуктор – засуха, соль, холод, абсцизовая кислота	Пшеница (Xu *et al*., 2008)

Окончание таблицы

Промотор и его размер (п.о.)	Тканеспецифичная активность промотора и его регуляторы	Объект трансгенеза. Литературный источник
Wdhn13 (1098), Wrab17 (1806), Wrab18 (928), Wrab19 (831) (Cor/Lea proteins)	Индуктор – засуха, холод, абсцизовая кислота	Табак (Kobayashi *et al*., 2008) Пшеница (Egawa *et al*., 2006)
Wcor15 (1700) (Chloroplast-targeted cold-responsive protein)	Листья. Индуктор – свет, холод	Табак (Takumi *et al*., 2003)
Wcs120 (941) (Cold acclimation protein)	Листья. Индуктор – свет, холод	Пшеница, ячмень, рис, рожь, капуста, люцерна, огурец, томат, перец (Ouellet *et al*., 1998)
TaEm (646) (Early methionine protein)	Семена (эмбрион, алейрон). Индуктор – абсцизовая кислота	Табак (Marcotte *et al*., 1989) Ячмень, рис, пшеница (Furtado, Henry, 2005)
TdPRPI-1 (1821), TdPRPI-10 (3127), TdPRPI-11 (3012) (Defensin)	Завязь. Индуктор – поранение	Рис, пшеница (Kovalchuk *et al*., 2010)
TaPT2 (579), TaPT2-1 (1744) (Phosphate transporter)	Корни. Индуктор – фосфорное голодание	Арабидопсис, пшеница (Tittarelli *et al*., 2007) Табак (Cui *et al*., 2011)
TaPHT1.2 (1302) (Phosphate transporter)	Корни. Индуктор – Fe, S, фосфорное голодание, сахароза, глюкоза. Репрессор – ауксин, цитокинин, азот	Арабидопсис (Miao *et al*., 2009)
TaALMT1-I (1117), TaALMT1-V (1677), TaALMT1-VI (1527) (Malate transporter)	Корни	Рис (Ryan *et al*., 2010)

Индуцируемые промоторы пшеницы

У пшеницы выделен целый ряд промоторов, которые индуцируются при стрессе, вызванном абиотическими и биотическими факторами. Преимущество этих промоторов перед тканеспецифичными заключается в том, что они активны лишь в определенный период времени, после воздействия индуктора. Активность индуцируемых промоторов зависит от дозы индуктора и возвращается к исходному уровню после прекращения воздействия. Меняя количество регулятора, можно контролировать время и интенсивность синтеза трансгена.

Следует отметить значительное внимание исследователей к изучению промоторов пшеницы, чувствительных к неблагоприятным условиям среды (табл.). Активность промотора гена оксалат оксидазы TaGermin усиливается при воздействии на проростки солей тяжелых металлов и поранении (Berna, Bernier, 1999). Активность промотора TaAIDFa становится выше в условиях засухи, низких температур, засоления и при обработке абсцизовой кислотой (Xu *et al.*, 2008). Активность промоторов *Cor/Lea*-генов (cold-responsive/late-embryogenesis-abundant) *Wdhn1*3, *Wrab17*, *Wrab18* и *Wrab19* возрастает при воздействии холода, засухи и абсцизовой кислоты (Egawa *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2008). Активность промотора гена *Wcor15* увеличивается в листьях при низких температурах исключительно на свету (Takumi *et al.*, 2003). Промотор гена *Wcs120* индуцируется низкими температурами у зерновых (пшеница, ячмень, рис и рожь), крестоцветных (капуста), бобовых (люцерна) и тыквенных (огурец), но не в семействе пасленовых (томат, перец) (Ouellet *et al.*, 1998). Изучение активности промотора Wcs120 у большого числа видов позволило прийти к выводу, что у однодольных и двудольных растений существуют транскрипционные факторы, способные узнавать цис-элементы гетерологичных промоторов, индуцируемых холодом. Чувствительность к

холоду у некоторых видов (таких, как рис или огурец) связана не с отсутствием или неэффективностью транскрипционных факторов, а с неэффективностью промоторов генов, гомологичных *Wcs120*. Использование промоторов *Cor/Lea*-генов также может обеспечить экспрессию целевых генов при воздействии на растения низких температур. Значительно меньше исследований было посвящено изучению промоторов пшеницы, обеспечивающих устойчивость к патогенам. Лишь два промотора, TaGermin и TaPinA, повышали устойчивость к вирусу табачной мозаики и *Magnaporthe grisea* соответственно у трансгенного табака и риса (Berna, Bernier, 1999; Evrard *et al.*, 2007).

Промоторы PRPI из *Triticum durum* активны в завязях трансгенных растений пшеницы и риса. Во время прорастания семян риса работа промоторов отмечалась в эмбрионах, корнях и колеоптилях. Промоторы индуцировались при механическом повреждении в листьях, стеблях и зерне трансгенных растений риса. Промоторы PRPI могут быть использованы для специфического накопления белков, обеспечивающих устойчивость к патогенам, в уязвимых тканях развивающегося и прорастающего зерна (Kovalchuk *et al.*, 2010).

При фосфорном голодании промоторы генов фосфатных транспортеров PT2, PT2-1 и PHT1.2 обеспечивают повышенную экспрессию репортерного гена в корнях пшеницы, арабидопсиса и табака. Сахар, Fe, S, N, цитокинин и ауксин влияют на активность промотора PHT1.2 (Tittarelli *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2009; Cui *et al.*, 2011). Повышение активности этих промоторов может служить сигналом о низком уровне фосфора. Индуцируемые промоторы пшеницы могут быть использованы в качестве инструмента для создания растений-индикаторов окружающей среды и растений, устойчивых к неблагоприятным абиотическим и биотическим воздействиям.

Представление данных о промоторах в базе TGP

Информация о размерах промотора, нуклеотидной последовательности, паттерне транскрипции и регуляторах, влияющих на активность промоторов пшеницы, более детально может быть представлена в формате базы данных TGP (TransGene Promoters) (http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/dbases/tgp/home.html) (рис.).

База TGP накапливает информацию о конститутивных, тканеспецифичных и индуцибельных

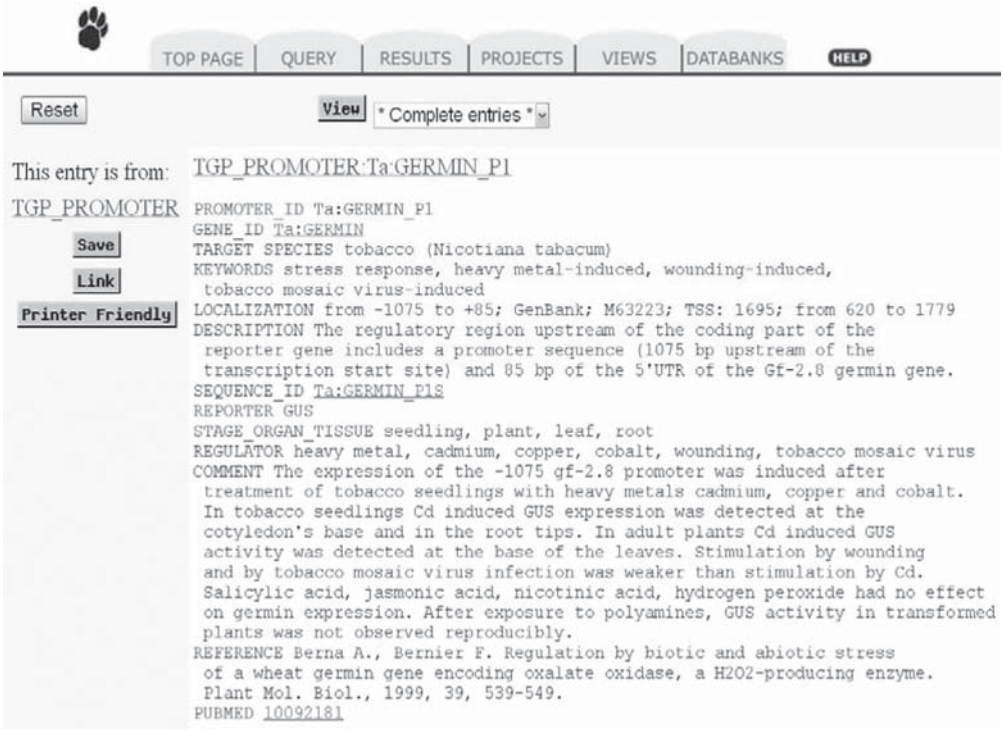


Рис. Представление данных о промоторе гена гермина пшеницы в базе TGP.

промоторах, активность которых была охарактеризована в трансгенных растениях (Smirnova *et al.*, 2011). Все промоторы в базе TGP сопровождаются ссылками на соответствующие публикации. Информация о промоторе также включает ссылку на базу последовательностей GenBank, позиции промотора относительно старта транскрипции или трансляции в этой ссылке. Приводится название вида растений, использованных для трансгенеза.

Информация о промоторе в базе TGP сопровождается информацией о соответствующем ему гене. Дается информация о названии гена и его продукта, что очень важно для точной идентификации промотора этого гена. Представлена информация об экспрессии гена, что позволяет сравнивать уровень активности и тканевую специфичность промотора в естественном состоянии и в чужеродной среде. Интерфейс базы TGP позволяет проводить поиск промоторов с определенными характеристиками. Представление промоторов пшеницы в базе TGP дает возможность выбрать стадио-, тканеспецифичный, конститутивный или индуцибельный промотор для выполнения различных экспериментальных задач. Исследователь может быстро получить последовательность выбранного промотора, а также характеристику экспрессии исходного гена, которому принадлежит выбранный промотор. Эти данные могут быть использованы для дизайна генетических конструкций при проведении фундаментальных и биотехнологических исследований.

Использование промоторов пшеницы для наработки целевых продуктов

Промотор глютелина TaLMWGlu1D1 (от –326 до +30) в комбинации с Ubi-1 интроном кукурузы был использован для наработки LegA субъединицы легумина гороха в зерновке трансгенной пшеницы. Были показаны успешный процессинг трансгенных полипептидов и образование LegA гексамеров *in vivo* (Stoger *et al.*, 2001). Для повышения уровня каротиноидов в зерне была создана трансгенная элитная пшеница, в эндосперме которой экспрессия гена фитоенсинтазы кукурузы *PSY1* протекала под контролем специфичного для эндосперма промотора пшеницы HMWGlu1Dx5 (Cong *et al.*, 2009). С целью улучшения усвоения зерна животными была создана трансгенная пшеница, экспрессирующая в эндосперме эндоксиланазу из *Bacillus subtilis* и эстеразу феруловой кислоты из *Aspergillus niger* под контролем HMWGlu1Dx5 промотора (Harholt *et al.*, 2010). Промоторы пшеницы используют для наработки съедобных вакцин в растениях. Под контролем TaHMWGlu1Bx17 промотора был обеспечен высокий уровень накопления реагента для диагностики вируса HIV (0,56 % растворимого белка) и субъединицы B токсина холеры (2,1 % растворимого белка) в эндоспермах ячменя и риса (Schuenmann *et al.*, 2002; Oszvald *et al.*, 2008b). Промоторы пшеницы PRPI могут быть использованы как инструмент для повышения устойчивости к заболеваниям у зерновых культур (Kovalchuk *et al.*, 2010). Промотор GstA1 в комбинации с WIR1a интроном был успешно использован для повышения устойчивости зерновых культур к патогенным грибам. Сверхэкспрессия пероксидазы TaPERO в эпидермисе пшеницы под контролем GstA1i промотора приводила к повышению устойчивости к мучнистой росе (Schweizer, 2008). Таким образом, достаточно большое разнообразие промоторов пшеницы, экспрессирующихся в различных тканях и при различных воздействиях, может быть успешно использовано при решении различных биотехнологических задач.

Работа поддержана грантом Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 гг.» (07.514.11.4052); интеграционным проектом СО РАН и программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие», а также РФФИ в рамках гранта № 10-04-90411.

Литература

Altpeter F., Varshney A., Abderhalden O. *et al.* Stable expression of a defense-related gene in wheat epidermis under transcriptional control of a novel promoter confers pathogen resistance // Plant Mol. Biol. 2005. V. 57. P. 271–283.

Berna A., Bernier F. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germ in gene encoding oxalate oxidase, a H_2O_2-producing enzyme // Plant Mol. Biol. 1999. V. 39. P. 539–549.

Bilgin M., Dedeoĝlu D., Omirulleh S. *et al.* Meristem, cell division and S phase-dependent activity of wheat histone H4 promoter in transgenic maize plants // Plant Sci. 1999. V. 143. P. 35–44.

Boutrot F., Meynard D., Guiderdoni E. *et al.* The *Triticum aestivum* non-specific lipid transfer protein (TaLtp) gene family: comparative promoter activity of six TaLtp genes in transgenic rice // Planta. 2007. V. 225. P. 843–862.

Chen L., Tu Z., Hussain J. *et al.* Isolation and heterologous transformation analysis of a pollen-specific promoter from wheat (*Triticum aestivum* L.) // Mol. Biol. Rep. 2010. V. 37. P. 737–744.

Colot V., Robert L.S., Kavanagh T.A. *et al.* Localization of sequences in wheat endosperm protein genes which confer tissue-specific expression in tobacco // EMBO J. 1987. V. 6. P. 3559–3564.

Cong L., Wang C., Chen L. *et al*. Expression of phytoene synthase1 and carotene desaturase crtI genes result in an increase in the total carotenoids content in transgenic elite wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Agric. Food Chem. 2009. V. 57. P. 8652–8660.

Cui X., Zhang Y., Zhao F. *et al.* Molecular characterization and expression analysis of phosphate transporter gene TaPT2-1 in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Frontiers of Agriculture in China. 2011. V. 5. P. 274–283.

Egawa C., Kobayashi F., Ishibashi M. *et al.* Differential regulation of transcript accumulation and alternative splicing of a DREB2 homolog under abiotic stress conditions in common wheat // Genes Genet. Syst. 2006. V. 81. P. 77–91.

Evrard A., Meynard D., Guiderdoni E. *et al.* The promoter of the wheat puroindoline-a gene (*PinA*) exhibits a more complex pattern of activity than that of the *PinB* gene and is induced by wounding and pathogen attack in rice // Planta. 2007. V. 225. P. 287–300.

Fejes E., Pay A., Kanevsky I. *et al.* A 268 bp upstream sequence mediates the circadian clock-regulated transcription of the wheat *Cab-1* gene in transgenic plants // Plant Mol. Biol. 1990. V. 15. P. 921–932.

Furtado A., Henry R.J. The wheat Em promoter drives reporter gene expression in embryo and aleurone tissue of transgenic barley and rice // Plant Biotechnol. J. 2005. V. 3. P. 421–434.

Harholt J., Bach I.C., Lind-Bouquin S. *et al.* Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) accumulating heterologous endo-xylanase or ferulic acid esterase in the endosperm // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. P. 351–362.

Himmelbach A., Zierold U., Hensel G. *et al.* A set of modular binary vectors for transformation of cereals // Plant Physiol. 2007. V. 145. P. 1192–1200.

Huh G.H., Nakayama T., Meshi T., Iwabuchi M. Structural characteristics of two wheat histone H2A genes encoding distinct types of variants and functional differences in their promoter activity // Plant Mol. Biol. 1997. V. 33. P. 791–802.

Ito T., Fujimoto Y., Nakayama T., Iwabuchi M. A farup-stream sequence of the wheat histone H3 promoter functions differently in rice and tobacco cultured cells // Plant Cell Physiol. 1995. V. 36. P. 1281–1289.

Kobayashi F., Ishibashi M., Takumi S. Transcriptional activation of *Cor/Lea* genes and increase in abiotic stress tolerance through expression of a wheat DREB2 homolog in transgenic tobacco // Transgenic Res. 2008. V. 17. P. 755–767.

Kovalchuk N., Li M., Wittek F. *et al.* Defensin promoters as potential tools for engineering disease resistance in cereal grains // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. P. 47–64.

Kovalchuk N., Smith J., Pallotta M. *et al.* Characterization of the wheat endosperm transfer cell-specific protein TaPR60 // Plant Mol. Biol. 2009. V. 71. P. 81–98.

Lamacchia C., Shewry P.R., Di Fonzo N. *et al.* Endosperm-specific activity of a storage protein gene promoter in transgenic wheat seed // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 243–250.

Lloyd J.C., Raines C.A., John U.P., Dyer T.A. The chloroplast FBPase gene of wheat: structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants // Mol. Gen. Genet. 1991. V. 225. P. 209–216.

Marcotte W.R.J., Russell S.H., Quatrano S.R. Abscisic acid-responsive sequence from the Em gene of wheat // Plant Cell. 1989. V. 1. P. 969–976.

Miao J., Sun J., Liu D. *et al.* Characterization of the promoter of phosphate transporter TaPHT1.2 differentially expressed in wheat varieties // J. Genet. Genomics. 2009. V. 36. P. 455–466.

Nagy F., Boutry M., Hsu M.Y. *et al.* The 5′-proximal region of the wheat *Cab-1* gene contains a 268-bp enhancer-like sequence for phytochrome response // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2537–2542.

Oszvald M., Gardonyi M., Tamas C. *et al.* Development and characterization of a chimaeric tissue-specific promoter in wheat and rice endosperm // In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 2008a. V. 44. P. 1–7.

Oszvald M., Kang T.J., Tomoskozi S. *et al.* Expression of cholera toxin B subunit in transgenic rice endosperm // Mol. Biotechnol. 2008b. V. 40. P. 261–268.

Ouellet F., Vazquez-Tello A., Sarhan F. The wheat wcs120 promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species // FEBS Lett. 1998. V. 423. P. 324–328.

Peleg G., Malter D., Wolf S. Viral infection enables phloem loading of GFP and long-distance trafficking of the protein // Plant J. 2007. V. 51. P. 165–172.

Piston F., Marin S., Hernando A., Barro F. Analysis of the activity of a gamma-gliadin promoter in transgenic wheat and characterization of gliadin synthesis in wheat by MALDI-TOF during grain development // Mol. Breed. 2009. V. 23. P. 655–667.

Ryan P.R., Raman H., Gupta S. *et al.* The multiple origins of aluminium resistance in hexaploid wheat include *Aegilops tauschii* and more recent cis mutations to TaALMT1 // Plant J. 2010. V. 64. P. 446–455.

Schuenmann P.H.D., Coia G., Waterhouse P.M. Biopharming the SimpliRED HIV diagnostic reagent in barley, potato and tobacco // Mol. Breed. 2002. V. 9. P. 113–121.

Schweizer P. Tissue-specific expression of a defence-related peroxidase in transgenic wheat potentiates cell death in pathogen-attacked leaf epidermis // Mol. Plant Pathol. 2008. V. 9. P. 45–57.

Smirnova O.G., Ibragimova S.S., Kochetov A.V. Simple

database to select promoters for plant transgenesis // Transgenic Res. 2011. DOI: 10.1007/s11248-011-9538-2.

Stoger E., Williams S., Keen D., Christou P. Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control // Transgenic Res. 1999. V. 8. P. 73–82.

Stoger E., Parker M., Christou P., Casey R. Pea legumin overexpressed in wheat endosperm assembles into an ordered paracrystalline matrix // Plant Physiol. 2001. V. 125. P. 1732–1742.

Takumi S., Koike A., Nakata M. *et al.* Cold-specific and light-stimulated expression of a wheat (*Triticum aestivum* L.) Cor gene *Wcor15* encoding a chloroplast-targeted protein // J. Exp. Bot. 2003. V. 54. P. 2265–2274.

Taoka K., Ohtsubo N., Fujimoto Y. *et al.* The modular structure and function of the wheat H1 promoter with S phase-specific activity // Plant Cell Physiol. 1998. V. 39. P. 294–306.

Terada R., Nakayama T., Iwabuchi M., Shimamoto K. A wheat histone H3 promoter confers cell division-dependent and-independent expression of the *gusA* gene in transgenic rice plants // Plant J. 1993. V. 3. P. 241–252.

Tittarelli A., Milla L., Vargas F. *et al.* Isolation and comparative analysis of the wheat TaPT2 promoter: identification *in silico* of new putative regulatory motifs conserved between monocots and dicots // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 2573–2582.

Van Herpen T.W., Riley M., Sparks C. *et al.* Detailed analysis of the expression of an alpha-gliadin promoter and the deposition of alpha-gliadin protein during wheat grain development // Ann. Bot. 2008. V. 102. P. 331–342.

Wang H.W., Kwon H.J., Yim W.C. *et al.* Expressional diversity of wheat *nsLTP* genes: evidence of subfunctionalization *via cis*-regulatory divergence // Genetica. 2010. V. 138. P. 843–852.

Wiley P.R., Tosi P., Evrard A. *et al.* Promoter analysis and immunolocalization show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain // Plant Mol. Biol. 2007. V. 64. P. 125–136.

Xu Z.S., Ni Z.Y., Liu L. *et al.* Characterization of the *TaAIDFa* gene encoding a CRT/DRE-binding factor responsive to drought, high-salt, and cold stress in wheat // Mol. Genet. Genomics. 2008. V. 280. P. 497–508.

Yang P., Taoka K., Nakayama T., Iwabuchi M. Structural and functional characterization of two wheat histone H2B promoters // Plant Mol. Biol. 1995. V. 28. P. 155–172.

Zhang J., Liu W., Yang X. *et al.* Isolation and characterization of two putative cytokinin oxidase genes related to grain number per spike phenotype in wheat // Mol. Biol. Rep. 2011. V. 38. P. 2337–2347.

WHEAT PROMOTER SEQUENCES FOR TRANSGENE EXPRESSION

O.G. Smirnova, A.V. Kochetov

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

Summary

Gene engineering techniques and transgenic plants are frequently used in plant molecular genetics. Promoters from wheat genes with verified patterns of activity (annotated in TransGene Promoters Database, TGP) are discussed. The TGP database can be used as an information resource for planning various genetic engineering experiments.

Key words: promoters, wheat, transgenic plants, database.

УДК 631.527.5:58.036.5:633.11

СРАВНЕНИЕ СПОСОБОВ ПОЛУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА ЗИМОСТОЙКОСТЬ В УСЛОВИЯХ СИБИРИ

© 2012 г. **В.Е. Козлов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: kozlov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 16 ноября 2011 г. Принята к публикации 20 декабря 2011 г.

Высокая зимостойкость предполагает наличие длительности глубокого покоя, сопоставимой с продолжительностью зимовки, и высокой морозостойкости. Междисциплинарный подход к исследованию механизмов формирования зимостойкости позволил как разработать новый, так и усовершенствовать известные способы получения генетического разнообразия и сравнить их по эффективности. Такое разнообразие, в частности, необходимо для селекции сортов пшеницы, удовлетворяющих условиям Сибири. Так, обработка гиббереллином A_3 всходов озимых сортов позволила получить семьи (линии) с перезимовкой 85–100 % под глубоким снежным покровом в лесостепи. Перезимовка исходных сортов в этих же условиях была на порядок ниже. Стресс в двух смежных поколениях, вызванный гиббереллином, индуцировал у части выживших растений длительный глубокий покой, сопоставимый с продолжительностью зимовки, что обеспечило высокую выживаемость их потомств. Эти изменения наследовались. И чем жестче был отбор на продолжительность глубокого покоя среди «гиббереллиновых» линий, тем выше среди них была доля высокоморозостойких форм, выживших в бескулисных посевах при малоснежье в степи. При гибридизации между образцами пшеницы доля высокоморозостойких форм была наибольшей, если оба родителя обладали хотя бы одним из компонентов высокой зимостойкости. Инбредные клоны пырея сизого *Agropyron glaucum* оказались эффективным источником обоих компонентов зимостойкости при гибридизации с пшеницей. Наследственные изменения у образцов пшеницы под влиянием гиббереллина в двух смежных поколениях в условиях лесостепи и под влиянием умеренно сильных морозов в степи также в двух смежных поколениях, вероятно, имели регуляторную, эпигенетическую природу.

Ключевые слова: озимая пшеница, зимостойкость, морозостойкость, гиббереллин A_3, гибридизация, инбредные клоны пырея, эпигенетическая изменчивость.

Перед исследователем нередко возникает проблема получения генетического разнообразия. Решить ее удается в основном двумя путями: во-первых, привлекая уже существующие сорта и природные популяции, и, во-вторых, создавая экспериментально.

Более 40 лет назад Виктор Михайлович Чекуров, сотрудник лаборатории экспериментального мутагенеза ИЦиГ (Новосибирск), поставил задачу – получить генотипы пшеницы, зимующие в Сибири и способные стать исходным материалом для создания на их основе сортов, и совместить при этом в одном генотипе высокую выраженность зимостойкости и остальных хозяйственно ценных признаков, присущих сортам-донорам. Но в то время, во-первых, существовало твердое представление об обратной корреляции зимостойкости и урожайности, и, во-вторых, отсутствовали сорта пшеницы, удовлетворяющие условиям Сибири. Для того чтобы преодолеть данные трудности и при этом решить поставленную задачу, необходимо было расширение знаний о механизмах формирования признака зимостойкости.

Исследования в этом направлении имели междисциплинарный характер: привлекались

знания и методы физиологии, биохимии, генетики и селекции растений. В результате была предположена и обоснована гипотеза о важнейшей роли длительности глубокого покоя, сопоставимой с продолжительностью зимовки, для обеспечения высокой устойчивости ко всем повреждающим факторам среды в ходе зимовки, в первую очередь к морозу (Чекуров, Козлов и др., 1992; Чекуров, Козлов, 2003; Chekurov, Kozlov, 2005). Еще И.И. Туманов в 1935 г. отметил прямую зависимость между уровнем морозостойкости и устойчивостью к ледяной корке (Барашкова, Виноградова, 1988). И.М. Васильев (1956) также показал у озимой пшеницы четкую связь уровня морозостойкости с устойчивостью к повреждающим средовым факторам зимой. Т.В. Удовенко с сотрудниками в 1974 г. (Барашкова, Виноградова, 1988) отметила существенную корреляцию между уровнем морозостойкости и зимостойкостью (устойчивостью ко всем повреждающим факторам среды в ходе зимовки, в том числе устойчивостью к вымоканию). Эта закономерность была ими прослежена на большом перечне сортов и видов травянистых растений (Барашкова, Виноградова, 1988). Таким образом, устойчивость к морозу является предпосылкой устойчивости к остальным повреждающим факторам среды в зимний период, т. е. неповрежденные морозом растения и сохраняющие достигнутый уровень устойчивости к нему будут устойчивы и к остальным факторам зимовки.

С другой стороны, у зимующих растений на всех этапах зимовки идут обменные процессы, которые из-за отсутствия фотосинтеза сопровождаются снижением их сухого веса. После завершения осеннего закаливания эти процессы протекают с наименьшей интенсивностью. Растения находятся в состоянии так называемого глубокого покоя. У них наблюдается наибольшая устойчивость к морозу и остальным повреждающим факторам среды. Следовательно, если у растений будет сохраняться глубокий покой на протяжении всей зимовки, то они успешно перезимуют при условии достижения достаточного уровня зимостойкости с осени. Другими словами, сохранение глубокого покоя зимой является предпосылкой сохранения достигнутого уровня зимостойкости и, в первую очередь, морозостойкости и, как следствие, к остальным неблагоприятным условиям среды.

Следовательно, поиск высокозимостойких образцов пшеницы должен включать два этапа. Первый этап – селекция на устойчивость к длительности зимовки, в ходе которой мороз не является основным повреждающим фактором среды. И второй этап – селекция на высокую морозостойкость. В данной работе сравнивается эффективность нескольких способов получения образцов озимой пшеницы, способных успешно проходить эти два этапа селекции в условиях Сибири. Кроме того, результаты опытов подтверждают сформулированную выше гипотезу о методике селекции на высокую зимостойкость.

Материал и методы

Осенняя обработка посевов озимой пшеницы гиббереллином A_3 производилась, как описано ранее (Козлов, Чекуров, 1983). В опытах в лесостепи посевы озимых проводили сеялкой делянками по 5 м^2 (1 м шириной) в 3 повторностях. Процент перезимовки на каждой делянке определяли, подсчитывая число живых растений на отмеченных 1-метровых отрезках некрайних рядков осенью и весной, согласно методике ВИР (Барашкова, Виноградова, 1988) и вычисляли среднее значение. В опытах в степи посев проводили сеялкой делянками по 15 м^2 (ширина 1 м) в 2 повторностях. Процент перезимовки на делянках определяли весной с возобновлением вегетации по методу В.Я. Юрьева (Барашкова, Виноградова, 1988).

Результаты и обсуждение

В середине 1960-х гг. В.М. Чекуров начал в Институте цитологии и генетики СО АН СССР исследования признака зимостойкости у пшеницы. У него было четкое представление о том, что получить генотипы озимой мягкой пшеницы, способные стать сортами в Сибири, можно двумя путями: во-первых, расширяя знания о механизмах формирования признака и в особенности изучая роль в этом процессе регуляторов роста растений, и, во-вторых, привлекая диких сородичей пшеницы в качестве доноров высокой зимостойкости при гибридизации. Обсуждаемые ниже способы получения генетического разнообразия являются результатом исследований по этим двум направлениям.

В результате исследований роли регуляторов роста в формировании признака зимостойкости было показано, что у озимой пшеницы так же, как и у древесных растений, во время осеннего развития происходит усиление процессов, связанных с ингибированием роста (Козлов, Чекуров, 1983; Козлов, 1997). Это сопровождается замедлением и прекращением ростовых процессов и формированием зимостойкого состояния. Дополнительное поступление ингибиторов роста усиливает эти процессы. При этом у растений формируются морфология и уровень зимостойкости, характерные для самой благоприятной осенней погоды. Напротив, обработка растений стимуляторами роста, например, гиббереллином A_3, оказывает противоположный эффект на морфологию и зимостойкость растений, что характерно для неблагоприятной осени (Козлов, Чекуров, 1983). Поэтому В.М. Чекуров предложил с помощью обработки посевов озимых гиббереллином A_3 создавать условия, наименее благоприятные для развития зимостойкости – независимо от погодных условий конкретной осени, т. е. создать жесткий провокационный фон для отбора на зимостойкость на протяжении нескольких поколений. Двух смежных поколений оказалось достаточно для существенного повышения зимостойкости у потомков части выживших растений. В качестве исходного материала для этих опытов были взяты в основном сорта интенсивного типа конца 1960-х гг. краснодарской и мироновской селекции. Часть результатов приведена в табл. 1.

Из табл. 1 следует, что у генотипов (сортов) интенсивного типа удалось достичь существенного наследуемого повышения зимостойкости вплоть до 85–100 % выживающих растений в лесостепи Западной Сибири. Как показали дальнейшие широкие экологические испытания этих «гиббереллиновых» линий, некоторые из них обладали высокой морозостойкостью. В частности, одна из них, выделенная из сорта Альбидум 114, стала сортом Кулундинка и была районирована в суровых условиях Тувы и Южной Якутии. Другая линия, выделенная из сорта Мироновская Юбилейная, в качестве сорта Багратионовская была районирована в Западной Сибири и Восточном Казахстане. Она также стала Государственным стандартом морозостойкости для озимой мягкой пшеницы. До этого времени данный статус более 25 лет принадлежал сорту Ульяновка. Пример этих двух «гиббереллиновых» линий указывает на то, что обработка гиббереллином A_3 исходных сортов стала предпосылкой наследственных изменений по крайней мере у некоторых из

Таблица 1

Сравнение зимостойкости исходных сортов и линий, отобранных на гиббереллиновом фоне (зима 1984–1985 гг., лесостепь близ г. Новосибирска)

Исходные сорта	Процент перезимовки сортов*	Количество выделенных линий	Количество линий с заданным процентом перезимовки**			
			1–64	65–74	75–84	85–100
Безостая 1	10,0	27	2	6	11	8
Аврора	10,0	42	2	8	20	12
Кавказ	12,5	57	4	7	22	24
Краснодарская 46	15,0	61	2	16	21	22
Краснодарская 39	25,0	47	0	11	12	24
Безостая 2	5,0	21	9	11	1	0
Ранняя 12	7,5	16	7	7	2	0
Ранняя 47	30,0	40	1	19	14	6
Мироновская Юбилейная	25,0	59	1	23	20	15
Ильичевка	40,0	51	0	6	30	15
Стелуца	35,0	16	4	12	0	0

* После 6–7 поколений пересева в условиях Новосибирска; ** F_9 после обработки гиббереллином.

выживших растений, приведших к резкому повышению их зимо-, а также морозостойкости. На этапе отбора на гиббереллиновом фоне эти изменения индуцировали развитие способности сохранять глубокий покой на протяжении зимовки, характерной для Сибири. А на этапе экологических испытаний, когда для выживания требовался высокий уровень морозостойкости, эти изменения также способствовали ее развитию. Было отмечено, что исходные сорта такой морозостойкостью не обладали, их посевы гибли. Возможная природа произошедших изменений будет обсуждаться ниже.

Во-первых, нужно отметить, что создание этих двух сортов подтверждает сформулированное выше предположение о методике отбора на высокую зимостойкость в условиях Сибири. Во-вторых, предложен и экспериментально проверен новый способ получения исходного материала для селекции сортов озимой мягкой пшеницы, удовлетворяющих условиям Сибири.

Предложенную выше методику отбора подтверждают также результаты испытаний на зимостойкость генетического разнообразия, полученного более традиционным способом. Так, отдельную группу образцов (группа I) образовали «гиббереллиновые» линии в качестве некоторого стандарта. После зимовки под глубоким снежным покровом на талой почве и холодной затяжной весны их посевы к уборке были крайне изрежены, а выжившие растения сильно угнетены. Причина была в том, что всю зиму и весну растения провели в условиях яровизирующих температур.

Потомства лучшего колоса с делянки образовали группу образцов II, т. е. эти образцы были результатом ужесточения отбора на глубину и продолжительность глубокого покоя среди «гиббереллиновых» линий: зимой на растения не воздействовал слабый мороз, который снижал бы интенсивность обменных процессов. Как показали испытания в степи, такая перезимовка существенно повлияла на морозостойкость образцов этой группы.

Группу образцов III образовали гибриды F_5 между линиями группы I и линиями с повышенной морозостойкостью из сорта Ульяновка. Группу ППГ составили пшенично-пырейные гибриды $F_{6\text{-}7}$ между инбредными $I_{3\text{-}5}$ клонами дикого сородича пшеницы пырея сизого *Agropyron glaucum* с сортами отечественной селекции конца 1960-х г. Группу К образовали 152 лучших образца из примерно 15 тыс. образцов коллекции пшеницы ВИР середины 1980-х гг., предварительно испытанных на Омском опорном пункте ВИР в кулисах и в СибНИИРС (пос. Краснообск).

Посевы образцов перечисленных групп на протяжении ряда лет показывали перезимовку 85–100 % растений на экспериментальных полях ИЦиГ СО РАН под глубоким снежным покровом; температура почвы на глубине 3 см не опускалась ниже –10 ºС. Поэтому главным повреждающим фактором среды для растений зимой мороз не являлся. Но из-за невыровненности рельефа и ветров снег на полях накапливается крайне неравномерно. Поэтому даже в пределах одного поля в почве могут наблюдаться температурные условия разных природных зон (Яковлев, 1966). Кроме того, количество снега и сроки установления снежного покрова колеблются по годам. Поэтому сорта в Сибири должны обладать устойчивостью ко всему диапазону температур почвы, которые возможны в регионе.

Так как целью данной работы явилось сравнение эффективности доступных способов получения исходного материала, пригодного для селекции таких сортов, то посевы всех групп образцов пшеницы были испытаны на морозостойкость в течение 3 лет в бескулисных посевах в степи Северной Кулунды (пос. Баган, Северо-Кулундинская опытная станция) (табл. 2).

Как видно из табл. 2, в группе I основной отсев слабоморозостойких форм произошел в первых 2 поколениях; исходные сорта в этих условиях полностью гибли. Следовательно, воздействие на растения гиббереллином A_3 в двух смежных поколениях на эти исходные сорта привело у части выживших растений к формированию способности как выживать под глубоким снежным покровом, так и развивать высокую морозоустойчивость. Ужесточение отбора на глубину и длительность глубокого покоя при селекции в лесостепи (группа II) существенно повышало долю высокоморозостойких образцов: 17 образцов в группе I против 40 образцов в группе II (табл. 2). Это говорит о принципиальном значении сохранения глубокого покоя для выживания растений

Таблица 2

Динамика выживания в течение 3 лет в степи образцов озимой пшеницы, полученных разными способами в условиях лесостепи*

Год посева	Группы образцов и их численность, n (%)					Минимальная t ºС**
	I	II	III	ППГ	K	
1985	225 (100)	72 (100)	622 (100)	433 (100)	152 (100)	–16
1986	25 (11)	53 (73)	619 (95)	194 (68)	27 (18)	–19
1987	18 (8)	47 (65)	466 (75)	252 (58)	12 (8)	–34
Убрано образцов в 1988 г.	17 (7,5)	40 (55)	448 (72)	247 (57)	12 (8)	

* Выжившими считались делянки с перезимовкой 1–100 % растений, это позволило произвести посев следующего поколения; ** минимальная температура почвы на глубине 3 см.

пшеницы при разных температурных условиях в почве зимой.

Самая впечатляющая динамика снижения численности группы в ряду поколений (медленная) и самая высокая доля высокоморозостойких форм наблюдались у образцов группы III. Это гибриды форм с длительным глубоким покоем (группа I) и линий с повышенной морозостойкостью из сорта Ульяновка, т. е. второй родитель обладал обоими компонентами зимостойкости. С учетом того что наследование зимостойкости гибридами имеет, как правило, промежуточный характер, этот результат выглядит достаточно естественно. Существенным недостатком этих гибридов явилось то, что они унаследовали от сорта Ульяновка слабую соломину, которая не выдерживала крупный колос с крупным зерном, унаследованный от родителя из группы I. В итоге наблюдалось сильное прикорневое полегание. Этот факт подчеркивает принципиальное значение приемлемого выражения у родителей остальных хозяйственно ценных признаков помимо зимостойкости.

Именно такой сценарий был осуществлен при получении пшенично-пырейных гибридов (группа ППГ). Так как их пшеничные родители были не приспособлены к условиям Сибири (в основном это исходные сорта, представленные в табл. 1), то, несомненно, донором обоих компонентов высокой зимостойкости стали клоны пырея сизого. И, вероятно, в силу промежуточного характера наследования доля высокоморозостойких образцов среди ППГ оказалась ниже, чем в группе III (табл. 2), тем не менее на уровне группы II: 57 % среди ППГ и 55 % в группе II (табл. 2). К настоящему времени из числа ППГ получены сорта Новосибирская 32, Новосибирская 40, Новосибирская 51; сорт Бийская озимая проходит Государственные сортоиспытания.

Эти результаты показывают огромный потенциал пырея как донора зимостойкости для озимой мягкой пшеницы. Особенно наглядно потенциал пырея показали результаты промораживания в морозильных камерах потомств отдельных колосьев, собранных при уборке в степи всех групп образцов в 1988 г. (табл. 2). Растения в стадии начала кущения подверглись воздействию температуры –24 ºС в течение 3 суток. Доля выживших генотипов среди ППГ была почти в 9 раз выше, чем среди генотипов чисто пшеничного происхождения (Козлов, 1997; Чекуров, Козлов, 2003; Chekurov, Kozlov, 2005; Kozlov, 2011), т. е. пырей является донором не только высокой, но и продолжительной морозостойкости, а это особенно важно для сортов в Сибири.

Результаты, приведенные в табл. 1 и 2, позволяют сделать вывод о том, что экспериментально подтверждена работоспособность предложенной методики двухэтапной селекции на высокую зимостойкость в условиях Сибири. Первый этап – селекция на длительность глубокого покоя, близкую к продолжительности зимовки, которая наблюдается в регионе; второй этап – селекция на морозостойкость. То есть применение этой методики к образцам пшеницы, созданным с помощью каждого из обсуждаемых выше способов получения, позволило в каждом случае получить образцы пшеницы, способные стать сортами в Сибири. Экспериментально это подтверждают сорта, получен-

ные из «гиббереллиновых» линий, – группа I и группа II (табл. 2) и пшенично-пырейных гибридов – группа ППГ (табл. 2). Получение таких сортов из числа гибридов группы III стало невозможным из-за их слабой соломины, унаследованной от сорта Ульяновка. Но, тем не менее, среди образцов этой группы была самая большая доля высокоморозостойких форм, что подчеркивает эффективность этого способа получения высокозимостойких форм.

В целом отбор на гиббереллиновом фоне, вероятно, – самый быстрый путь получения исходного высокозимостойкого разнообразия, пригодного для селекции по всему комплексу хозяйственно ценных признаков, присущих сортам: 2 поколения – обработка посевов гиббереллином A_3 плюс 2–4 поколения размножения и оценки на зимостойкость потомств выживших растений. Результативность повысится, если добавить 1 поколение отбора с помощью зимовки на талой почве и 2 поколения отбора в степи на морозостойкость. В результате через 7–9 поколений можно получить требуемый высокозимостойкий материал для селекции сортов. И если исходно были взяты сорта интенсивного типа с недостаточной для условий Сибири зимостойкостью, то дальнейшая селекция потребует сравнительно небольшого числа поколений.

Гибридизация между образцами пшеницы потребует 4–6 поколений на размножение гибридов и отбор в условиях лесостепи и 2 поколения отбора на морозостойкость, после чего можно будет вести селекцию по остальным хозяйственно ценным признакам.

Гибридизация пшеницы с пыреем предполагает наличие инбредных клонов с глубиной инбридинга $I_{3–5}$, для получения которых может потребоваться 6–10 поколений. 3–4 поколения потребуются на получение нестерильных гибридов и 5–7 поколений – на размножение и выделение образцов с чисто пшеничным фенотипом, их оценку в лесостепи и 2 поколения отбора в степи. Но достоинством получаемых гибридов является большая доля образцов с высокой и длительной морозостойкостью, что показали результаты промораживания в морозильных камерах.

Таким образом, обсуждаемые способы получения исходного материала для селекции сортов имеют свои достоинства. Выбор любого из них будет зависеть от возможностей конкретного исследователя. В этой связи нужно отметить, что образцы из коллекции озимой мягкой пшеницы ВИР середины 1980-х гг. оказались малоэффективным источником высокозимостойкого материала для селекции сортов в Сибири (табл. 2, группа К), но они могут успешно применяться как исходный материал для рассмотренных выше способов получения нужного разнообразия.

В заключение остается обсудить возможную природу тех изменений у растений, выживавших в лесостепи после обработки гиббереллином A_3, и у растений, выживших в степи при отборе на морозостойкость.

Под влиянием гиббереллина A_3 в двух смежных поколениях у ряда слабозимостойких в лесостепи Западной Сибири сортов озимой мягкой пшеницы удалось получить линии с перезимовкой 85–100 % растений (табл. 1). Приведенные выше данные указывают на ключевое значение способности сохранять глубокий покой растениями в ходе зимовки для их выживания. Состояние глубокого покоя у растений формируется в ходе их осеннего развития. Перед наступлением зимовки у них существенно изменяется метаболизм, активность генома. Так, у наиболее изученного растительного объекта *Arabidopsis thaliana* показано, что понижение температуры затрагивает активность 939 генов: у 655 она повышается, а у 284 снижается. О многих генах, быстро реагирующих на понижение температуры, известно, что они кодируют транскрипционные факторы. У 23 из них изменения активности регистрировались лишь в течение первых трех часов воздействия холодом. Lee с соавт. (2005) приводят данные о том, что транскрипционные факторы включают множество транскрипционных каскадов.

Поэтому предположение о мутационном характере изменений у озимой пшеницы под влиянием гиббереллина A_3, которые привели к наследуемому повышению зимостойкости потомков у части выживших растений, не может быть принято. Причина простая: число генов, вовлекаемых в формирование состояния глубокого покоя, велико, а частота мутаций для отдельного гена мала. Еще меньше частота мутационных событий, не наносящих вреда. Поэтому согласованный мутационный процесс в течение 2 поколений у довольно ограничен-

ного числа растений, который затрагивает существенную часть их генома, маловероятен. Следовательно, скорее всего имеет место согласованное регуляторное изменение активности генома, т. е. происходящие события имеют эпигенетический характер.

Из анализа табл. 2 можно сделать предположение, что под влиянием умеренно сильных морозов в первых 2 поколениях у выживших образцов пшеницы в степи произошло существенное повышение их морозостойкости, потому что в третью, самую суровую, зиму отсев в каждой группе образцов был небольшим. Это предположение подтверждается характером распределений внутри каждой группы в ряду поколений (Чекуров, Козлов и др., 1992).

Вероятная природа изменений, приведших к росту морозостойкости в течение 2 поколений, по нашему мнению, такая же, как и в предыдущем случае. То есть под влиянием гиббереллина A_3 во время зимовки посевов пшеницы под глубоким снежным покровом в лесостепи, а затем под влиянием умеренно сильных морозов в ходе зимовки при малоснежье в степи, вероятно, произошли эпигенетические изменения в геноме выживших растений. В первом случае они привели за 2 поколения к формированию наследуемой способности поддерживать глубокий покой на протяжении зимовки, характерной для лесостепи Западной Сибири. А во втором случае они привели к наследуемому росту морозостойкости у потомков выживших растений.

Таким образом, описанная в данной работе двухэтапная селекция является эффективным способом получения исходного разнообразия для селекции высокозимостойких сортов озимой мягкой пшеницы, удовлетворяющих условиям Сибири.

Литература

Барашкова Э.А., Виноградова В.В. Оценка зимо- и морозостойкости полевых культур // Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Л.: ВИР, 1988. С. 128–154.

Васильев И.М. Зимовка растений. М.: Изд-во АН СССР, 1956. 308 с.

Козлов В.Е. Исследование признака зимостойкости у озимой пшеницы в условиях Сибири. Генетические и селекционные аспекты: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Новосибирск: ИЦиГ СО РАН, 1997. 16 с.

Козлов В.Е., Чекуров В.М. Связь между морфологией растений озимой пшеницы и зимостойкостью при изменении содержания рост- регулирующих веществ // Роль фитогормонов в проявлении некоторых признаков у растений: Сб. науч. тр. Новосибирск: ИЦиГ СО АН СССР, 1983. С. 85–96.

Чекуров В.М., Козлов В.Е. Низкий метаболизм и высокая морозостойкость – важные компоненты выживаемости озимой пшеницы в Сибири // 1-я Центрально-Азиатская конференция по пшенице, г. Алматы, 10–13 июня 2003. Материалы. Алматы: CIMMYT, 2003. С. 222.

Чекуров В.М., Козлов В.Е., Титков И.П., Митрофанов Н.Г. Проблемы и методические подходы к созданию сортов озимой пшеницы для Сибири // Генетические методы в селекции растений. Новосибирск: Наука, 1992. С. 180–210.

Яковлев Н.Н. Климат и зимостойкость озимой пшеницы. Л.: Гидрометеоиздат, 1966. 419 с.

Chekurov V.M., Kozlov V.E. Winter wheat's main survival mechanisms in Siberia: Low metabolic rate and high frost tolerance / A.A. Morgunov, K.G. McHab. Campbell and Poroda // Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and Cooperation: Proc. of the First Central Asia Wheat Conf., Almaty, Kazakhstan: CIMMYT, 2005. P. 118–121.

Lee Byeong-ha, Henderson D.A., Zhu J.-K. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1 // The Plant Cell. 2005. V. 17. P. 3155–3175.

Kozlov V.E. Comparison of methods of obtaining the genetic diversity for the selection of wheat to winter hardiness in Siberia // The Intern. Conf. «Wheat genetic resources and genomics» (WGRG), Novosibirsk, Russia. August 28–September 1, 2011. Novosibirsk: Inst. Cytol. Genet, 2011. P. 19.

COMPARISON OF METHODS FOR OBTAINING GENETIC DIVERSITY FOR BREEDING WINTER-HARDY WHEAT IN SIBERIA

V.E. Kozlov

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

Summary

High winter hardiness requires two features: (1) a duration of deep rest comparable to the duration of wintering and (2) high frost resistance. An interdisciplinary approach to studying the mechanisms governing the formation of winter hardiness permits one to develop new methods for increasing genetic diversity, to improve well-known ones, and to compare their efficiencies. Such diversity, in particular, is essential for breeding wheat varieties that would meet the conditions of Siberia. Treatment of shoots of winter varieties with gibberellin A_3 yielded families (lines) with 85–100 % survival under deep snow cover in the forest-steppe zone. The survival of original varieties under the same conditions was lower by an order of magnitude. Gibberellin stress in two consecutive generations induced a long deep rest in some survivors, comparable to the duration of wintering, which ensured high survival of their offspring. These changes were inherited. The harder was the selection for the duration of deep rest in «gibberellic» lines, the higher proportion of them was constituted by highly frost-resistant forms that survived under conditions of poor snow cover in the steppe. When both parents had at least one component of high winter hardiness, the crosses yielded the highest proportion of highly frost-resistant forms. Inbred clones of intermediate wheatgrass *Agropyron glaucum* were good donors of both components of winter hardiness when crossed to wheat. Hereditary changes in wheat accessions in two consecutive generations both in the forest-steppe under the influence of gibberellins and in the steppe under the effect of moderate to severe frosts are likely to have a regulatory epigenetic nature.

Key words: winter wheat, winter hardiness, frost resistance, gibberellin A_3, hybridization, inbred wheatgrass clones, epigenetic variability.

УДК 631.527.5:58.036.5:633.1:57.085.23

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОМОРОЗОСТОЙКИХ ФОРМ ПШЕНИЧНО-ПЫРЕЙНЫХ ГИБРИДОВ

© 2012 г. **Е.П. Размахнин, Т.М. Размахнина, В.Е. Козлов, Е.И. Гордеева, Н.П. Гончаров, Ю.Г. Галицын, С.Г. Вепрев, В.М. Чекуров**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: eprazmakh@yandex.ru

Поступила в редакцию 18 ноября 2011 г. Принята к публикации 21 декабря 2011 г.

Разработана технология создания высокоморозостойких форм озимой мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, основанная на передаче признака высокой морозостойкости пшенице от дикого ее сородича – пырея сизого *Agropyron glaucum*. Технология включает метод получения удвоенных гаплоидов пырея в культуре пыльников, метод отбора генотипов пырея с высокой способностью продуцировать зеленые гаплоиды *in vitro*, метод экспресс-анализа морозостойкости растений, отдаленную гибридизацию морозостойких генотипов пырея с пшеницей и оригинальный метод передачи морозостойкости от пырея пшенице с помощью «листовой няньки». В результате применения данной технологии создана уникальная коллекция андрогенных растений пырея сизого и получен обширный гибридный материал от различных комбинаций скрещивания между морозостойкими растениями пырея и различными сортами яровой и озимой пшеницы. Методом «листовой няньки» получены морозостойкие и высокопродуктивные ЛН-линии озимой пшеницы.

Ключевые слова: *Agropyron glaucum*, пырей сизый, пшеница мягкая, морозостойкость, андрогенез *in vitro*, отдаленная гибридизация, пшенично-пырейные гибриды, «листовая нянька».

Одним из перспективных направлений по созданию морозостойких сортов озимой пшеницы для регионов с экстремальными климатическими условиями является привлечение отдаленной гибридизации существующих сортов пшеницы с ее дикими сородичами, в частности, с разными видами пырея (Horovitz, 1969; Цицин, 1981; Размахнин, Чекуров, 2006б). В Институте цитологии и генетики СО РАН такая работа ведется около 40 лет. Исходным материалом для получения морозостойких форм пшенично-пырейных гибридов (ППГ) послужила коллекция семян двух видов пырея *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC) Roem. & Schult. (= syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey) и *Agropyron elongatum* (Host) Nevishi (= syn. *Thinopyrum ponticum* (Podp.) Z.-W. Liu & R.-C. Wang), собранная В.М. Чекуровым и В.М. Шепелевым в 1971 г. в Восточном Казахстане в дикорастущей популяции этих видов, росшей на возвышенном и малоснежном месте. Такие жесткие условия произрастания растений пырея обусловили, в первую очередь, наличие у них высокой морозостойкости. Пырей является перекрестноопыляющейся культурой и обладает высокой гетерозиготностью, поэтому для повышения эффективности гибридизации его с пшеницей потребовалось создание линейного материала. Сотрудниками ИЦиГ СО АН СССР А.М. Орловой и Н.П. Первушиным с помощью метода принудительного самоопыления к 1985 г. была создана коллекция из более чем 2 тыс. растений различной степени инбридинга до 5-го поколения включительно (Чекуров, Орлова, 1982; Орлова, 1988). В процессе получения инбредных растений пырея лучшие из них были скрещены с образцами озимой пшеницы для передачи гибридам от дикого сородича высокой устойчивости к неблагоприятным факторам среды. В итоге из некоторых гибридных форм были получены высокоморозостойкие сорта озимой пшеницы (Чекуров, Козлов, 2003). Таким образом, данный подход оказался результативным, но

для создания использованных в селекции инбредных линий пырея потребовались большие затраты сил и времени.

Разработка биотехнологии получения андрогенных линий пырея

Для того чтобы решить проблемы, связанные с получением инбредных линий пырея, в 1985 г. Е.П. Размахниным и С.В. Велиевым под руководством В.М. Чекурова в ИЦиГ СО АН СССР была начата разработка биотехнологического метода получения гомозиготных линий пырея в культуре пыльников (андрогенез *in vitro*). На первых этапах работы были испытаны индукционные и регенерационные среды, составленные по прописям, взятым из литературы. Углеводным компонентом в этих средах была сахароза. Было показано, что ее стандартная концентрация, 3 %, применяемая большинством исследователей для индукции андрогенеза пшеницы, ячменя и ряда других злаковых культур, недостаточна для его индукции у пырея (Размахнин, 2003). Оказалось, что у пырея, который в отличие от пшеницы является ветроопыляемой культурой, пыльца имеет более толстую и прочную оболочку, которая предохраняет ее от высыхания при переносе ветром. Для разрыва такой оболочки собственной силы индуцированным в процессе андрогенеза многоклеточным структурам недостаточно, и требуется дополнительная сила осмотического давления, обеспечиваемого высокой концентрацией сахарозы (9–10 %).

В дальнейшей работе, используя питательную среду с 10 %-й сахарозой в качестве индукционной, мы проанализировали на способность к андрогенезу *in vitro* выборку из 2 тыс. кроссбредных и инбредных растений пырея сизого из созданной лабораторной коллекции. Оказалось, что менее 1 % изученных растений были способны образовывать преимущественно зеленые гаплоидные андрогенные растения в культуре пыльников. Около 50 % растений продуцировали исключительно альбиносные гаплоиды и 10 % – преимущественно альбиносные гаплоиды с небольшим количеством зеленых. У пырея удлиненного было проанализировано несколько десятков генотипов, но ни в одном случае развитие зеленых гаплоидов не наблюдалось (Размахнин и др., 1989; Размахнин, 2003).

Электронно-микроскопический анализ показал, что эмбриоиды, из которых развиваются альбиносы, содержат хлоропласты с нарушениями в мембране. В процессе культивирования на искусственных средах такие хлоропласты постепенно разрушаются, обусловливая альбинизм у растений-регенерантов. Эмбриоиды, из которых развиваются зеленые гаплоиды, содержат устойчивые к условиям культивирования хлоропласты с ненарушенной мембраной (Galieva *et al*., 1993).

Дальнейшая работа велась по следующим направлениям: 1) совершенствование метода андрогенеза; 2) расширение коллекции генотипов пырея с высокой способностью к гаплопродукции андрогенных зеленых гаплоидов и создание коллекции гаплоидов и удвоенных гаплоидов пырея сизого.

1. Совершенствование метода андрогенеза. Было исследовано влияние следующих факторов на процессы индукции и регенерации андрогенных гаплоидов пырея в культуре пыльников: 1) различные, компоненты в составе питательных сред; 2) микроволновое, ультрафиолетовое и рентгеновское излучение.

В результате было выявлено положительное влияние на выход андрогенных гаплоидов таких фитогормонов, как абсцизовая и гиббереллловая кислоты, а также витаминов рибофлавина и никотиновой кислоты, биопрепарата «Новосил» и экстракта из листьев пырея (Razmakhnin, Chekurov, 2001; Чекуров и др., 2002; Размахнин и др., 2004; Чекуров, Размахнин, 2005; Razmakhnin *et al*., 2010). Для каждого из этих веществ были подобраны эффективные концентрации. Изучение влияния на андрогенез углеводных компонентов среды (Razmakhnin *et al*., 2010) позволило упростить известную китайскую среду Potato II (Chuang, Ouyang, 1978), часто используемую для индукции андрогенеза. Нами показано, что картофельный экстракт в этой среде может быть заменен дисахаридом мальтозой без потери эффективности (табл. 1).

В качестве эффективной среды для регенерации гаплоидов нами предложена среда оригинального состава с минимальным количеством минеральных солей, содержащая рибофлавин и экстракт листьев растений пырея, обладающих

Таблица 1

Влияние мальтозы и картофельного экстракта на андрогенез *in vitro* пырея сизого

Вариант индукционной среды	Изучено генотипов	Частота андрогенных генотипов, %	Частота пыльников с эмбриоидами, %	Частота генотипов, давших зеленые гаплоиды, %
Potato II +мальтоза	100	69	37	17
Potato II + мальтоза + картофельный экстракт 10 %	100	67	34	17

высокой способностью продуцировать зеленые гаплоиды (Razmakhnin *et al*., 2010). В табл. 2 приведены данные, показывающие стимуляцию развития андрогенных структур экстрактом из листьев пырея.

Проведенные нами исследования влияния микроволнового, ультрафиолетового и рентгеновского излучения на процесс андрогенеза не показали существенного увеличения выхода андрогенных гаплоидов. В то же время были выявлены пороговые дозы этих излучений, ингибирующие развитие андрогенных структур (Razmakhnin *et al*., 2010).

Полученные результаты показывают, что разработанная нами гаплоидная технология может быть с успехом использована, во-первых, для получения чистых андрогенных линий пырея и, во-вторых, для тестирования и отбора генотипов пырея с целью дальнейшего использования во внутривидовой и межвидовой гибридизации (Чекуров, Размахнин, 2003б; Razmakhnin, Chekurov, 2003).

В литературе дискутируется вопрос, какой метод предпочтительнее для создания чистых линий у перекрестноопыляющихся видов растений: инбридинг или гаплоидная технология? (Reinert, 1977; Ницше, Венцель, 1980; Sopory, 1983; Ockendon, 1986; Чекуров, Размахнин, 1999; Гончаров Н.П., Гончаров П.Л., 2009). Многое зависит от изучаемого объекта. Но для создания инбредных и к тому же не полностью чистых линий требуются годы, причем с увеличением глубины инбридинга растения теряют свой габитус из-за инбредной депрессии. Гаплоидная же технология позволяет получать предельно чистые линии за 1–2 года. Причем нами отмечен интересный факт увеличения габитуса удвоенных гаплоидов по сравнению с родительскими растениями (рис. 1). С нашей точки зрения гаплоидная технология и инбридинг должны взаимодополнять друг друга (Размахнин, Чекуров, 2006а).

2. Расширение коллекции генотипов пырея с высокой способностью к гаплопродукции андрогенных зеленых гаплоидов и создание коллекции гаплоидов и удвоенных гаплоидов пырея сизого. Для этой цели были использованы метод андрогенеза, внутривидовая гибридизация, получение потомства от перекрестного и самоопыления и клонирование (Размахнин, Чекуров, 2004; Размахнин, 2008).

Таблица 2

Влияние экстракта листьев пырея на регенерацию гаплоидов в культуре пыльников *A. glaucum*

Концентрация экстракта в регенерационной среде, %	Число изученных генотипов	Высажено эмбриоидов на регенерационную среду	Число зеленых растений-регенерантов	Средняя оценка зеленых растений-регенерантов*, M ± m
0,008	32	123	8	2,9 ± 1,6
0,04	32	123	7	4,1 ± 1,95
0,2	32	123	8	4,0 ± 1,8
1	32	123	11	3,5 ± 1,6
5	32	123	21	4,7 ± 1,7

* Растения в пробирках оценивали по 5-балльной шкале, в зависимости от габитуса. Так, растение высотой 1 см оценивали в 1 балл, а растение высотой 5 см и выше – в 5 баллов (Chekurov, Razmakhnin, 1999).

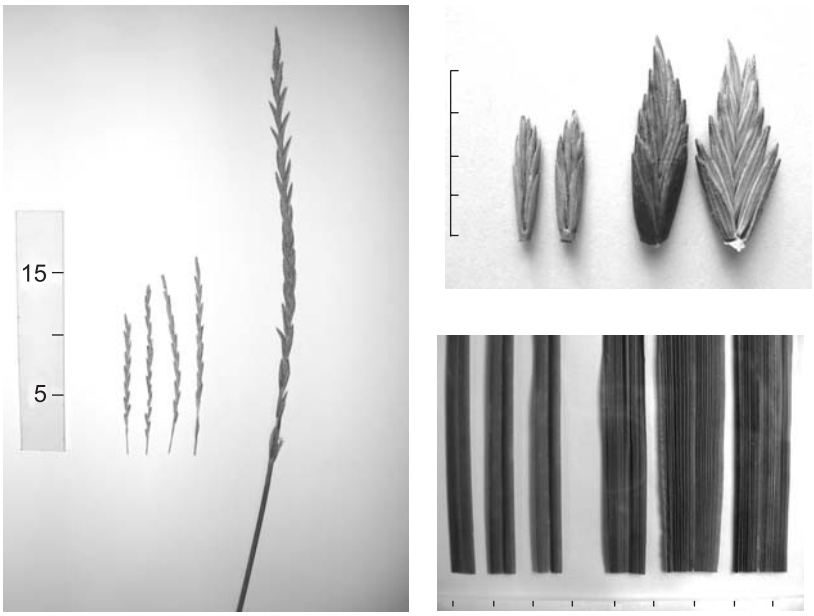


Рис. 1. Колосья, колоски и листья родительского растения *A. glaucum* (слева) и удвоенного гаплоида, полученного в культуре пыльников (справа).

К настоящему времени коллекция андрогенных линий и родительских растений пырея, выращиваемая в поле, составляет более 500 растений, и создана обширная коллекция семян пырея сизого. Ежегодно происходит ее пополнение.

Разработка метода отбора генотипов пырея по способности к андрогенезу *in vitro* для последующей гибридизации с пшеницей

Для оценки гибридизационной способности генотипов пырея, различающихся по способности к андрогенезу, мы провели скрещивания их с сортом озимой пшеницы Саратница. Результаты гибридизации оценивали по таким параметрам, как «процент завязываемости гибридных зерен», «средняя масса одной зерновки», «процент прорастания семян» и введенному нами параметру «Р», равному произведению процента завязываемости на среднюю массу одной зерновки. Параметр Р удачно объединяет в себе качественную и количественную оценки урожая семян – чем больше его величина, тем удачнее гибридная комбинация. Данные, представленные в табл. 3, показывают, что генотипы пырея А, В, способные продуцировать зеленые андрогенные растения, проявили высокие гибридизационные свойства, оцененные по параметру Р (Р = 400 и 350 соответственно) и по проценту прорастания гибридных зерновок (95 и 90 % соответственно). Гибриды озимой пшеницы с генотипами пырея S и F, не способные продуцировать зеленые гаплоиды, имели пониженное значение параметра Р (Р = 112 и Р = 0); семена этих гибридов не прорастали.

Нами было получено гибридное растение между продуцирующим исключительно зеленые гаплоиды генотипом пырея А и генотипом

Таблица 3

Характеристики отдаленной гибридизации с пшеницей у генотипов *A. glaucum* с различной способностью к андрогенезу *in vitro*

Генотип пырея	Количество эмбриоидов, регенерировавших растения, %		Завязывание гибридных зерен, %	Прорастание гибридных зерен, %	Р
	альбиносы	зеленые			
A	0	100	34	95	401
B	0	10	20	90	350
S	0	0	14	0	112
F	20	0	0	0	0
A × S	0	0	14	0	58

S, не способным к андрогенезу. При опылении озимой пшеницы пыльцой этого гибрида были получены семена, которые не прорастали. При этом значение параметра Р было в 7 раз меньше, чем у гибрида озимой пшеницы с генотипом пырея А (табл. 3).

Полученные результаты показывают, что андрогенез *in vitro* является методом, позволяющим эффективно тестировать генотипы пырея по их способности к андрогенному развитию зеленых гаплоидов (Размахнин, Чекуров, 2003а). Именно такие генотипы наиболее перспективны в качестве отцовского компонента скрещивания при отдаленной гибридизации пырея с пшеницей для получения ППГ.

Разработка метода экспресс-анализа морозостойкости растений пырея и пшеницы

Так как наиболее важным признаком, который нужно передать от пырея пшенице, является морозостойкость, желательно иметь простой и эффективный метод ее определения у анализируемых растений. Такой метод нами разработан и запатентован (Размахнин и др., 2009). Он заключается в промораживании фрагментов листьев злаков, наклеенных на скотч, в массивных пластинах в морозильной камере при постепенном понижении температуры с последующим окрашиванием резорцином. Метод удобен для анализа морозостойкости молодых проростков злаков на стадии 1–3 листьев. За один рабочий день можно проанализировать до 200 образцов, причем анализируемые растения после взятия у них на анализ фрагментов листьев продолжают свой рост и развитие и дают нормальное потомство в противовес широко распространенному методу промораживания растений целиком, в результате которого выжившие растения могут содержать повреждения, обусловленные длительным воздействием предельно низких температур.

С помощью такого метода экспресс-анализа морозостойкости мы протестировали большое количество гаплоидных и диплоидных растений пырея из созданной в ИЦиГ СО РАН коллекции, а также различные сорта озимой мягкой пшеницы. Были выявлены генотипы пырея с морозостойкостью, значительно превышающей морозостойкость озимой пшеницы сортов Багратионовка и Новосибирская 32, которые являются рекордсменами по морозостойкости среди озимой пшеницы (Razmakhnin, 2010) и сортами-стандартами по морозостойкости на ГСУ страны.

На основании полученных результатов по вышеперечисленным направлениям исследований, можно заключить, что применение разработанных нами методов получения андрогенных растений пырея в культуре пыльников, тестирования растений пырея по способности к андрогенезу и по морозостойкости в сочетании с классическим методом инбридинга позволило создать обширную коллекцию андрогенных линий и родительских растений пырея сизого с ценными признаками, такими, как способность к гаплопродукции зеленых андрогенных растений, высокая морозостойкость, самофертильность, крупность зерновок, вегетативная мощность и хорошая скрещиваемость с пшеницей. Причем выявлены растения пырея, обладающие комплексным набором ценных признаков. Эти растения могут быть с успехом использованы в качестве доноров для передачи этих признаков пшенице, а также для создания кормовых сортов пырея.

Отдаленная гибридизация озимой и яровой пшеницы с лучшими образцами пырея из созданной коллекции

В 2008–2010 гг. были проведены скрещивания 20 лучших коллекционных образцов пырея с двумя сортами морозостойкой озимой пшеницы Багратионовка и Филатовка, созданными в лаборатории экспериментального мутагенеза ИЦиГ СО РАН, и пятью сортами яровой пшеницы Саратовская 29, Новосибирская 67, Омская 37, Казанская юбилейная и Новосибирская 20 с целью повышения морозостойкости и увеличения биоразнообразия у получаемых пшенично-пырейных гибридов. В результате было получено более 3000 семян ППГ первого, второго и третьего беккроссов с озимой и более 1000 семян ППГ первого и второго беккроссов с яровой пшеницей. Некоторые гибридные растения отличались увеличенными размерами колоса. В качестве примера на рис. 2 показаны колосья

Рис. 2. Колосья озимой пшеницы Филатовка и пшенично-пырейного гибрида Филатовка × *Ag. glaucum* 3-го поколения после беккросса.

сорта озимой пшеницы Филатовка и ее гибрида с пыреем. Полученные ППГ в настоящее время размножаются в поле и теплице. Для быстрого перевода гетерозиготных форм ППГ в стабильные линейные формы проводится работа по созданию удвоенных гаплоидов ППГ методом андрогенеза *in vitro*. Описанная технология позволяет, во-первых, целенаправленно получать высокоморозостойкие ППГ и, во-вторых, сократить сроки получения многочисленных линейных форм ППГ до 2–3 лет.

Исследование влияния экстракта из листьев и самих листьев андрогенных и морозостойких форм пырея на продуктивность и морозостойкость пшеницы

После обнаружения положительного воздействия экстракта из листьев пырея на регенерацию гаплоидных растений в культуре пыльников (Razmakhnin *et al*., 2010) нами были проведены исследования влияния экстракта, выделенного из листьев растений пырея с высокой морозостойкостью и высокой способностью к андрогенезу на морозостойкость растений пшеницы. Было показано повышение морозостойкости у проростков различных сортов яровой и озимой пшеницы при обработке экстрактом (Razmakhnin, 2010). В дальнейших исследованиях удалось достичь увеличения морозостойкости пшеницы при использовании разрабатываемого нами метода «листовой няньки». Метод заключается в длительном проращивании семян пшеницы в плотном контакте с живыми листьями морозостойких растений пырея при низких температурах (Размахнин и др., 2007; Razmakhnin, 2010). После этого у растений отрезали кончики листьев и анализировали морозостойкость с помощью разработанного нами метода экспресс-анализа. В 5–10 % случаев растения обладали более высокой морозостойкостью, чем контрольные проростки, выращенные вне контакта с листьями пырея в рулонах фильтровальной бумаги. После яровизации при низких температурах растения высаживали в открытый грунт. При созревании полученных методом «листовой няньки» морозостойких растений в ряде случаев было отмечено увеличение некоторых параметров продуктивности и изменение морфологии колосьев. На рис. 3 показаны растения озимой пшеницы Багратионовка с ярко выраженной остистостью колоса, полученные от растения с высокой морозостойкостью, выращенного методом «листовой няньки». При дальнейшем размножении семенами остистость сохранялась в трех последующих изученных поколениях.

В табл. 4 приведены некоторые характеристики ЛН-линий 3-го поколения «листовой няньки». Из 15 ЛН-линий 8 линий имели значительно более высокую выраженность признаков, являющихся компонентами повышения урожайности по сравнению с исходным сортом Багратионовка. В настоящее время проводятся размножение и дальнейшее исследование полученного материала.

Заключение

Разработка и использование метода получения гаплоидов пырея, метода тестирования генотипов пырея по способности к андрогенезу и метода экспресс-анализа морозостойкости растений злаковых позволили создать уникальную коллекцию генотипов пырея сизого с ценными для селекции свойствами. Растения пырея из созданной коллекции используются в широкомасштабной гибридизации с различными сортами озимой и яровой мягкой пшеницы

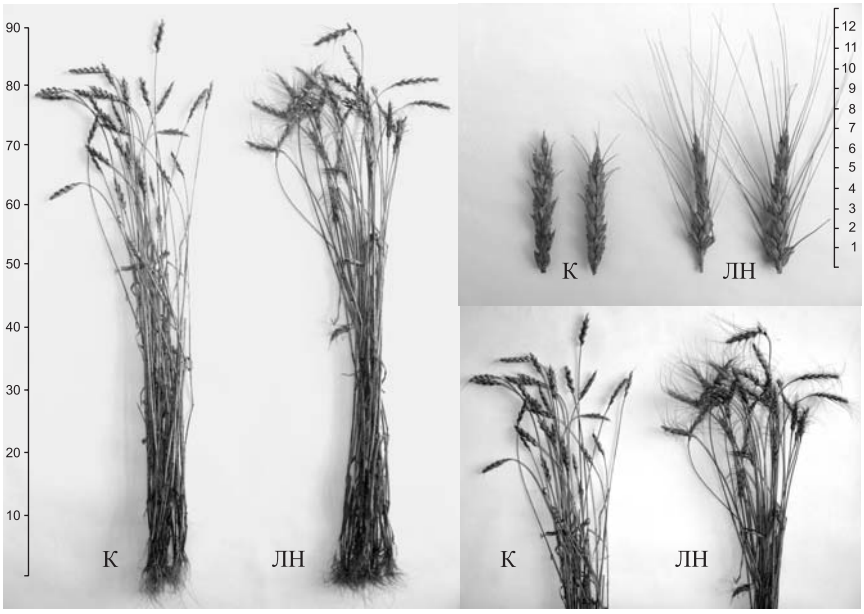


Рис. 3. Развитие остистости колоса в потомстве растения сорта озимой пшеницы Багратионовка, полученного методом «листовой няньки» (ЛН); К – контроль.

Таблица 4

Характеристики урожая озимой пшеницы Багратионовка и линий, полученных методом «листовой няньки» (ЛН)

Вариант		Высажено зерен	Число растений	Общий вес растений, г	Средний вес растений, г M ± m	Число зерен	Масса зерен		Масса 1000 зерен, г
							г	% от контроля	
Багратионовка (контроль, безостая)		300	300	640	2,1 ± 0,25	7240	259	100	35,7
ЛН-линии с ярко выраженной остистостью колоса	ЛН-1	300	260	950	3,7 ± 0,12	8900	456	176	51,2
	ЛН-2	300	256	680	2,7 ± 0,20	5230	268,2	104	51,3
	ЛН-3	300	222	834	3,8 ± 0,23	6602	365,4	141	55,3
	ЛН-4	300	254	800	3,1 ± 0,30	6421	318,4	123	49,6
	ЛН-5	300	255	740	2,9 ± 0,17	6049	310,5	120	51,3
	ЛН-6	300	290	640	2,2 ± 0,12	5267	255	98	48,4
	ЛН-7	300	265	585	2,2 ± 0,17	4910	244,5	94	50
	ЛН-8	300	223	940	4,1 ± 0,23	7466	410	158	54,9
	ЛН-9	300	233	1130	4,8 ± 0,23	9101	502,1	194	55,2
	ЛН-10	300	235	1180	4,9 ± 0,35	11245	508,5	196	45,2
	ЛН-11	300	175	1000	5,7 ± 0,29	8150	432	167	53
	ЛН-12	300	242	1240	5,1 ± 0,35	9958	539,2	208	54,1
	ЛН-13	300	240	884	3,7 ± 0,12	7120	385,4	149	54,1
	ЛН-14	300	244	616	2,5 ± 0,29	5292	255,2	99	48,2
	ЛН-15	300	250	692	2,8 ± 0,12	5364	260,8	101	48,6

с целью передачи им полезных признаков, таких, как высокая морозостойкость, устойчивость к болезням, высокое содержание белка и клейковины в зерне, многолетность (Размахнин, Чекуров, 2003б). Разрабатывается новое направление для передачи признака «высокая морозостойкость» от пырея пшенице методом «листовой няньки». С применением этого метода получены высокоурожайные ЛН-линии пшеницы. В целом на базе созданной коллекции растений пырея сизого и разработанных методов можно предложить технологию получения высокоморозостойких форм озимой пшеницы (рис. 4).

Благодарности

Работа частично финансировалась по программе фундаментальных исследований Президиума СО РАН № 62.

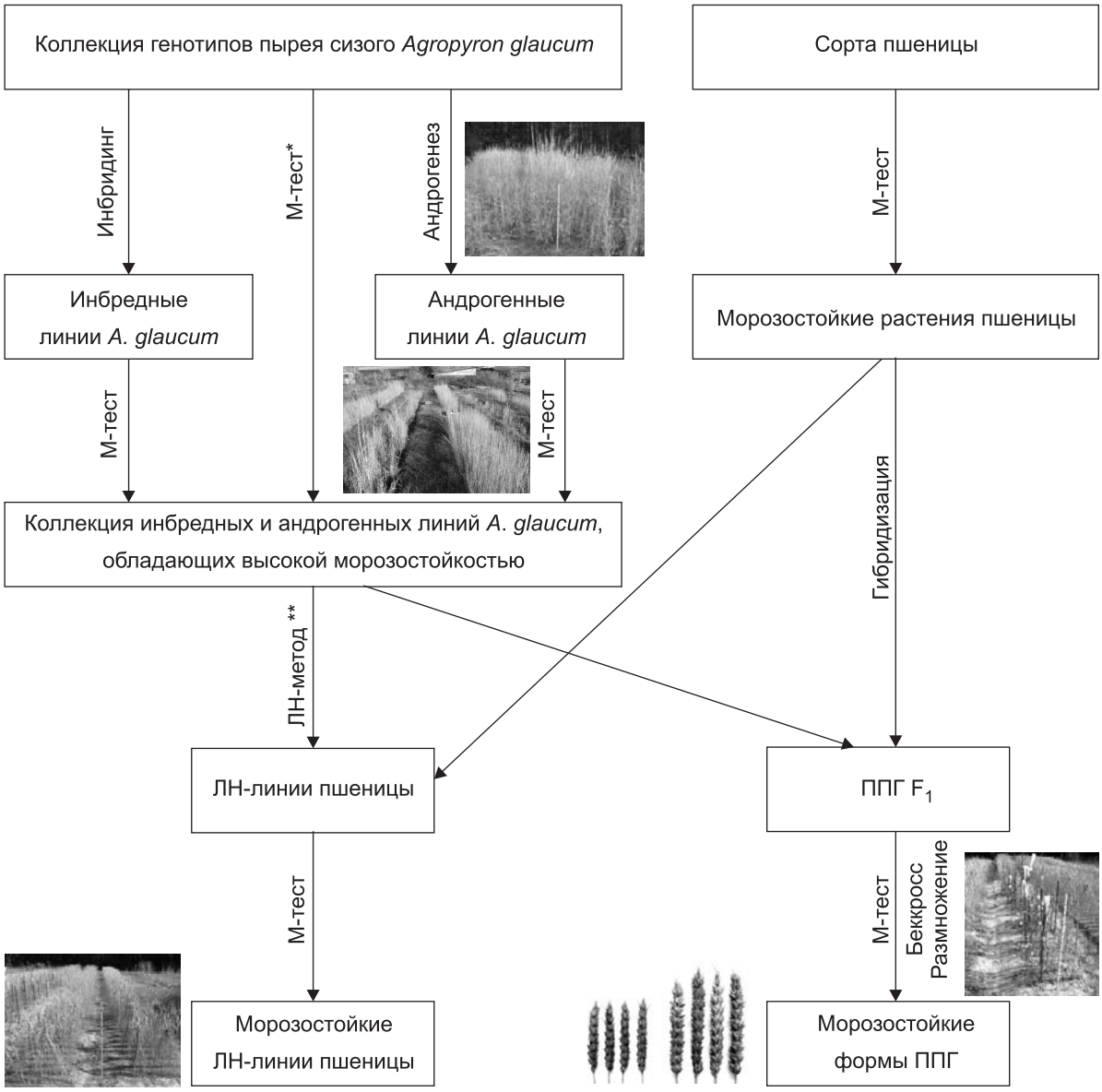


Рис. 4. Технология получения морозостойких форм пшеницы.

* М-тест – метод экспресс-анализа морозостойкости растений; ** ЛН-метод – метод «листовой няньки».

Литература

Гончаров Н.П., Гончаров П.Л. Методические основы селекции растений. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2009. 427 с.

Ницше В., Венцель Г. Гаплоиды в селекции растений. М.: Колос, 1980. 128 с.

Орлова А.М. Исследование генетической структуры восточно-казахстанской популяции пырея сизого *Agropyron glaucum* (Desf.) методом инбридинга: Автореф. дис. … канд. биол. наук. Новосибирск, 1988. 16 с.

Размахнин Е.П. Закономерности гаплопродукции в культуре пыльников пырея сизого *Agropyron glaucum* (Desf.): Автореф. дис. … канд. биол. наук. Новосибирск, 2003.

Размахнин Е.П. Генофонд пырея сизого как источник расширения биоразнообразия пшеницы // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 701–709.

Размахнин Е.П., Размахнина Т.М., Чекуров В.М. Эффект применения биостимуляторов в гаплоидной технологии // Матер. конф. «Биологические препараты растительного происхождения и их применение в технологии возделывания с.-х. культур». Бердск, 20–23 января 2004. Новосибирск, 2004. С. 67.

Размахнин Е.П., Размахнина Т.М., Чекуров В.М. Воздействие экстрактом из листьев пырея сизого увеличивает интенсивность роста и морозостойкость растений пшеницы // Матер. V Междунар. науч. конф. «Регуляция роста, развития и продуктивности растений». Минск, 28–30 ноября. 2007. С. 167.

Размахнин Е.П., Размахнина Т.М., Чекуров В.М., Козлов В.Е. Способ определения морозостойкости озимых зерновых культур. Патент № 2370942. Приоритет изобретения 04.06.2008. Опубл. 27.19.2009. Бюл. № 30.

Размахнин Е.П., Туллер Д.М., Велиев С.Н. и др. Влияние различных сред на выход каллюсов, эмбриоидов, альбиносных и зеленых растений в культуре пыльников пырея сизого *Agropyron glaucum* и удлиненного *Agropyron elongatum* // Онтогенетика высших растений: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. (17–18 октября 1989). Кишинев: Штиинца, 1989. С. 342.

Размахнин Е.П., Чекуров В.М. Разработка метода тестирования генотипов пырея сизого по параметрам гаплопродукции в культуре пыльников // Тр. междунар. науч.-практ. конф. «Приоритетные направления в селекции и семеноводстве с.-х. растений в XXI в.». Москва, 15–18 декабря, 2003а. С. 423–425.

Размахнин Е.П., Чекуров В.М. Применение гаплоидной биотехнологии и оригинальных биостимуляторов в отдаленной гибридизации пшеницы и пырея // Тр. междунар. конф. «Отдаленная гибридизация. Состояние и перспективы развития», посвященной 105-летию со дня рождения акад. Н.В. Цицина. Москва, 16–17 декабря 2003. М.: Изд. МСХА, 2003б. С. 208–212.

Размахнин Е.П., Чекуров В.М. Создание линейного материала пырея сизого для использования в отдаленной гибридизации с пшеницей // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Т. 2 / За ред. М.В. Роіка. К. КВЦ, 2004. С. 248–253.

Размахнин Е.П., Чекуров В.М. Эффективность получения гомозиготных линий пырея сизого методом инбридинга и андрогенеза *in vitro* // Тр. междунар. науч.-практ. конф. «Инновационные технологии в селекции и семеноводстве сельскохозяйственных культур». Москва, 7–9 августа. 2006а.

Размахнин Е.П., Чекуров В.М. Пути повышения морозостойкости пшеницы // Фактори експериментальної еволюції організмів. Зб. наук. пр. / За ред. М.В. Роіка.-К. КВЦ, 2006б. С. 154–159.

Цицин Н.В. Озимые пшенично-пырейные гибриды // Теория и практика отдаленной гибридизации. М.: Наука, 1981. 160 с.

Чекуров В.М., Орлова А.М. Выделение гомозиготных линий пырея сизого для скрещивания с мягкой пшеницей // С.-х. биология. 1982. Т. 17. № 1. С. 55–61.

Чекуров В.М., Козлов В.Е. Низкий метаболизм и высокая морозостойкость – важные компоненты выживаемости озимой пшеницы в Сибири // Матер. 1-й Центр.-Азиат. конф. по пшенице. Алматы, 2003. С. 222.

Чекуров В.М., Размахнин Е.П. Эффект применения препарата Новосил в биотехнологии, отдаленной гибридизации, сельском и приусадебном хозяйстве // Тез. семинара-совещания «Средства защиты растений, регуляторы роста, агрохимикаты и их применение при возделывании сельскохозяйственных культур». Анапа, 5–9 сентября 2005. С. 43–45.

Чекуров В.М., Размахнин Е.П., Размахнина Т.М. Эффект применения регуляторов роста в получении андрогенных линий пырея сизого *Agropyron glaucum* // Матер. I Междунар. конгр. «Биотехнология – состояние и перспективы развития». Москва, 14–18 октября, 2002. С. 130–131.

Chekurov V.M., Razmakhnin E.P. Effect of inbreeding and growth regulators on the *in vitro* androgenesis of wheatgrass, *Agropyron glaucum* // Plant Breeding. 1999. V. 118. P. 571–573.

Chuang Ch.-Ch., Ouyang T.-W. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Symp. on Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press, 1978. P. 51–56.

Galieva E.R., Razmakhnin E.P., Khristolubova N.B., Chekurov V.M. Ultrastructural organization of chloroplasts of green and albinous regenerant plants of wheatgrass // Proc. 1st Intern. Conf. Actual Problems of Agricult. Intensification. 22–25 June, 1993. Shorthandy. P. 79.

Horovitz N. Breeding of hybrids between Triticum and Agropyron species // Boletin Genetico. Instituto de Fitotechia. Castelav, 1969. No 6. P. 11–19.

Ockendon D.J. Genetic manipulation in plant // Plant Breeding. Walter and Gruyter CO. Berlin; N.Y. Printed in Germany, 1986. P. 256–271.

Razmakhnin E.P. Transfer of the character of frost resistance from the wheatgrass to wheat by the method of leaf nurse // Abstr. of Intern. Conf. «Plant Genetics, Genomics and Biotechnology». Novosibirsk, June 7–10. 2010. P. 75.

Razmakhnin E.P., Chekurov V.M. Androgenesis in wheatgrass *Agropyron glaucum* anther culture. Inducing effect of various sugars and growth regulators // Proc. 2nd Russian Symp. Trends in Plant Biotechnolodgy, 18–20 May 1993. Puschino, 1993. P. 209.

Razmakhnin E.P., Chekurov V.M. Novel patented biological

preparations from conifers and fungi: applications in biotechnology, distant hybridization and agriculture // Proc. 17th Intern. Conf. on Plant Growth Substances. 1–6 July, 2001. Brno. Czech Republic.

Razmakhnin E.P., Chekurov V.M. Development of haploid biotechnology for wheatgrass *Agropyron glaucum* (Desf.) // Abstr. 1st Central-Asian Wheat Conference. Almaty, June 10–13. 2003. P. 524.

Razmakhnin E.P., Razmakhnina T.M., Kozlov V.E. Influence of medium, physical and genetic factors on haplomorphogenesis in anther culture of the wheatgrass *Agropyron glaucum* (Desf.) // Abstr. of Intern. Conf. «Plant Genetics, Genomics and Biotechnology». Novosibirsk, June 7–10. 2010. P. 76.

Reinert J. Anther culture: haploid production and its significance (Applied and Fundamental Aspects of plant cell, tissue and organ culture /J. Reinert. 1977. P. 251–267.

Sopory S.K. Induction of haploids: achievements problems and possibilities // Sci. (India), 1983. V. 52. No 23. P. 1112–1113.

RAISE OF HIGH FROST-RESISTANT *AGROPYRON–TRITICUM* HYBRIDS

E.P. Razmakhnin, T.M. Razmakhnina, V.E. Kozlov, E.I. Gordeeva, N.P. Goncharov, G.Y. Galitsyn, S.G. Veprev, V.M. Chekurov

Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: eprazmakh@yandex.ru

Summary

One way of obtaining high-frost-resistant varieties of winter wheat is a wide hybridization with wild relatives, in particular, certain species of wheatgrass. The most promising frost resistance donor is *Agropyron glaucum* (Desf. ex DC) Roem. & Schult. (=Syn. *Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D.R. Dewey). A large collection of *Agropyron glaucum* genotypes was derived from the original material collected in Eastern Kazakhstan, at an elevated site with little snow, which suggested that they had high frost resistance. A biotechnological approach to obtaining pure androgenous wheatgrass lines via anther culture and an efficient method for rapid analysis of frost resistance in winter wheat, wheatgrass and other crops were developed. The said approach gave rise to androgenous lines with various wheat cultivars, and subsequent backcrossing yielded a diversity of wheat-wheatgrass hybrids. This material is currently being used for creation of frost-resistant varieties of winter wheat and for increasing wheat biodiversity. The described technology shortens the time for production of frost resistant wheat-wheatgrass hybrids to 2–3 years. In addition, experiments on frost resistance transfer from wheatgrass to wheat by means of the leaf nurse method were conducted. When ripe, a few frost-resistant lines of winter wheat obtained displayed elevated productivity and altered morphology of ears, which had long awns, inherited in the progeny. This material is now being studied and propagated.

Key words: *Agropyron glaucum*, wheatgrass, common wheat, frost resistance, androgenesis *in vitro*, wide hybridization, *Agropyron-Triticum* hybrids, «leaf nurse».

УДК 577.112.853:57.017.3:575.852’112

ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА И ОСОБЕННОСТИ ЭВОЛЮЦИИ АНТИФРИЗНЫХ БЕЛКОВ

© 2012 г. **Л.Л. Бильданова, Е.А. Салина, В.К. Шумный**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: larisab@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 26 декабря 2011 г. Принята к публикации 1 февраля 2012 г.

Антифризные белки представляют собой класс белков, синтезируемых пойкилотермными организмами при холодовом стрессе. Эти белки имеют разное эволюционное происхождение, отличаются по первичной и вторичной структуре, механизму регуляции, однако все они имеют общее качество – способность адсорбироваться на поверхность кристаллов льда и модифицировать их рост. В обзоре с акцентом на злаковые растения, в том числе пшеницу, обобщены данные о происхождении антифризных белков, их таксономическом распространении, свойствах и особенностях функционирования.

Ключевые слова: антифризные белки (АФП), термогистерезис, ингибирование рекристаллизации льда, холодовая акклимация, закаливание, морозоустойчивость, злаки, пшеница.

Антифризные белки (АФП), или антифризные гликопротеины (АФГП), являются важными элементами низкотемпературной адаптации (Ewart *et al.*, 1999; Griffith, Yaish, 2004; Трунова, 2007). Действующая концентрация АФП в 300–500 раз ниже, чем других антифризных веществ (Zachariassen, Kristiansen, 2000). Способность находиться в свободном состоянии в водных растворах, а затем необратимо связываться с водой в ее твердом состоянии является определяющим физическим свойством АФП (Jia, Davies, 2002). Адсорбция АФП на поверхности льда приводит к разнице между температурой замерзания и температурой плавления, или термогистерезису (ТН), а также торможению рекристаллизации льда (IRI, ice recrystallization inhibition) (Knight *et al.*, 1984). Термогистерезисная, или антифризная, активность АФП – способность понижать температуру замерзания раствора без существенного влияния на температуру плавления. IRI-активность АФП позволяет уменьшить механическое повреждение тканей, препятствуя рекристаллизации – термодинамически обусловленному процессу непрерывного роста крупных кристаллов льда за счет более мелких в процессе замораживания. Некоторые авторы считают некорректным употребление термина «антифризные» в ситуации, когда возможно образование льда, и предлагают другие названия: «связывающиеся со льдом белки» (ice-binding proteins – IBPs) (Janech *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2011), «лед-активные белки» (IAPs, ice-active proteins) (Wharton *et al.*, 2005). Встречаются предложения изменить название для более точного отражения основной функции изучаемых протеинов. Например, «белки термогистерезиса» (THP – thermohisteresis protein) (Ewart *et al.*, 1999; Barrett, 2001) или «белки ингибиторы рекристаллизации льда» (IRIP) (Knight *et al.*, 1995).

Первые АФП описаны более 40 лет назад (DeVries, Wohlschlag, 1969). С тех пор выявлено множество их типов у представителей разных таксонов (табл. 1) (Jia, Davies, 2002). Судя по вариабельности связывающихся со льдом белков и их неупорядоченному филогенетическому распространению, эти белки возникали независимо, в основном как инструмент приспособления вида к новой экологической нише или в связи с изменениями климата (Cheng, 1998; Doucet *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2010).

Биологическое значение АФП

Наиболее изучены АФП рыб полярных и приполярных регионов, описаны пять типов АФП рыб – типы I–IV и АФГП (табл. 1) (Jia, Davies, 2002; Harding *et al.*, 2003). В крови рыб концентрация АФП достигает 10–40 мг/мл (Graham *et al., 2008b*). АФП идентифицированы у различных членистоногих: пауков, клещей, коллембол и у более чем 50 видов насекомых (Duman *et al., 2004*; Graham, Davies, 2005). Об антифризной активности у растений впервые было сообщено в работе M. Urrutia с соавт. (1992), и с тех пор АФП были найдены у многих зимующих видов сосудистых растений, в том числе у папоротников, голосеменных, однодольных и двудольных покрытосеменных (Urrutia *et al.*, 1992; Duman, Olsen, 1993; Doucet *et al.*, 2000; Jarzabek *et al*., 2009). АФП также обнаружены у бактерий (Raymond *et al.*, 2007), водорослей (Raymond, Knight, 2003), грибов (Xiao *et al.*, 2010) и нематод (Wharton *et al.*, 2005). ТН-активность варьирует от 0,1–0,6 °С у растений (Urrutia *et al.*, 1992; Worrall *et al.*, 1998) до 5–7 °С в гемолимфе многих зимующих жуков (Duman *et al.*, 2004). Основные характеристики АФП суммированы в табл. 1.

Виды, способные к накоплению АФП, можно разделить на две группы: избегающие замерзания (freeze avoidant) и морозоустойчивые (freeze tolerant). Избегающие замерзания виды могут предотвращать замерзание жидкостей организма в целом и способны к значительному переохлаждению, т. е. температура жидкостей в их организме ниже температуры замерзания. АФП препятствуют замораживанию, спровоцированному внешним льдом, и стабилизируют переохлажденное состояние путем инактивации нуклеаторов льда (DeVries, 1986; Zachariassen, Kristiansen, 2000). Зимующий жук *Rhagium inquisitor* избегает замерзания, накапливая антифризные агенты во внутриклеточной жидкости, кишечной жидкости и гемолимфе (Kristiansen *et al.*, 1999).

Морозоустойчивые виды выживают при образовании льда в организме, при этом центры образования льда локализованы в межклеточных, внеорганных областях или полостях организма. Общепризнано, что образование внутриклеточного льда смертельно для любого организма (Самыгин, 1997). Единственным исключением является антарктическая нематода *Panagrolaimus davidi*, которая при резком снижении температуры демонстрирует предохранительное, превентивное (inoculative), замерзание, в результате которого становится более морозоустойчивой и выживает при внутриклеточном образовании льда (Wharton *et al.*, 2005).

Антифризная активность наблюдается в разных частях зимующих растений, включая семена, стебли, узлы кущения, кору, ветки, почки, черешки, пластинки листьев, цветы, ягоды, корни, корневища и клубни (Urrutia *et al.*, 1992; Duman, Olsen, 1993; Doucet *et al.*, 2000). Многим растениям для развития морозоустойчивости необходимо пройти период холодовой акклимации, или закаливания (Трунова, 2007). У озимой ржи при холодовой акклимации АФП накапливаются в апопласте листьев и узле кущения. Методом иммунолокализации показано, что АФП связаны с эпидермисом и мезофильными клетками, окружающими межклеточное пространство (Antikainen *et al.*, 1996). Эта локализация соответствует известным местам формирования льда на поверхности листьев и межклеточном пространстве мезофилла и подтверждает, что АФП могут предотвращать замерзание клеток вследствие контакта с внешним льдом (Antikainen *et al.*, 1996). У персика был выявлен белок из группы дегидринов растений, имеющий антифризную активность, он оказался распределен по всей цитоплазме, пластидам и ядрам клеток ксилемы и клеток паренхимы коры (Wisniewski *et al.*, 1999).

При наличии нуклеаторов льда АФП снижают температуру замерзания листьев закаленной ржи примерно на 1 °С. Исследования *in vitro* показали, что апопластные белки, извлеченные из листьев закаленной озимой ржи, тормозят рекристаллизацию льда, а также замедляют темпы миграции льда через насыщенную раствором фильтровальную бумагу. Роль АФП растений, таким образом, состоит в том, чтобы непосредственно взаимодействовать со льдом и уменьшить повреждения, замедляя рост и рекристаллизацию льда (Moffatt *et al.*, 2006). Во время низкотемпературной акклимации накопление АФП коррелирует с повышенным уровнем морозостойкости у озимых и яровых

Таблица 1

Характеристика АФП

Вид	Мв, кДа	ТН, °С	Особенности структуры	Литературный источник
Костистые рыбы				
АГФП нототеноидные рыбы (*Notothenia coriiceps neglecta*, *Dissostichus mawsoni*, *Pagothenia borchgrevinki*), тресковые	2,6–33	1,2	$(Ala\text{-}Ala\text{-}Thr)_n$; n = 4–50; линейный белок/левозакрученная тройная спираль; дисахарид (b-D-галактозил-(1-3)-a-N-ацетил-D-галактозамин) связан с остатком Thr	Hsiao *et al*., 1990; Harding *et al*., 2003
I тип АФП керчак *Myoxocephalus scorpius*, зимняя камбала *Pseudopleuronectes americanus*, губан *Tautogolabrus adspersus*	3,3–4,5	0,04–0,67	обогащенный Ala-повтор из 11 а.о.; α-спираль	Harding *et al*., 1999; Wierzbicki *et al*., 2008; Hobbs *et al*., 2011
II тип АФП морской ворон *Hermitripterus americanus*, атлантическая сельдь *Clupea harengus*, американская корюшка *Osmerus mordax*	11–24	0,13	обогащенный Cys белок с дисульфидными связями; лектиноподобный; Ca^{2+}-зависимый и Ca^{2+}-независимый, глобулярный с участками α-спиралей и β-листов, образует димеры, может содержать олигосахариды	Wierzbicki *et al*., 1997
III тип АФП бельдюги *Macrozoarces americanus*, *Rhigophila dearborni*; зубатки *Anarhichas* sp.	6,5 7, 14	0,53	компактный глобулярный с короткими участками β-листов	Miura *et al*., 1999; Baardsnes *et al*., 2003
IV тип АФП *Myoxocephalus octodecimspinosis*, *Pleuragramma antarcticum*, *Notothenia coriiceps*	12,3	0,08–0,5	17 % Glu; пучок из 4 антипараллельных α-спиралей; гомологичен аполипопротеину	Davies, Sykes, 1997; Lee *et al*., 2011
Гиперактивный АФП зимней камбалы *Pleuronectes* sp.	16,7	2,2	60 % Ala; α-спираль; образует димеры	Marshall *et al*., 2005; Gauthier *et al*., 2005
Членистоногие				
Рагий ребристый *Rhagium inquisitor*	12,8	7,7	6 рассеянных повторов 13 а.о., мотив Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr в центральной части повтора; 1 дисульфидный мостик	Kristiansen *et al*., 1999, 2011; Zachariassen *et al*., 2002
Чернотелка узкая *Anatolica polita*	30	0,45	обогащен Cys; повтор Thr–Cys–Thr; β-спираль	Mao *et al*., 2011
Большой мучной хрущак *Tenebrio molitor*	8,5	2,5–5,5	обогащен Tre, Cys; правозакрученная β-спираль на основе повторов из 12 а.о.; много цистеиновых мостиков	Graham *et al*., 1997; Liou *et al*., 1999
Dendroides canadensis	7,3–16,2	5–6 (8–9)	повтор Thr–Cys–Thr; правозакрученная β-спираль на основе повторов по 12 и 13 а.о.; много цистеиновых мостиков	Duman *et al*., 2002
Почкоед еловый *Choristoneura fumiferana*	9, 12		левозакрученная β-спираль; повтор 15 а.о. (Thr–X–Thr); β-спирали имеют поперечные секции и формируют параллельные β-слои	Graether *et al*., 2000, 2003; Qin *et al*., 2007

Окончание таблицы 1

Вид	Мв, кДа	ТН, °С	Особенности структуры	Литературный источник
Пяденица *Campaea perlata*	3,5; 8,3	6,4	обогащен Thr и Ala; β-спираль	Lin *et al*., 2011
Снежная блоха (коллембола) *Hypogastrura harveyi*; *Gressittacantha terranova*	6,5 15,7	4	45 % Gly; трипептидные повторы Gly – x_1–x_2, (x_1 – G, x_2 – Ala или Val); 2 дисульфидных мостика, 6 полипролиновых спиралей II типа в антипараллельной ориентации	Graham, Davies, 2005; Mok *et al*., 2010; Hawes *et al*., 2011
Круглые черви				
Антарктическая нематода *Panagrolaimus davidi*	15	0,03	–	Wharton *et al*., 2005
Растения				
Морковь *Daucus carota*	36	0,35	74 % Leu-богатых повторов (LLR); гликозилирован	Zhang *et al*., 2004
Райграс пастбищный *Lolium perenne*	13,5 29	0,1	β-спираль; LLR повторы; гликозилирован	Griffith, Yaish, 2004; Zhang *et al*., 2010
Мягкая пшеница *Triticum aestivum*	26,8, 40,7	–	2 или 8 LLR повтора	Tremblay *et al*., 2005
Рожь посевная *Secale cereale*	16–35	0,3	белки устойчивости к патогенам с ферментативной активностью	Hon *et al*., 1995
Луговик антарктический *Deschampsia antarctica*	22	–	1–9 LRR и 16 ‘IRIP’ повторов	John *et al*., 2009
Паслен сладко-горький *Solanum dulcamara*	67	0,4	24 % Gly; на С-конце 10 повторов из 13 а.о.; гликозилирован	Urrutia *et al*., 1992; Duman, 1994
S. dulcamara	47, 29	0,4	хитиназоподобный	Duman, 1994
Ammopiptanthus mongolicus	50	0,35	гликозилирован	Fei *et al*., 2008
Ели *Picea abies*, *P. pungens*	27–30	2	хитиназоподобные	Jarząbek *et al*., 2009
Диатомовые водоросли	24	2,5	–	Raymond, Knight, 2003; Bayer-Giraldi *et al*., 2011
Грибы				
Antarctomyces psychrotrophicus	28	0,42	обогащен Thr; гликозилирован	Xiao *et al*., 2010
Снежная плесень *Typhula ishikariensis*, *Coprinus psychromorbidus*	23	0,3–2?*	–	
Дрожжи *Leucosporidium*	26,8	0,7	–	Lee *et al*., 2010
Бактерии				
Marinomonas primoryensis	1000	2	тандемный повтор 104 а.о.; повтор из 19 а.о.; β-спиральные участки; Ca^{2+}-зависимый	Gilbert *et al*., 2005
Colwellia	26	< 0,1	первичная структура гомологична аналогичным белкам из снежной плесени и диатомовых водорослей	Raymond *et al*., 2007

* Данные в разных источниках отличаются; прочерк – нет данных, Мв – молекулярный вес; ТН – величина термогистерезиса; а.о. – аминокислотные остатки.

сортов ржи, пшеницы и ячменя (Antikainen, Griffith, 1997; Tremblay *et al.*, 2005).

Отметим, что выделенные из закаленных листьев ржи АФП относятся к трем классам белков устойчивости к патогенам (pathogenesis-related – PR): хитиназам (chitinase-like proteins – CLP), β-1,3-глюканазам (GLP) и тауматинам (TLP) (Hon *et al.*, 1995). Часть этих АФП имеет как антифризную, так и ферментативную активности (Hon *et al.*, 1995; Yaish *et al.*, 2006). Таким образом, АФП озимой ржи играют роль в морозоустойчивости и неспецифической устойчивости к болезням (Griffith, Yaish, 2004).

АФП найдены и у теплолюбивых организмов, в этом случае АФП уменьшают активность случайных и трудно устранимых нуклеаторов льда при внезапном уменьшении температуры окружающей среды (Parody-Morreale *et al.*, 1988). Кроме того, АФП играют криопротекторную роль в отношении некоторых мембран, предотвращая фазовый переход липидов и стабилизируя кальциевые каналы (Barrett, 2001).

АФП работают в сочетании с белковыми нуклеаторами льда, что позволяет организму контролировать скорость роста льда в процессе замораживания (Zachariassen, Kristiansen, 2000). Интересно, что у ризобактерии *Pseudomonas putida*, распространенной в арктических районах Канады, обнаружен АФП (164 кДа), связанный с углеводным и липидным фрагментами, который имеет и антифризную, и нуклеирующую активности (Moffatt *et al.*, 2006).

Свойства АФП предотвращать нуклеацию льда, тормозить рост кристаллов льда, ингибировать рекристаллизацию и защищать клеточные мембраны от повреждений (Kristiansen, Zachariassen, 2005; Pertaya *et al.*, 2008) могут быть использованы при хранении продуктов питания, в сельскохозяйственном производстве и для криоконсервации клеток и органов в медицине (Zhang *et al.*, 2007). Показано, что при замерзании и оттаивании в присутствии АФП рыб клетки млекопитающих, такие, как ооциты крупного рогатого скота, тромбоциты человека, эмбрионы мыши, сперматозоиды барана и клетки печени крыс, демонстрируют повышение уровня выживаемости и восстановления нормального функционирования (Fletcher *et al.*, 1999). Ведутся работы по синтезу модифицированных АФП с оптимизированной для конкретных условий структурой (Tam *et al.*, 2009), трансформации растений и животных чужеродными генами АФП для повышения их устойчивости к низким температурам (Griffith, Yaish, 2004).

Таким образом, АФП выявлены у видов с разной стратегией выживания при понижении температуры окружающей среды. АФП накапливаются в местах наиболее вероятного образования льда, направляют и тормозят рост массивов льда внутри организма. Кроме того, АФП могут иметь дополнительные функции, способствующие выживанию при нехватке влаги или воздействии патогенов.

Механизм действия

В отличие от большинства растворяемых веществ, которые вытесняются фронтом льда в процессе замораживания, АФП необратимо связываются с поверхностью льда и включаются в состав кристаллической решетки льда (DeVries, 1986). Связывание со льдом стабилизируется сочетанием ван-дер-ваальсовых взаимодействий и водородных связей, возникающих за счет стратегически расположенных в соответствии с шагом решетки льда аминокислотных остатков (Jia, Davies, 2002). АФП специфически адсорбируются на определенные грани кристаллов льда (рис.) и поверхности малых льдоподобных кластеров молекул воды (зародышевых кристаллов или ядер), сформированных нуклеаторами льда (Graether, Sykes, 2004).

Антифризная активность фиксируется при микроскопировании водных растворов АФП по изменению морфологии кристаллов льда в процессе их роста (рис.) (Knight *et al.*, 1991) и при измерении нелинейного уменьшения температуры замерзания растворов (Kristiansen, Zachariassen, 2005). Форма кристаллов зависит от концентрации АФП и специфической активности конкретных изоформ (Meyer *et al.*, 1999). Для определения граней кристалла льда, с которыми связываются АФП, используют выращивание ледяной полусферы из единственного кристалла льда в растворе АФП низкой концентрации. Места адсорбции АФП видны невооруженным глазом как участки матовой поверхности на прозрачной ледяной полусфере (Knight, DeVries, 2009). Этим методом показано, что АФП I типа зимней камбалы связываются с

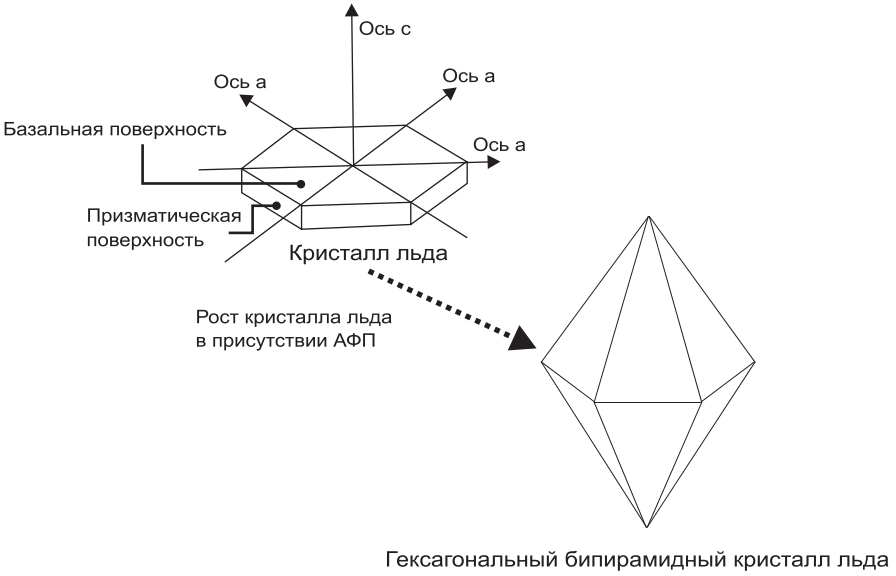


Рис. Схематическое изображение роста кристалла льда в растворе АФП.

12 гранями бипирамидального кристалла, тогда как АФП I типа керчаков связываются только с 6 гранями (Harding *et al.*, 1999).

Характер взаимодействия белка или углеводов со льдом во многом остается в области предположений (Garnham *et al.*, 2011), хотя были получены доказательства в пользу механизма адсорбционного ингибирования (Knight *et al.*, 1991; Pertaya *et al.*, 2007). Анализ АФП рыб, насекомых и растений показал, что, несмотря на сходство отдельных элементов, нет никакой консенсусной последовательности или единой структуры для льдосвязывающих доменов (Jia, Davies, 2002) (табл. 2), и что некоторые АФП меняют конформацию при низких температурах (Uda *et al.*, 2007). Поэтому не представляется возможным по структурным особенностям белков выявить новые АФП в базах данных; единственный способ обнаружить АФП – проанализировать способность белка связываться со льдом.

Эксперименты по замещению различных остатков в последовательностях АФП I типа рыб и АФП насекомых убедительно доказали, что гидрофобные взаимодействия, обеспечиваемые метильной группой остатков Thr, имеют решающее значение для связывания этих АФП со льдом (Baardsnes *et al.*, 1999; Leinala *et al.*, 2002a; Wierzbicki *et al.*, 2008). Однако в случае АФГП показано, что гидрофильные взаимодействия являются необходимым условием адсорбции на решетку льда (Knight *et al.*, 1991; Tam *et al.*, 2009). В последнее время была изучена гидратация АФГП и продемонстрирована ее роль в механизме действия АФП/АФГП (Ebbinghaus *et al.*, 2010).

В отличие от АФП рыб и насекомых целый ряд АФП растений имеет множественные гидрофильные сайты связывания со льдом (Griffith, Yaish, 2004; John *et al.*, 2009; Laursen *et al.*, 2011). Например, АФП пшеницы имеют 2 сайта связывания со льдом, комплементарных призматической поверхности льда и расположенных напротив друг друга (Tremblay *et al.*, 2005).

Поиск общего механизма связывания АФП со льдом осложнен вариабельностью структуры этих белков и тем, что они распознают различные по структуре поверхности кристалла льда. Тем не менее некоторые общие свойства и закономерности были выявлены. Сайты связывания со льдом, как правило, плоские, относительно гидрофобные и занимают большую часть поверхности белка (Davies *et al.*, 2002). Для создания более четкого представления необходимо охарактеризовать большее количество АФП.

Свойства АФП и влияние различных факторов на их проявление

Разные виды активности, TH и IRI, проявляются у конкретных АФП в разной степени, взаимосвязь между TH- и IRI-активностями остается предметом изучения (Yu *et al.*, 2010). Не-

Таблица 2

Число генов, возможные эволюционные предшественники,
особенности сайтов связывания со льдом АФП рыб, насекомых и растений

Белок	Количество генов	Гомологичные белки	Сайт связывания со льдом	Литературный источник
АГФП (тресковые, нототеноидные рыбы)	41*	трипсиноген-подобная протеаза	повторы Gal-GalNAc	Cheng, 1998
I тип АФП рыб (керчак, зимняя камбала)	80–100	белки хориона и кератина *Liparis atlanticus*	повторяющиеся консервативные Thr, Ala	Evans, Fletcher, 2005; Hobbs *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2009
II тип АФП рыб (морской ворон, атлантическая сельдь, американская корюшка)	15	лектин С-типа животных	сайт связывания Ca^{2+}, плоская гидрофобная поверхность	Nishimiya *et al*., 2008
III тип АФП рыб (бельдюги, зубатки)	30–150	синтаза силовой кислоты (SAS)	β-спираль на С-конце	Deng *et al*., 2010; Zhang *et al*., 2009
IV тип АФП рыб (бычки)	небольшое семейство	аполипопротеин	–	Davies, Sykes, 1997
Гиперактивный АФП I типа рыб (зимняя камбала)	–	АФП I типа зимней камбалы	консервативные Thr, Ala в повторе	Marshall *et al*., 2005
АФП моли (еловый почкоед *C. fumiferana*, пяденица *C. perlata*)	17	–	‘Thr-X-Thr’ мотив, β-спираль левозакрученная	Tyshenko *et al*., 1997
АФП жуков (*D. canadensis, T. molitor*)	12; 30–50	–	‘Thr-X-Thr’ мотив, β-спираль правозакрученная	Graham *et al*., 1997
АФП жуков (рагий ребристый)	семейство	–	6 Thr-X-Thr-X-Thr-X-Thr мотивов, β-спираль	Kristiansen *et al*., 2005, 2011
АФП снежной блохи	2	–	широкая поверхность из β-спиралей	Mok *et al*., 2010
Хитиназа-АФП (рожь посевная, мягкая пшеница, паслен сладко-горький)	небольшое семейство	эндохитиназы I и II класса	–	Hon *et al*., 1995; Yeh *et al*., 2000; Duman, 1994; Winfield *et al*., 2010
Глюканаза-АФП (рожь посевная)	небольшое семейство	эндоглюконаза	не пересекается с гидролитическим сайтом	Hon *et al*., 1995; Yaish *et al*., 2006
Тауматин-АФП (рожь посевная)	небольшое семейство	тауматин	–	Hon *et al*., 1995
IRIP злаков **	2–15	киназа рецептора фитосульфокина риса	β-спираль; два гидрофильных сайта	Tremblay *et al*., 2005; Middleton *et al*., 2009; John *et al*., 2009
DcAFP (морковь)	1	ингибитор полигалактурназы	–	Smallwood *et al*., 1999; Zhang *et al*., 2004
STHP-64 (паслен сладко-горький)	1	WRKY (фактор транскрипции)	–	Huang, Duman, 2002

***** Полипротеин из 41 копии гена; ****** TaIRI (мягкая пшеница), LpAFP (райграс пастбищный), DaIRIP (луговик антарктический).

которые мутантные АФП без ТН-активности, но имеющие ту же форму и размер, теряют и способность ингибировать рекристаллизацию, что говорит об общей значимой структуре для обеих функций (Knight *et al.*, 1995). Это подтверждает существование обратной зависимости между уровнем ТН и размером кристаллов льда, т. е. чем меньше размер кристаллов льда, тем больше ТН-эффект (Kristiansen *et al.*, 2005).

Некоторые АФП отличаются очень высокой ТН-активностью (4-6 °С) при субмиллимолярных концентрациях, их называют «гиперактивными» (Graham *et al.*, 1997). Гиперактивные АФП и умеренно активные АФП, кроме разницы в их ТН-активности, отличаются и по картине роста кристаллов льда после превышения порога ТН, когда поверхностно адсорбированные АФП уже не в состоянии предотвратить нарастание льда. Умеренно активные АФП направляют рост спикул льда вдоль с-оси кристалла льда, тогда как все гиперактивные АФП способствуют росту вдоль а-оси, приводя к появлению дендритных кристаллов (Scotter *et al.*, 2006). Кроме того, эксперименты по выращиванию макроскопических кристаллов льда показали, что более высокая активность гиперактивных АФП является результатом адсорбции как на призматические плоскости кристалла льда, так и на базальные (Scotter *et al.*, 2006; Mok *et al.*, 2010). Негиперактивные АФП не связываются с базальной плоскостью (Knight *et al.*, 1991; Pertaya *et al.*, 2008).

Не удалось выявить корреляцию между высокой ТН-активностью и высокой IRI-активностью, гиперактивные АФП и АФП со средней активностью имеют примерно одинаковую IRI-активность (Yu *et al.*, 2010). Важно отметить, что в экспериментах по направленному мутагенезу при значительном изменении связывающихся со льдом остатков в структуре АФП уменьшалась как ТН-, так и IRI-активность, показывая, что одни и те же аминокислотные остатки имеют решающее значение для обоих видов активности. Кроме того, ионы бикарбоната, повышающие ТН-активность АФП, также повышают IRI-активность. Предполагается, что гиперактивные и негиперактивные АФП отличаются по площади сайта связывания со льдом, а также по стабильности связи АФП и льда в условиях переохлаждения и рекристаллизации (Yu *et al.*, 2010).

Исследования показали зависимость уровня ТН-активности от ряда факторов, которые включают как вариации структуры АФП, так и влияние различных веществ, к которым относятся низкомолекулярные соединения (Li *et al.*, 1998; Graether *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2007; Kristiansen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), различные белки (Nishimiya *et al.*, 2008), в том числе другие АФП (Amornwittawat *et al.*, 2008). Добавление солей приводит к повышению активности ТН в несколько раз (Evans *et al.*, 2007), возможно, это происходит за счет снижения растворимости белка (Kristiansen *et al.*, 2008). Отметим, что антифризная активность увеличивается в присутствии эндогенных низкомолекулярных полиолов, которые накапливаются у многих организмов при низкотемпературной адаптации (Li *et al.*, 1998).

Важный результат получен в эксперименте по переносу генов АФП жука *Dendroides canadensis* в геном *Drosophila melanogaster*. Выяснилось, что совместное введение двух генов приводило к большему ТН, чем введение одного из этих генов (Lin *et al.*, 2010). Эти данные согласуются с наблюдаемым у зимующей личинки *Dendroides canadensis* очень высоким значением ТН (3–5 °С) и присутствием в гемолимфе множественных изоформ АФП, которые, очевидно, усиливают действие друг друга (Amornwittawat *et al.*, 2008).

Кроме того, в гемолимфе *Dendroides canadensis* обнаружено наличие тауматиноподобного белка-усилителя АПФ и высокой концентрации глицерина (0,5–1,0 М). Глицерин повышает активность АФП путем стимуляции взаимодействия между разными изоформами, так как при его добавлении в раствор, содержащий одну изоформу, эффект отсутствовал (Wang, Duman, 2006). Наличие в организме усилителей АФП приводит к тому, что ТН-активность очищенного единичного DAFP ниже, чем ТН в гемолимфе (Amornwittawat *et al.*, 2008).

Наиболее эффективным низкомолекулярным усилителем является цитрат натрия. В присутствии цитрата натрия ТН-активность гемолимфы жука *Dendroides canadensis* увеличилась в 6 раз (Li *et al.*, 1998). Эксперименты показали, что концентрация низкомолекулярных усилителей, необходимая для повышения активности, составляет около 250–500 мМ (Amornwittawat

et al., 2008). Глицерин оказался единственным усилителем, который естественным образом присутствует в достаточно высоких концентрациях у *D. canadensis*.

Влияние увеличения сайта связывания со льдом на ТН-активность за счет олигомеризации показано при изучении естественных и синтезированных искусственных мультимеров АФП рыб III типа (Baardsnes *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2009). Оказалось, что ТН возрастает пропорционально размеру мультимеров, при этом каждый мультимер придает кристаллу льда уникальную форму, представляющую собой измененный вариант изначальной бипирамиды (Zhang *et al.*, 2009). Аналогичное явление наблюдалось в растворах синтезированных аналогов малых АФГП рыб с концентрацией белка > 20 mM, в которых образуются димеры и наблюдаемая при этом ТН активность намного выше, чем в растворах с меньшими концентрациями, при которых не происходит агрегация белков. Этот факт свидетельствует о кооперативном характере функционирования низкомолекулярных АФГП. Взаимодействие наблюдается также между АФГП разных фракций (Bouvet *et al.*, 2006).

Интересно, что АФП с отличающимися лед-связывающими доменами могут образовывать олигомеры разного состава, что позволяет увеличивать вариабельность и число лед-связывающих доменов, как показано в случае АФП озимой ржи (*Secale cereale*) (Griffith, Yaish, 2004). Листья закаленной ржи содержат 6 апопластных полипептидов с различной комбинацией глюканазоподобных, хитиназоподобных и тауматиноподобных АФП в комплексе с другими неизвестными белками (Antikainen, Griffith, 1997). Формируя олигомерные комплексы, АФП могут образовывать более протяженные поверхности для взаимодействия со льдом, или они могут просто увеличить массу связанного со льдом белка. В любом случае комплексы АФП могут подавлять рост льда и перекристаллизацию более эффективно, чем отдельные полипептиды.

АФП часто представлены в организме несколькими изоформами, отличными по структуре, молекулярной массе, сродству к поверхностям кристалла льда и месту функционирования (DeVries, 1986; Knight *et al.*, 1991; Ewart *et al.*, 1999), кроме того, в геноме обнаруживаются множественные копии генов АФП (табл. 2). Например, у зимней камбалы *Pseudopleuronectes americanus* есть два аналогичных семейства АФП генов. Гены одного из семейств экспрессируются в печени и кишечнике, при этом белки накапливаются в крови и кишечной жидкости, гены другого семейства функционируют в поверхностных тканях, таких, как кожа, чешуя, плавники и жабры (Gong *et al.*, 1996).

Многие семейства АФП включают изоформы с дополнительными повторами и повышенной активностью (Harding *et al.*, 1999). Впервые это было показано на примере АФГП рыб (Wu *et al.*, 2001). Треска *Gadus ogac*, например, синтезирует большое количество изоформ АФГП, и оценка термогистерезисной активности различных изоформ показала, что АФГП с более низким молекулярным весом имеют меньшую активность, при этом аминокислотный состав не имел существенного значения (Harding *et al.*, 2003). Принимая во внимание предполагаемую линейную структуру АФГП, предполагают, что изоформы с более низкой молекулярной массой, скорее всего, короче. Таким образом, существует связь между длиной АФГП и активностью. Изоформа АФП I типа зимней камбалы с 4 тандемными 11-аминокислотными повторами в два раза более активна, чем изоформа с 3 повторами (Evans, Fletcher, 2005).

Изучение структуры больших изоформ позволяет объяснить это наблюдение: область предполагаемого сайта связывания льда в больших изоформах снежной блохи примерно в два раза больше, чем у меньших изоформ (Lin *et al.*, 2007), а большая изоформа АФП *Choristoneura fumiferana* имеет в три раза большую ТН-активность и 2 дополнительных витка внутри β-спирали, являющейся сайтом связывания со льдом (Leinala *et al.*, 2002b). Показано, что большее число Thr-X-Thr-мотивов в сайте связывания льда у АФП насекомых увеличивает результирующую антифризную активность (Graether *et al.*, 2000; Leinala *et al.*, 2002b; Marshall *et al.*, 2004; Kristiansen *et al.*, 2011).

Регуляция синтеза АФП

Для развития устойчивости к низкотемпературному стрессу требуется воздействие низкой положительной температуры, которая выше температуры замерзания, что позволяет

организму подготовиться к последующему воздействию летальных низких температур (Antikainen, Griffith, 1997). Во многих случаях АФП синтезируются сезонно или на определенной стадии развития организма, т. е. регулируются онтогенетически (Barrett, 2001).

Костистые рыбы. Различные виды рыб имеют особенности стратегии сезонного регулирования синтеза АФП (Fletcher *et al.*, 2001). Некоторые начинают синтез АФП перед наступлением холодов, другие – только в ответ на понижение температуры, в то время как отдельные виды могут синтезировать АФП постоянно.

В крови нототениевых рыб уровень антифризных гликопротеидов (АФГП) снижается при тепловой акклимации (4 °C) в течение 16 недель, но количество крупных компонентов АФГП уменьшается незначительно (на 20 %), в отличие от малых АФГП (на 60 %) (Jin, DeVries, 2006). А в крови бельдюги *Lycodichthys dearborni* высокий уровень белков семейства АФП III типа сохраняется на протяжении года (Wang *et al.*, 1995). На примере мальков нототениевых рыб показано, что далеко не все антарктические рыбы на ранних стадиях жизненного цикла обладают АФП (Cziko *et al.*, 2006; Bilyk, DeVries, 2011). По-видимому, мальки рыб, у которых АФП не обнаружены, используют другие механизмы защиты.

Синтез АФП у зимней камбалы регулируется сезонно гормонами гипофиза, и уровень мРНК АФП I типа в печени летом и зимой отличается в 1 тыс. раз (Duncker *et al.*, 1995). При гипофизэктомии уровень АФП в печени увеличивается только в 40 раз, а уровень АФП в других органах не меняется (Gong *et al.*, 1995). Рост уровня мРНК в осенний период модулируется гипофизом в ответ на уменьшение длины дня и весной падает в ответ на повышение температуры. Было высказано предположение о том, что это уменьшение может быть связано, по крайней мере, частично, со стабильностью мРНК при низких температурах (Duncker *et al.*, 1995). Также показано, что в коже и печени зимней камбалы гены АФП регулируются независимо, даже был охарактеризован специфический энхансерный B-элемент печени (Barrett *et al.*, 2001).

При содержании зубатки *Anarhichas lupus* в теплой воде и при сезонном изменении светового дня амплитуда сезонных циклов активности АФП значительно уменьшалась, что свидетельствует о необходимости понижения температуры воды для достижения максимального уровня АФП в плазме крови. Тем не менее несмотря на пребывание рыбы в теплой воде, уровень активности АФП стал выше летнего в то же самое время года, когда рыбы подвержены сезонным изменениям температуры воды. Это говорит о том, что фотопериод играет важную роль в регулировании годового цикла АФП рыб (Desjardins *et al.*, 2006).

Насекомые. Окружающая среда является одним из факторов, которые влияют на производство белков или соединений, участвующих в морозоустойчивости насекомых. Например, у мухи *Eurosta solidaginsis* быстрый рост концентрации криопротекторов, глицерина и сорбита происходит после первого осеннего мороза (Graham *et al.*, 2000). Транскрипты АФП выявляются у снежной блохи, собранной в конце весны в тающем снегу (Graham, Davies, 2005). Сезонные изменения активности ТН и уровней транскриптов АФП были замечены у личинок *Dendroides canadensis*, причем максимальный уровень транскрипции приходится на зимнее время и некоторые изоформы обнаруживаются в теплые месяцы (Andorfer, Duman, 2000). Предполагают, что летние изоформы, выявляемые у насекомых, служат для снижения активности потенциальных нуклеаторов льда в случае ранних морозов.

Насекомые, живущие в зоне умеренного климата, обычно зимуют на определенной стадии развития. Таким образом, внутренние процессы развития, в дополнение к сигналам окружающей среды, могут играть свою роль в приобретении морозоустойчивости. У *Tenebrio molitor*, *Dendroides canadensis* и *Choristoneura fumiferana* присутствие АФП коррелирует со стадией развития, однако существуют и другие способы регуляции как для каждого насекомого, так и для отдельных изоформ АФП внутри вида (Qin *et al.*, 2006; Doucet *et al.*, 2009). Интересно, что *Choristoneura fumiferana* синтезирует значительное количество другого криопротектора – глицерина – только после воздействия низких температур в середине диапаузы (Graham *et al.*, 2000).

Воздействие низкой температуры и засушливых условий в течение нескольких недель

приводит к увеличению уровня транскрипции АФП у личинок *Tenebrio molitor*, однако решающим фактором остается стадия развития (Graham *et al.*, 2000). Данные о влиянии короткого фотопериода на уровень АФП в гемолимфе *Tenebrio molitor* противоречивы: в отдельных работах показано увеличение TmAFP мРНК, в других такого влияния не обнаружили (Doucet *et al.*, 2009). Сохранение умеренного уровня АФП у куколок и взрослых насекомых *Tenebrio molitor* в отсутствие значимых уровней транскриптов подтверждает то, что белки являются стабильными и могут сохраняться в качестве защиты от низких температур. Куколки имеют небольшую холодостойкость, и так как личинки окукливаются весной, АФП обеспечивают защиту от поздних заморозков. В эксперименте любое внешнее воздействие, замедляющее рост личинок, вызывало увеличение ТН, поэтому авторы предположили, что прекращение развития личинок является первичным фактором регуляции синтеза АФП у *Tenebrio molitor* (Graham *et al.*, 2000).

Известно, что ювенильный гормон индуцирует диапаузу личинок. Возможно, что он участвует также и в инициации холодоустойчивости. Например, у *Dendroides canadensis* ювенильный гормон стимулирует продукцию АФП (Horwath, Duman, 1983). Однако несмотря на обширные исследования, в прилегающих районах гена *TmAFP* не было найдено никаких участков ДНК, связанных с гормональной регуляцией АФП (Qin, Walker, 2006).

Растения. Исследования показали, что у растений экспрессия генов АФП происходит во время низкотемпературной акклимации, или закаливания (Urrutia *et al.*, 1992; Hon *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2000; Huang, Duman, 2002). Только у луговника антарктического *Deschampsia antarctica* была обнаружена IRI-активность в листьях неакклимированного растения (Bravo, Griffith, 2005), что, однако, не нашло подтверждения при использовании другого метода анализа (John *et al.*, 2009).

Условия, используемые для закаливания, имитируют осень, когда дни становятся короче и холоднее. Таким образом, низкие температуры и световой день являются важными сигналами окружающей среды для производства АФП. Например, растения озимой ржи, выращенные при низких температурах, накапливают больше апопластного белка при 8-часовом дне, чем при 16-часовом (Marentes *et al.*, 1993). АФП паслена *Solanum dulcamara*, моркови *Daucus carota* и райграса *Lolium perenne* в естественных условиях накапливаются только после ноября (Smallwood *et al.*, 1999; Huang, Duman, 2002; Pudney *et al.*, 2003).

Чтобы определить, связана ли антифризная активность с морозоустойчивостью и является ли накопление антифризных белков при воздействии низких температур общим свойством растений, были изучены 12 однодольных и двудольных травянистых растений (Antikainen, Griffith, 1997). Значительный уровень антифризной активности выявлен в апопластных экстрактах только у закаленных злаков, причем только родственные злаки (пшеница, ячмень, рожь) накапливают АФП, сходные с белками устойчивости к патогенам. Оказалось, что у двудольных растений (табак, капуста, шпинат, рапс) морозоустойчивость не коррелирует с наличием антифризной активности в апопласте (Antikainen, Griffith, 1997).

Регулирование АФП является сложным процессом, поскольку оно имеет тканеспецифические особенности и зависит от стадии развития, о чем свидетельствуют исследования низкотемпературной индукции и тканевой специфичности АФП у моркови и ржи (Griffith, Yaish, 2004). Ген АФП моркови экспрессируется в течение 30 мин после воздействия на проростки температуры 4 °С и достигает стационарного уровня в течение 24 ч (Meyer *et al.*, 1999). Транскрипция гена поддерживается на стационарном уровне в листьях, стеблях и корнях взрослых растений моркови во время холодных и коротких дней, причем наибольшая экспрессия наблюдается в корнях, что объясняется двулетним циклом развития моркови, при котором сохранность корней является приоритетной, а надземные части растения отмирают (Smallwood *et al.*, 1999).

Было показано, что различные АФП озимой ржи накапливаются с разной скоростью: глюканазы появляются первыми, затем тауматинподобные АФП, последними синтезируются хитиназы-АФП (Hon *et al.*, 1995; Yeh *et al.*, 2000).

В отличие от АФП моркови хитиназы-АФП озимой ржи не синтезируются непосредственно

в ответ на холод и/или короткие дни в листьях, выросших при высокой температуре и перенесенных в закаливающие условия. Хитиназы-АФП накапливаются только в тех листьях, которые выросли при пониженной температуре, т. е. экспрессия хитиназ-АФП индуцируется холодом на определенной стадии развития растения (Yeh *et al.*, 2000).

Предполагают, что PR-белки с антифризной активностью и без нее являются членами одного семейства родственных генов, которые дифференциально регулируются в ответ на холод и воздействие патогенов (Gozzo, 2003). Так, растения озимой ржи в нормальных условиях роста, инфицированные патогенами или обработанные салициловой или абсцизовой кислотами, хоть и накапливают PR-белки, похожие на те, которые синтезируются при низкотемпературной акклимации, однако у PR-белков из незакаленных растений отсутствует антифризная активность (Griffith, Yaish, 2004). Также глюканаза неакклимированной озимой ржи *Secale cereale* имеет чрезвычайно низкую антифризную активность по сравнению с глюканазами, синтезирующимися в холодоакклимированных растениях (Yaish *et al.*, 2006). Это говорит о том, что отдельные члены семейств PR-белков приобрели способность экспрессироваться при воздействии холода.

Озимая рожь синтезирует АФП при 20 °C в засушливых условиях или при воздействии этилена, тогда как обработка растений абсцизовой и салициловой кислотами или инфицирование патогенной розовой снежной плесенью (*Microdochium nivale*) не ведет к появлению АФП (Griffith, Yaish, 2004).

Транскрипт *TaIRI-1* у мягкой пшеницы начинает накапливаться после воздействия пониженной температуры (4 °C) и достигает своего максимального уровня после 36 дней акклимации. Дальнейшее воздействие низкой температуры не приводит к более высокому содержанию транскрипта. Транскрипт *TaIRI-2* также накапливается сразу после начала закаливания, но достигает максимального значения ранее во время периода акклимации. После деакклимации уровень транскриптов возвращается к таковому у неакклимированных растений контроля. Транскрипт *TaIRI-1* обнаружен в листьях, узле кущения и корнях, в то время как транскрипт *TaIRI-1* – только в листьях. Транскриптов накапливается больше в зимостойких видах, таких, как пшеница, по сравнению с менее морозостойкими овсом и ячменем, и не обнаружено накопление в холодочувствительных видах, таких, как рис и кукуруза. Другие методы воздействия, такие, как солевой стресс, нехватка воды, экзогенные ABA, тепловой шок и механические повреждения не имеют заметного воздействия на накопление танскриптов *TaIRI*. Данные показывают, что биотические стрессы также не вызывают экспрессии *TaIRI*-генов. Однако фитогормоны, участвующие в механизме защиты от патогенов (жасмоновая кислота и этилен), индуцируют экспрессию одного из двух генов – *TaIRI-1* (Tremblay *et al.*, 2005).

В эксперименте по сравнительному изучению транскрипции у озимых и яровых сортов мягкой пшеницы в условиях низкотемпературного кратковременного стресса (холодового шока) и акклимации было показано, что транскрипты PR-АФП синтезируются только при длительном воздействии низкой температуры, а *TaIRI*-гены экспрессируются в обоих случаях (Winfield *et al.*, 2010). Причем гены *TaIRI* экспрессируются между 5-й и 9-й неделями акклимации, тогда как транскрипты PR-АФП появляются между 3-й и 5-й неделями воздействия. В работе отмечено, что несколько генов, *TaIRI*, *WLT10*, *BLT14-1*, *BLT14-2*, дигедрин, ксилоглюкан эндотрансгликозилаза и предсказанный трансмембранный белок, имеют одинаковый профиль экспрессии. Авторы предполагают, что эти гены регулируются совместно. Интересно, что при акклимации в листьях озимой пшеницы экспрессируется предполагаемый ген-ингибитор полигалактуроназы (polygalacturonase-inhibiting protein, PGIP), аналогичный гену АФП моркови (Worrall *et al.*, 1998).

Таким образом, у рыб, насекомых и растений гены АФП являются членами семейств родственных генов, при этом как семейства, так и отдельные гены внутри семейства могут отличаться по месту функционирования и по способу регулирования. В наибольшей степени на уровень АФП влияет изменение температуры и длины светового дня и в меньшей степени – другие факторы внешней среды. Также показано, что экспрессия многих генов АФП зависит

от стадии развития организма. Интересно отметить, что АФП растений могут иметь дополнительную функцию защиты от патогенов.

Происхождение и эволюция АФП

Группа АФП характеризуется недавним эволюционным происхождением, множественностью компонентов у одного организма, независимым происхождением у представителей близкородственных таксонов и конвергентным сходством у неродственных групп организмов (Barrett, 2001) (табл. 2).

Костистые рыбы. АФГП антарктических нототениевых рыб произошел от функционально неродственной панкреатической трипсиногеноподобной протеазы (Cheng, 1998). Важный промежуточный компонент этого эволюционного процесса – транскрипционно активный химерный ген, кодирующий как АФГП полипротеин, так и протеазу, был обнаружен в геноме гигантского антарктического клыкача *Dissostichus mawsoni* (Cheng, Chen, 1999). Одновременное присутствие протеазного гена, несущего зарождающийся Thr-Ala-Ala-кодирующий элемент, транскрипционно активного химерного АФГП-протеазного гена и независимых АФГП генов подтверждает, что АФГП-последовательность возникла как часть неродственного протеазного гена, подверглась экспансии и обрела независимость, потеряв большую часть протеазного домена (Cheng, Chen, 1999). Небольшая дивергенция последовательностей (4–7 %) между генами АФГП и трипсиногеном нототениевых рыб говорит о том, что ген протеазы трансформировался в ген белка, связывающегося со льдом, относительно недавно – около 5–14 млн лет назад, что согласуется с оценками времени начала замерзания антарктических вод 10–14 млн лет назад и временем основной филетической дивергенции семейств нототениевых рыб 7–15 млн лет назад, по данным анализа последовательностей митохондриальной рДНК (Cheng, 1998).

Последовательность АФГП арктической трески *Boreogadus saida* сравнили с АФП геном нототениевых рыб (Cheng, 1998). АФГП гены *Boreogadus saida* имеют схожую с генами нототениевых рыб полипротеиновую структуру, в которой копии кодирующих АФГП-последовательностей разделены небольшими спейсерами. Однако гены АФГП нототениевых и тресковых имеют отличия, которые убедительно показывают независимую эволюцию АФГП-генов трески: а) различные сигнальные пептидные последовательности; б) разные последовательности спейсеров, соединяющих отдельные гены АФГП в полипротеине, что приводит к различным механизмам процессинга предшественников полипротеина; в) разные последовательности, кодирующие повторы Thr-Ala/Pro-Ala; г) геномные локусы АФГП гена трески и нототениевых АФГП тоже отличаются (Cheng, 1998). Таким образом, почти идентичные АФГП двух не связанных групп рыб представляют собой пример конвергенции белковых последовательностей, т. е. развитие аналогичного белка из разных предков в результате воздействия одинаковых условий окружающей среды.

АФП I типа рыб являются полифилетическими по происхождению, они обнаружены у представителей трех неродственных отрядов костистых рыб и представляют собой пример конвергентной эволюции (Hobbs *et al.*, 2011). Установлена гомология между геном АФП I типа рыб и генами белков хориона и кератина липариса *Liparis atlanticus*, которые экспрессируются в печени. Возможно, среди этих генов находятся предки АФП I, от которых в результате сдвига рамки считывания произошли гены белков с антифризной активностью (Evans, Fletcher, 2005).

Гиперактивные АФП I типа зимней камбалы в 10–100 раз более активны и имеют больший молекулярный вес, чем АФП I типа. Несмотря на это отличие, данные АФП, скорее всего, являются паралогичными, так как имеют участки значительной гомологии последовательностей ДНК (Gauthier *et al.*, 2005). Гиперактивная изоформа была выявлена у трех видов рода правоглазых камбал, причем у одного из этих видов нет малых изоформ. Семейство генов АФП I типа состоит из 30–40 элементов, многие из которых являются тандемными повторами, и поскольку эти гены кодируют функционально важные белки, невозможно представить, что они элиминировались из генома или стали молчащими. Следовательно, можно предположить, что гиперактивная и малая изоформа имели

общего предшественника и в ходе эволюции ген малой изоформы подвергся амплификации (Gauthier *et al.*, 2005).

Филогенетический анализ показывает, что все АФП II (Ca^{2+}-зависимые и Ca^{2+}-независимые) произошли от общего предка и дивергировали, развивая различные механизмы связывания со льдом (Liu *et al.*, 2007). Возможно, связывающийся со льдом домен АФП II появился в ходе молекулярной эволюции сайта распознавания углеводов лектиноподобного предка (Ewart *et al.*, 1998).

Независимое появление АФП II типа в трех неродственных ветвях костистых рыб (сельди, корюшки и морского ворона) является экстраординарным по нескольким причинам (Graham *et al.*, 2008a). Эти гомологи лектинов являются единственными лектинами, у которых пятый дисульфидный мостик специфически локализован, и они гораздо более похожи друг на друга, чем на любой другой гомолог лектинов. Их сходство распространяется и на уровень последовательности ДНК, где даже интроны имеют до 97 % гомологии. В базах данных не были обнаружены родственные аминокислотные последовательности других видов с гомологией более 40 %. Это согласуется с данными геномной Саузерн гибридизации, которая показала отсутствие гомологов АФП второго типа у других видов рыб. Консервативность интронов и экзонов, отсутствие корреляции между эволюционным расстоянием и скоростью мутаций, соотношение синонимичных и несинонимичных замен в кодонах не соответствуют гипотезе о существовании предшественника этих генов, который был элиминирован во всех таксонах костистых рыб.

Некоторые авторы считают, что горизонтальный перенос гена АФП II типа является наиболее вероятным объяснением большой гомологии аминокислотной последовательности (до 85 %), низкой частоты синонимичных мутаций и высокой консервативности числа, положения и последовательности интронов (Graham *et al.*, 2008a).

В последнее время были клонированы АФП диатомовых водорослей (Janech *et al.*, 2006) и антарктической бактерии (Raymond *et al.*, 2007), эти белки показали высокую гомологию с АФП грибов (Xiao *et al.*, 2010). Есть все основания считать, что гомологи АФП грибов широко распространены в нескольких царствах, благодаря возможному горизонтальному переносу генов между эукариотическими микробами и прокариотами (Raymond *et al.*, 2007).

У антарктических бельдюговых рыб (*Zoarcidae*) удалось реконструировать происхождение АФП III типа путем дупликации и дивергенции от древнего гена синтазы сиаловой кислоты (SAS) (Deng *et al.*, 2010). Дуплицированный ген SAS сочетает синтазу сиаловой кислоты и рудиментарную активность связывания со льдом. У одной из копий N-концевой SAS-домен был делетирован и замещен возникшим сигнальным пептидом, что снимало плейотропный конфликт между функциями SAS и связывания со льдом и позволяло быстро оптимизировать С-концевой домен, чтобы он стал секреторным белком, способным к ТН. Этот пример иллюстрирует эволюционную модель избегания адаптационного конфликта, согласно которой адаптивный конфликт между старой и формирующейся новой функцией одного гена может приводить к фиксации дупликации гена, при этом у каждой копии происходит оптимизация одной из функций.

Количество копий генов АФП рыб может значительно варьировать внутри одного вида. Так, у бельдюги *M. americanus* выявляется 40 копий гена АФП в южных широтах и около 150 копий в северных, что говорит о селективном давлении среды в сторону увеличения числа копий гена (Hew *et al.*, 1988). Это важное адаптивное свойство при колонизации новых мест обитания.

Полипротеин АФП III типа бельдюги *Lycodichthys dearborni* состоит из 12 тандемных повторов, каждый из которых транслируется в 7 кДа молекулу АФП (Yu *et al.*, 2005). Организация этого гена аналогична организации генов АФГП рыб. АФП III и АФГП отличаются по составу и структуре, они выявлены в различных систематических таксонах, однако сходная структура генов этих АФП свидетельствует о наличии у рыб общего механизма организации участков геномов, отвечающих за приспособление к экстремальным условиям полярных ареалов (Deng *et al.*, 2010).

Насекомые. Мало известно о событиях и процессах, которые были движущей силой

эволюции АФП насекомых. Изученные виды жесткокрылых и чешуекрылых экспрессируют множество изоформ АФП в жидкостях организма (Kristiansen *et al.*, 2005; Graham *et al.*, 2007), отличающихся по числу копий внутреннего повтора (Graham *et al.*, 1997; Tyshenko *et al.*, 1997; Liou *et al.*, 1999; Doucet *et al.*, 2000). АФП *Dendroides canadensis* являются гомологами (Andorfer, Duman, 2000). В гемолимфе, жидкости кишки и эпидермисе личинок *Dendroides canadensis* присутствуют специфические варианты АФП (Graham *et al.*, 2000). Это показывает, что АФП могли эволюционировать, приобретая специфические функции. Например, группа I АФП *Dendroides canadensis* является более эффективной в ингибировании белков нуклеаторов льда гемолимфы, а группы II и III АФП могут быть эффективнее в ингибировании бактерий нуклеаторов льда в кишечнике. Другая возможность состоит в том, что АФП кишечника могут быть более устойчивыми к протеазам.

Как и в случае АФП рыб, среди насекомых показано появление структурных аналогов, например, RiAFP жука *Rhagium inquisitor* и iwAFP пяденицы *C. perlata* (Kristiansen *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011). Как у жуков (Liou *et al.*, 2000), так и у молей (Leinala *et al.*, 2002a) АФП являются β-спиральными и содержат ряды остатков Thr на сайте связывания льда (Graether *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002). Оба вида АФП при увеличении числа повторов и, следовательно, размера поверхности связывания льда демонстрируют повышение ТН-активности (Leinala *et al.*, 2002b; Marshall *et al.*, 2004). Несмотря на сходство, АФП жуков и молей отличаются по первичной последовательности, количеству и расположению дисульфидных мостиков, а также имеют спиральную структуру разной направленности (Graether, Sykes, 2004; Qin *et al.*, 2007).

Открытие АФП *Rhagium inquisitor* имеет большое значение для понимания эволюции АФП насекомых, так как RiAFP представляет собой совершенно новый тип АФП по сравнению с описанными у других видов жуков (Kristiansen *et al.*, 2011). Не связанные между собой филогенетически АФП также выявлены в отряде чешуекрылых – iwAFP (*Campaea perlata*) (Lin *et al.*, 2011) и sbwAFP (*Choristoneura fumiferana*) (Tyshenko *et al.*, 1997). Таким образом, можно сделать вывод о том, что адаптация к экологическому стрессу привела к возникновению АФП у близких видов насекомых уже после того, как они отделились от общего предка.

Множественность генов АФП у насекомых дает возможность гибко регулировать уровень транскрипции, способствует высокому уровню ТН и, следовательно, стратегии избегания замораживания, при этом некоторые изоформы синтезируются в различных тканях или экспрессируются в разное время в течение зимы (Andorfer, Duman, 2000). Сами гены состоят из повторяющихся блоков, которые привели к пластичной ТН-активности, так как более длинные изоформы имеют большую активность.

Растения. АФП были выделены из 6 растений, определена полная нуклеотидная последовательность 5 из них (табл. 1). Отличительной чертой АФП растений является то, что многие из них гомологичны PR-белкам (Hon *et al.*, 1995; Yaish *et al.*, 2006). Как правило, PR-белки выделяются в апопласт в ответ на возбудителя инфекции и действуют кооперативно, деградируя грибковые клеточные стенки ферментативно и подавляя грибковые ферменты. Показано, что АФП ржи не подвергаются модификации после трансляции, что говорит о существовании отдельной группы индуцируемых холодом PR-белков с антифризной активностью и группы родственных белков, у которых этой активности нет. Появление PR-белков с антифризной активностью может быть следствием дупликации предковой формы гена PR-белка с последующим появлением у одной из копий сайта связывания со льдом (Yeh *et al.*, 2000).

Один из АФП сладко-горького паслена *Solanum dulcamara* (*sthp-64*) сходен с транскрипционными факторами растений WRKY, регулирующими экспрессию белков устойчивости к патогенам (Huang, Duman, 2002). Структура *sthp-64* также напоминает структуру АФП животных.

АФП моркови имеет большую гомологию с белком-ингибитором полигалактуроназы (50–65 % гомологии), но сам не ингибирует полигалактуроназу (Worrall *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2006). Около 74 % зрелых последовательностей АФП моркови составляют насыщенные лейцином повторы (leucine-rich repeat, LRR), что является общим свойством

генов резистентности и обеспечивает быстро развивающуюся специфичность к новым патогенам (Meyer *et al.*, 1999). Вполне возможно, что район LRR приобрел способность связываться со льдом, и теперь белок может функционировать только как АФП (Worrall *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1999). Есть все основания предполагать, что АФП моркови в недавнее время произошел от PGIP-подобного предшественника путем дупликации генов (Yaish *et al.*, 2006). В связи с этим следует отметить, что был выделен еще один PGIP-подобный белок моркови, который имеет 75 %-ю гомологию с аминокислотной последовательностью АФП моркови (Meyer *et al.*, 1999). Этот АФП-подобный ген хотя и индуцируется воздействием холода, в отличие от *DcAFP* характеризуется значительным уровнем экспрессии в тканях незакаленных растений. Это может означать, что низкотемпературная индукция экспрессии гена АФП произошла от более общих, стресс-индуцированных, способов экспрессии генов.

Гены АФП мягкой пшеницы (*TaIRI1* и *TaIRI2*) имеют уникальную структуру, они состоят из двух частей, что никогда ранее не было описано для АФП (Tremblay *et al.*, 2005). В отличие от уже известных АФП, они имеют N-концевой участок, гомологичный лейцин-насыщенным повторам рецепторного домена (LRR) протеинкиназ (receptor-like kinases – RLKs), и С-концевой домен, который гомологичен связывающему лед домену некоторых АФП (IRI-домен).

Наибольшее сходство белков TaIRI и RLK выявлено с предполагаемым белком *Oryza sativa* – киназой рецептора фитосульфокина (OsPSR). Показано, что TaIRI1-белок не имеет киназной активности, что не удивительно, так как он имеет гомологию с RLKs в рецепторной области последних, а не с доменом киназы. Высокое сходство частей *TaIRI*-генов, фланкирующих IRI домен, и *OsPSR* позволяет предположить, что ДНК области кодирования IRI-домена являются инсерцией в кодирующую область ортолога *OsPSR* у пшеницы (Tremblay *et al.*, 2005; Sandve *et al.*, 2008).

Происхождение последовательности, кодирующей IRI-повтор, остается неясным, так как она не проявляет сходства с какой-либо последовательностью аминокислот (John *et al.*, 2009). Гены, кодирующие IRIP-гомологи, монофилетичны по происхождению, и их распространение ограничивается подсемейством мятликовых (*Pooideae*). На основе статистического анализа предполагают, что IRIP возникла в начале эволюционной истории *Pooideae* и впоследствии произошла дивергенция по числу копий и структуре. IRIP-гены возникли после расхождения подсемейств *Pooideae* и *Panicoideae* 60 млн лет назад, но до расхождения *Triticodae* и *Poodae* 35 млн лет назад.

Заключение

Способность АФП взаимодействовать со льдом определяет их важность для организма: они нейтрализуют нуклеаторы льда, способствуя переохлаждению; снижают температуру замерзания жидкости организма; играют криопротекторную роль в отношении некоторых мембран и белков; модифицируют форму кристаллов льда и останавливают их рост. Многие АФП имеют множественные изоформы, гены АФП являются представителями семейств родственных генов, отдельные представители этих семейств могут по-разному экспрессироваться в определенных частях организма или отдельных тканях. На уровень активности АФП влияют как факторы внешней среды, так и факторы, зависящие от самого организма, в том числе гормоны и стадия развития. К внутренним факторам также относятся: количество генов и изоформ АФП, концентрация АФП, число повторов структурных элементов сайта связывания льда, наличие низкомолекулярных энхансеров, присутствие других белков, выступающих в роли усилителей.

Эволюция АФП характеризуется возникновением неродственных типов АФП внутри одного и того же таксона, а также конвергентной эволюцией, при которой сходные структуры АПФ появляются у отдаленных видов. Удивительное разнообразие АФП наряду с очень узким распространением внутри таксонов привело к гипотезе о том, что типы АФП возникли независимо друг от друга во время недавних с точки зрения геологической истории событий охлаждения и оледенения, после того как сформировались современные отряды и виды животных и растений. Еще одной при-

чиной разнообразия АФП может быть то, что кристалл льда имеет множество поверхностей с различным геометрическим расположением атомов кислорода.

АФП имеют два контрастных пути происхождения. Некоторые из них возникли путем дегенерации отдельных членов семейств белков, имеющих совершенно несвязанные с АФП функции. Другие могут считаться по-настоящему новыми белками, чьи гены появились вследствие сравнительно недавних генетических событий. В отдельных случаях исследователи предполагают горизонтальный перенос генов АФП между неродственными таксонами.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 11-04-00178) и Госконтракта № 16.512.11.2223.

Литература

Самыгин Г.А. Образование льда в растениях // Физиол. растений. 1997. Т. 44. № 2. С. 275–286.

Трунова Т.И. Растение и низкотемпературный стресс. М.: Наука, 2007. 54 с.

Amornwittawat N., Wang S., Duman J.G. *et al.* Polycarboxylates enhance beetle antifreeze protein activity // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1784. No 12. P. 1942–1948.

Andorfer C.A., Duman J.G. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* // J. Insect Physiol. 2000. V. 46. P. 365–372.

Antikainen M., Griffith M. Antifreeze accumulation in freezing tolerant cereals // Physiol. Plant. 1997. V. 99. P. 423–432.

Antikainen M., Griffith M., Zhang J. *et al.* Immunolocalization of antifreeze proteins in winter rye leaves, crowns, and roots by tissue printing // Plant Physiol. 1996. V. 110. P. 845–857.

Baardsnes J., Kondejewski L.H., Hodges R.S. *et al.* New ice-binding face for type I antifreeze protein // FEBS Lett. 1999. V. 463. No 1/2. P. 87–91.

Baardsnes J., Kuiper M.J., Davies P.L. Antifreeze protein dimer: when two ice-binding faces are better than one // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. No 40. P. 38942–38947.

Barrett J. Thermal hysteresis proteins // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2001. V. 33. No 2. P. 105–117.

Bayer-Giraldi M., Weikusat I., Besir H. *et al.* Characterization of an antifreeze protein from the polar diatom *Fragilariopsis cylindrus* and its relevance in sea ice // Cryobiology. 2011. V. 63. No 3. P. 210–219.

Bilyk K.T., DeVries A.L. Delayed onset of adult antifreeze activity juveniles of the Antarctic icefish C*haenocephalus aceratus* // Polar Biol. 2011. DOI 10.1007/s00300-010-0828-6 (Published on line).

Bouvet V.R., Lorello G.R., Ben R.N. Aggregation of antifreeze glycoprotein fraction 8 and its effect on antifreeze activity // Biomacromol. 2006. V. 7. No 2. P. 565–571.

Bravo L.A., Griffith M. Characterization of antifreeze activity in Antarctic plants // J. Exp. Bot. 2005. V. 56. P. 1189–1196.

Cheng C.H. Origin and mechanism of evolution of antifreeze glycoproteins in polar fishes // Evolution of the Antarctic Ichthyofauna / Eds G. di Prisco, E. Pisano, A. Clarke. Springer-Verlag, Italy, 1998. P. 311–328.

Cheng C.H., Chen L. Evolution of an antifreeze glycoprotein// Nature. 1999. V. 401. No 6752. P. 443–444.

Cziko P.A., Evans C.W., Cheng C.-H.C. *et al.* Freezing resistance of antifreeze-deficient larval Antarctic fish // J. Exp. Biol. 2006. V. 209. P. 407–420.

Davies P.L., Baardsnes J., Kuiper M.J. *et al.* Structure and function of antifreeze proteins // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 2002. V. 357. P. 927–935.

Davies P.L., Sykes B.D. Antifreeze proteins // Curr. Opin. Struct. Biol. 1997. V. 7. P. 828–834.

Deng C., Cheng C.H., Ye H. *et al.* Evolution of an antifreeze protein by neofunctionalization under escape from adaptive conflict // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. No 50. P. 21593–21598.

Desjardins M., Le Franзois N.R., Fletcher G.L. *et al.* Seasonal modulation of plasma antifreeze protein levels in Atlantic (*Anarhichas lupus*) and spotted wolffish (*A. minor*) // J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 2006. V. 335. P. 142–150.

DeVries A.L. Antifreeze glycopeptides and peptides: interactions with ice and water // Methods in Enzymology. 1986. V. 127. P. 293–303.

DeVries A.L., Wohlschlag D.E. Freezing resistance in some Antarctic fishes // Sci. 1969. V. 163. P. 1073–1075.

Doucet C.J., Byass L., Elias L. *et al.* Distribution and characterization of recrystallization inhibitor activity in plant and lichen species from the UK and maritime Antarctic // Cryobiology. 2000. V. 40. No 3. P. 218–227.

Doucet D., Walker V.K., Qin W. The bugs that came in from the cold: molecular adaptations to low temperatures in insects // Cell Mol. Life Sci. 2009. V. 66. No 8. P. 1404–1418.

Duman J.G. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade *Solanum dulcamara* // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1206. P. 129–135.

Duman J.G., Bennett V., Sformo T. *et al.* Antifreeze proteins in Alaskan insects and spiders // J. Insect Physiol. 2004. V. 50. P. 259–266.

Duman J.G., Olsen T.M. Thermal hysteresis protein activity in bacteria, fungi and phylogenetically diverse plants // Cryobiology. 1993. V. 30. P. 322–328.

Duman J.G., Verleye D., Li N. Site-specific forms of antifreeze protein in the beetle *Dendroides canadensis* // J. Comp. Physiol. [B]. 2002. V. 172. No 6. P. 547–552.

Duncker B.P., Koops M.D., Walker V.K. *et al.* Low temperature persistence of type I antifreeze protein is mediated by cold-specific mRNA stability // FEBS Lett. 1995. V. 377. P. 185–188.

Ebbinghaus S., Meister K., Born B. *et al.* Antifreeze glycoprotein activity correlates with long-range protein-water dynamics // J. Am. Chem. Soc. 2010. V. 132. No 35. P. 12210–12211.

Evans R.P., Fletcher G.L. Type I antifreeze proteins: possible origins from chorion and keratin genes in Atlantic snailfish // J. Mol. Evol. 2005. V. 61. No 4. P. 417–424.

Evans R.P., Hobbs R.S., Goddard S.V. *et al.* The importance of dissolved salts to the *in vivo* efficacy of antifreeze proteins // Comp. Biochem. Physiol. Mol. Integr. Physiol. 2007. V. 148. No 3. P. 556–561.

Ewart K.V., Li Z., Yang D.S. *et al.* The ice-binding site of Atlantic herring antifreeze protein corresponds to the carbohydrate-binding site of C-type lectins // Biochemistry. 1998. V. 37. No 12. P. 4080–4085.

Ewart K.V., Lin Q. Hew C.L. Structure, function and evolution of antifreeze proteins // Cell. Mol. Life Sci. 1999. V. 55. P. 271–283.

Fei Y.B., Cao P.X., Gao S.Q. *et al.* Purification and structure analysis of antifreeze proteins from *Ammopiptanthus mongolicus* // Prep. Biochem. Biotechnol. 2008. V. 38. No 2. P. 172–183.

Fletcher G.L., Goddard S.V., Wu Y. Antifreeze proteins and their genes: from basic research to business opportunity // Chemtech. 1999. V. 30. P. 17–28.

Fletcher G.L., Hew C.L., Davies P.L. Antifreeze proteins of teleost fishes // Annu. Rev. Physiol. 2001. V. 63. P. 359–390.

Garnham C.P., Campbell R.L., Davies P.L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. No 18. P. 7363–7367.

Gauthier S.Y., Marshall C.B., Fletcher G.L. *et al.* Hyperactive antifreeze protein in flounder species. The sole freeze protectant in American plaice // FEBS J. 2005. V. 272. No 17. P. 4439–4449.

Gilbert J.A., Davies P.L., Laybourn-Parry J. A hyperactive, Ca^{2+}–dependent antifreeze protein in an Antarctic bacterium // JFEMS Microbiol. Lett. 2005. V. 245. No 1. P. 67–72.

Gong Z., Ewart K.V., Hu Z. *et al.* Skin antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, encode distinct and active polypeptides without the secretory signal and prosequences // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 4106–4112.

Gong Z., King M.J., Fletcher G.L. *et al.* The antifreeze protein genes of the winter flounder, *Pleuronectes americanus*, are differentially regulated in liver and non-liver tissues // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. V. 206. P. 387–392.

Gozzo F. Systemic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. No 16. P. 4487–4503.

Graether S.P., Kuiper M.J., Gagne S.M. *et al.* Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect // Nature. 2000. V. 406. No 6793. P. 249–251.

Graether S.P., Sykes B.D. Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins // Eur. J. Biochem. 2004. V. 271. No 16. P. 3285–3296.

Graham L.A., Davies P.L. Glycine-rich antifreeze proteins from snow fleas // Sci. 2005. V. 310. P. 461.

Graham L.A., Liou Y.C., Walker V.K. *et al.* Hyperactive antifreeze protein from beetles // Nature. 1997. V. 388. No 6644. P. 727–728.

Graham L.A., Lougheed S.C., Ewart K.V. *et al.* Lateral transfer of a lectin-like antifreeze protein gene in fishes // PLoS ONE. 2008a. V. 3. No 7. P. e2616.

Graham L.A., Marshall C.B., Lin F.H. *et al.* Hyperactive antifreeze protein from fish contains multiple ice-binding sites // Biochemistry. 2008b. V. 47. No 7. P. 2051–2063.

Graham L.A., Qin W., Lougheed S.C. *et al.* Evolution of hyperactive, repetitive antifreeze proteins in beetles // J. Mol. Evol. 2007. V. 64. No 4. P. 387–398.

Graham L.A., Walker V.K., Davies P.L. Developmental and environmental regulation of antifreeze proteins in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 6452–6458.

Griffith M., Yaish M.W. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities // Trends Plant. Sci. 2004. V. 9. No 8. P. 399–405.

Hawes T.C., Marshall C.J., Wharton D.A. Antifreeze proteins in the Antarctic springtail, *Gressittacantha terranova* // J. Comp. Physiol. B. 2011. V. 181. No 6. P. 713–719.

Harding M.M., Anderberg P.I., Haymet A.D. 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. No 7. P. 1381–1392.

Harding M.M., Ward L.G., Haymet A.D. Type I 'antifreeze' proteins. Structure–activity studies and mechanisms of ice growth inhibition // Eur. J. Biochem. 1999. V. 264. No 3. P. 653–665.

Hew C. L., Wang N. C., Joshi S. *et al.* Multiple genes provide the basis for antifreeze protein diversity and dosage in the ocean pout, *Macrozoarces americanus* // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 12049–12055.

Hobbs R.S., Shears M.A., Graham L.A. *et al.* Isolation and characterization of type I antifreeze proteins from cunner, *Tautogolabrus adspersus*, order Perciformes // FEBS J. 2011 V. 278. No 19. P. 3699–3710.

Hon W.C., Griffith M., Mlynarz A. *et al.* Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins // Plant Physiol. 1995. V. 109. P. 879–889.

Horwath K.L., Duman J.G. Induction of antifreeze protein production by juvenile hormone in larvae of the beetle, *Dendroides canadensis* // J. Comp. Physiol. 1983. V. 151. P. 233–240.

Hsiao K.C., Cheng C.H., Fernandes I.E. *et al.* An antifreeze glycopeptide gene from the antarctic cod *Notothenia coriiceps neglecta* encodes a polyprotein of high peptide copy number // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. No 23. P. 9265–9269.

Huang T., Duman J.G. Cloning and characterization of a thermal hysteresis (antifreeze) protein with DNA-binding activity from winter bittersweet nightshade, *Solanum dulcamara* // Plant. Mol. Biol. 2002. V. 48. No 4. P. 339–350.

Janech M.G., Krell A., Mock T. *et al.* Ice-binding proteins from sea ice diatoms (Bacillariophyceae) // J. Phycol. 2006. V. 42. No 2. P. 410–416.

Jarzabek M., Pukacki P.M., Nuc K. Cold-regulated proteins with potent antifreeze and cryoprotective activities in spruces (*Picea* sp.) // Cryobiology. 2009. V. 58. P. 268–274.

Jia Z., Davies P.L. Antifreeze proteins: an unusual receptor ligand interaction // Trends Biochem. Sci. 2002. V. 27. No 2. P. 101–106.

Jin Y., DeVries A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antar-

ctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 144. No 3. P. 290–300.

John U.P., Polotnianka R.M., Sivakumaran K.A. *et al.* Ice recrystallization inhibition proteins (IRIPs) and freeze tolerance in the cryophilic Antarctic hair grass *Deschampsia antarctica* E. Desv // Plant, Cell and Environment. 2009. V. 32. No 4. P. 336–348.

Knight C.A., Cheng C.C., DeVries A.L. Adsorption of alpha-helical antifreeze peptides on specific ice crystal surface planes // Biophys J. 1991. V. 59. No 2. P. 409–418.

Knight C.A., DeVries A.L. Ice growth in supercooled solutions of a biological «antifreeze», AFGP 1-5: an explanation in terms of adsorption rate for the concentration dependence of the freezing point // Phys. Chem. Chem. Phys. 2009. V. 11. No 27. P. 5749–5761.

Knight C.A., DeVries A.L., Oolman L.D. Fish antifreeze protein and the freezing and recrystallization of ice // Nature. 1984. V. 308. P. 295–296.

Knight C.A., Wen D., Laursen R.A. Nonequilibrium antifreeze peptides and the recrystallization of ice // Cryobiology. 1995. V. 32. P. 23–34.

Kristiansen E., Pedersen S.A., Zachariassen K.E. Salt-induced enhancement of antifreeze protein activity: a salting-out effect // Cryobiology. 2008. V. 57. No 2. P. 122–129.

Kristiansen E., Ramlшv H., Hagen L. *et al.* Isolation and characterization of hemolymph antifreeze proteins from larvae of the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* (L.) // Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 2005. V. 142. No 1. P. 90–97.

Kristiansen E., Ramlшv H., Ншjrup P. *et al.* Structural characteristics of a novel antifreeze protein from the longhorn beetle *Rhagium inquisitor* // Insect Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 41. No 2. P. 109–117.

Kristiansen E., Pedersen S.A., Ramlшv H. *et al.* Antifreeze activity in the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor* // J. Comp. Physiol. B. 1999. V. 169. P. 55–60.

Kristiansen E., Zachariassen K.E. The mechanism by which fish antifreeze proteins cause thermal hysteresis // Cryobiology. 2005. V. 51. No 3. P. 262–280.

Laursen K.J., Brown A.J., Middleton A.J. *et al.* Expression and characterization of an antifreeze protein from the perennial rye grass, *Lolium perenne* // Cryobiology. 2011. V. 62. P. 194–201.

Lee J.K., Park K.S., Park S. *et al.* An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast // Cryobiology. 2010. V. 60. No 2. P. 222–228.

Lee J.K., Kim Y.J., Park K.S. *et al.* Molecular and comparative analyses of type IV antifreeze proteins (AFPIVs) from two Antarctic fishes, *Pleuragramma antarcticum* and *Notothenia coriiceps* // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2011. V. 159. No 4. P. 197–205.

Leinala E.K., Davies P.L., Jia Z. Crystal structure of beta-helical antifreeze protein points to a general ice binding model // Structure. 2002a. V. 10. No 5. P. 619–627.

Leinala E.K., Davies P.L., Doucet D. *et al.* A beta-helical antifreeze protein isoform with increased activity: structural and functional insights // J. Biol. Chem. 2002b. V. 277. P. 33349–33352.

Li N., Andorfer C.A., Duman J.G. Enhancement of insect antifreeze protein activity by solutes of low molecular mass // J. Exp. Biol. 1998. V. 201. P. 2243–2251.

Li N., Kendrick B.S., Manning M.C. *et al.* Secondary structure of antifreeze proteins from overwintering larvae of the beetle *Dendroides canadensis* // Arch. Biochem. Biophys. 1998. V. 360. P. 25–32.

Lin F.H., Davies P.L., Graham L.A. The Thr- and Ala-rich hyperactive antifreeze protein from inchworm folds as a flat silk-like β-helix // Biochemistry. 2011. V. 50. No 21. P. 4467–4478.

Lin F.H., Graham L.A., Campbell R.L. *et al.* Structural modeling of snow flea antifreeze protein // Biophys. J. 2007. V. 92. No 5. P. 1717–1723.

Lin X., O'Tousa J.E., Duman J.G. Expression of two selfenhancing antifreeze proteins from the beetle *Dendroides canadensis* in *Drosophila melanogaster* // J. Insect Physiol. 2010. V. 56. No 4. P. 341–349.

Liou Y.C., Daley M.E., Graham L.A. *et al.* Folding and structural characterization of highly disulfide–bonded beetle antifreeze protein produced in bacteria // Protein Expr. Purif. 2000. V. 19. No 1. P. 148–157.

Liou Y.C., Thibault P., Walker V.K. *et al.* A complex family of highly heterogeneous and internally repetitive hyperactive antifreeze proteins from the beetle *Tenebrio molitor* // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 11415–11424.

Liu Y., Li Z., Lin Q. *et al.* Structure and evolutionary origin of Ca2+–dependent herring type II antifreeze protein // PLoS ONE. 2007. V. 2. No 6. P. e548.

Mao X., Liu Z., Ma J. *et al.* Characterization of a novel β-helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita* // Cryobiology. 2011. V. 62. No 2. P. 91–99.

Marentes E., Griffith M., Mlynarz A. *et al.* Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation // Physiol. Plant. 1993. V. 87. P. 499–507.

Marshall C.B., Chakrabartty A., Davies P.L. Hyperactive antifreeze protein from winter flounder is a very long rod-like dimer of alpha-helices // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. No 18. P. 17920–17929.

Marshall C.B., Daley M.E., Graham L.A. *et al.* Identification of the ice-binding face of antifreeze protein from *Tenebrio molitor* // FEBS Lett. 2002. V. 529. No 2/3. P. 261–267.

Marshall C.B., Daley M.E., Sykes B.D. *et al.* Enhancing the activity of a beta-helical antifreeze protein by the engineered addition of coils // Biochemistry. 2004. V. 43. No 37. P. 11637–11646.

Meyer K., Keil M., Naldrett M.J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity // FEBS Lett. 1999. V. 447. No 2/3. P. 171–178.

Middleton A.J., Brown A.M., Davies P.L. *et al.* Identification of the ice-binding face of a plant antifreeze protein // FEBS Lett. 2009. V. 583. No 4. P. 815–819.

Miura K., Ohgiya S., Hoshino T. *et al.* Determination of the solution structure of the N-domain plus linker of Antarctic eel pout antifreeze protein RD3 // J. Biochem. 1999. V. 126. No 2. P. 387–394.

Moffatt B., Ewart V., Eastman A. Cold comfort: plant antifreeze proteins // Physiol. Plantarum. 2006. V. 126. P. 5–16.

Mok Y.F., Lin F.H., Graham L.A. *et al.* Structural basis for the superior activity of the large isoform of snow flea antifreeze protein // Biochemistry. 2010. V. 49. P. 2593–2603.

Nishimiya Y., Kondo H., Takamichi M. *et al.* Crystal structure and mutational analysis of Ca2+-independent type II antifreeze protein from longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus* // J. Mol. Biol. 2008. V. 382. No 3. P. 734–746.

Parody-Morreale A., Murphy K.P., Di Cera E. Inhibition of bacterial ice nucleators by fish antifreeze glycoproteins // Nature. 1988. V. 333. P. 782–783.

Pertaya N., Marshall C.B., Celik Y. *et al.* Direct visualization of spruce budworm antifreeze protein interacting with ice crystals: basal plane affinity confers hyperactivity // Biophys. J. 2008. V. 95. No 1. P. 333–341.

Pertaya N., Marshall C.B., DiPrinzio C.L. *et al.* Fluorescence microscopy evidence for quasi-permanent attachment of antifreeze proteins to ice surfaces // Biophys. J. 2007. V. 92. No 10. P. 3663–3673.

Pudney P.D., Buckley S.L., Sidebottom C.M. *et al.* The physico-chemical characterization of a boiling stable antifreeze protein from a perennial grass (*Lolium perenne*) // Arch. Biochem. Biophys. 2003. V. 410. No 2. P. 238–245.

Qin W., Doucet D., Tyshenko M.G. *et al.* Transcription of antifreeze protein genes in *Choristoneura fumiferana* // Insect Mol. Biol. 2007. V. 16. No 4. P. 423–434.

Qin W., Tyshenko M.G., Doucet D. *et al.* Characterization of antifreeze protein gene expression in summer spruce budworm larvae // Insect Biochem. Mol. Biol. 2006. V. 36. No 3. P. 210–218.

Qin W., Walker V.K. *Tenebrio molitor* antifreeze protein gene identification and regulation // Gene. 2006. V. 367. P. 142–149.

Raymond J.A., Fritsen C., Shen K. An ice-binding protein from an Antarctic sea ice bacterium // FEMS Microbiol. Ecol. 2007. V. 61. No 2. P. 214–221.

Raymond J.A., Knight C.A. Ice binding, recrystallization inhibition, and cryoprotective properties of ice–active substances associated with Antarctic sea ice diatoms // Cryobiology. 2003. V. 46. No 2. P. 174–181.

Sandve S.R., Rudi H., Asp T. *et al.* Tracking the evolution of a cold stress associated gene family in cold tolerant grasses // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8. P. 245.

Scotter A.J., Marshall C.B., Graham L.A. *et al.* The basis for hyperactivity of antifreeze proteins // Cryobiology. 2006. V. 53. No 2. P. 229–239.

Smallwood M., Worrall D., Byass L. *et al.* Isolation and characterization of a novel antifreeze protein from carrot (*Daucus carota*) // Biochem. J. 1999. V. 340. Pt. 2. P. 385–391.

Tam R.Y., Rowley C.N., Petrov I. *et al.* Solution conformation of C-linked antifreeze glycoprotein analogues and modulation of ice recrystallization // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. No 43. P. 15745–15753.

Tremblay K., Ouellet F., Fournier J. *et al.* Molecular characterization and origin of novel bipartite cold-regulated ice recrystallization inhibition proteins from cereals // Plant Cell Physiol. 2005. V. 46. No 6. P. 884–891.

Tyshenko M.G., Doucet D., Davies P.L. *et al.* The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein // Nat. Biotechnol. 1997. V. 15. P. 887–890.

Uda Y., Zepeda S., Kaneko F. *et al.* Adsorption-induced conformational changes of antifreeze glycoproteins at the ice/water interface // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. No 51. P. 14355–14361.

Urrutia M.E., Duman J.G., Knight C.A. Plant thermal hysteresis proteins // Biochem. Biophys. Acta. 1992. V. 1121. No 1/2. P. 199–206.

Wang S., Amornwittawat N., Juwita V. *et al.* Arginine, a key residue for the enhancing ability of an antifreeze protein of the beetle *Dendroides canadensis* // Biochemistry. 2009. V. 48. No 40. P. 9696–9703.

Wang X., DeVries A.L., Cheng C.H. Genomic basis for antifreeze peptide heterogeneity and abundance in an Antarctic eel pout: gene structures and organization // Mol. Mar. Biol. Biotechnol. 1995. V. 4. No 2. P. 135–147.

Wang L., Duman J.G. A thaumatin-like protein from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* enhances the activity of antifreeze proteins // Biochemistry. 2006. V. 45. No 4. P. 1278–1284.

Wharton D.A., Barrett J., Goodall G. *et al.* Ice-active proteins from the Antarctic nematode *Panagrolaimus davidi* // Cryobiology. 2005. V. 51. No 2. P. 198–207.

Wierzbicki A., Madura J.D., Salmon C. *et al.* Modeling studies of binding of sea raven type II antifreeze protein to ice // J. Chem. Inf. Comput. Sci. 1997. V. 37. No 6. P. 1006–1010.

Wierzbicki A., Knight C.A., Salter E.A. *et al.* The role of non-polar amino acid functional groups in the surface-orientation-dependent adsorption of natural and synthetic antifreeze peptides on ice // Crystal Growth Design. 2008. V. 8. P. 3420–3429.

Winfield M.O., Lu C., Wilson I.D., *et al.* Plant responses to cold: Transcriptome analysis of wheat // Plant Biotechnol. J. 2010. V. 8. No 7. P. 749–771.

Wisniewski M., Webb R., Balsamo R. *et al.* Purification, immunolocalization, cryoprotective and antifreeze activity of PCA60: a dehydrin from peach (*Prunus persica*) // Physiol. Plant. 1999. V. 105. P. 600–608.

Worrall D., Elias L., Ashford D. *et al.* A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization // Science. 1998. V. 282. No 5386. P. 115–117.

Wu Y., Banoub J., Goddard S.V. *et al.* Antifreeze glycoproteins: relationship between molecular weight, thermal hysteresis and the inhibition of leakage from liposomes during thermotropic phase transition // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2001. V. 128. No 2. P. 265–273.

Xiao N., Suzuki K., Nishimiya Y. *et al.* Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis* // FEBS J. 2010. V. 277. No 2. P. 394–403.

Yaish M.W., Doxey A.C., McConkey B.J. *et al.* Cold–active winter rye glucanases with ice-binding capacity // Plant Physiol. 2006. V. 141. No 4. P. 1459–1472.

Yeh S., Moffatt B.A., Griffith M. *et al.* Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals // Plant Physiol. 2000. V. 124. P. 1251–1264.

Yu S.O., Brown A., Middleton A.J. *et al.* Ice restructuring inhibition activities in antifreeze proteins with distinct differences in thermal hysteresis // Cryobiology. 2010. V. 61. P. 327–334.

Yu J., Cheng C.H., DeVries A.L. *et al.* Characterization of a multimer type III antifreeze protein gene from the Antarctic eel pout (*Lycodichthys dearborni*) // Yi Chuan Xue Bao. 2005. V. 32. No 8. P. 789–794.

Zachariassen K.E., DeVries A.L., Hunt B. *et al.* Effect of ice fraction and dilution factor on the antifreeze activity in the hemolymph of the cerambycid beetle *Rhagium inquisitor* // Cryobiology. 2002. V. 44. No 2. P. 132–141.

Zachariassen K.E., Kristiansen E. Ice nucleation and antinucleation in nature // Cryobiology. 2000. V. 41. No 4. P. 257–279.

Zhang J., Deng C., Wang J. *et al.* Identification of a two-domain antifreeze protein gene in Antarctic eelpout *Lycodichthys dearborni* //·Polar Biology. 2009. V. 32. P. 35–40.

Zhang D.Q., Liu B., Feng D.R. *et al.* Expression, purification, and antifreeze activity of carrot antifreeze protein and its mutants // Protein Expr. Purif. 2004. V. 35. No 2. P. 257–263.

Zhang D.Q., Wang H.B., Liu B. *et al.* Carrot antifreeze protein does not exhibit the polygalacturonase-inhibiting activity of PGIP family // Yi Chuan Xue Bao. 2006. V. 33. No 11. P. 1027–1036.

Zhang C., Zhang H., Wang L. *et al.* Improvement of texture properties and flavor of frozen dough by carrot (*Daucus carota*) antifreeze protein supplementation // J. Agric. Food Chem. 2007. V. 55. No 23. P. 9620–9626.

Zhang C., Fei S.Z., Arora R. *et al.* Ice recrystallization inhibition proteins of perennial ryegrass enhance freezing tolerance // Planta. 2010. V. 232. No 1. P. 155–164.

THE MAIN PROPERTIES AND EVOLUTIONARY FEATURES OF ANTIFREEZE PROTEINS

L.L. Bildanova, E.A. Salina, V.K. Shumny

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

Summary

Antifreeze proteins are a class of proteins synthesized by poikilothermic organisms under cold stress. These proteins have random phylogenetic distribution, differ in primary and secondary structures, have different regulatory pathways, but they all display a common feature: the ability to be adsorbed onto the surface of ice crystals and to modify their growth. The review summarizes data on the origin of antifreeze proteins, activities and mechanisms mediating their action with emphasis on cereals, including wheat.

Key words: antifreeze protein (AFP), ice recrystallization inhibition (IRI), thermal hysteresis (TH), ice-binding proteins, freeze tolerance, freeze avoidance, cold acclimation, protein structure, protein evolution, cereals, wheat.

УДК 577.21:577.323:581

НУКЛЕОСОМНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ В САТЕЛЛИТНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЯХ ДНК РАСТЕНИЙ

© 2012 г. **В.Н. Бабенко[1], К.О. Куташев[1], В.Ф. Матвиенко[2]**

[1] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: bob@bionet.nsc.ru;
[2] Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 4 ноября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Сателлитная ДНК (сателлит), представленная повторяющимися тандемными последовательностями, является гетерохроматином с плотной нуклеосомной упаковкой. Мы искали среди контекстных и конформационных характеристик ДНК детерминирующие факторы, которые способствуют этой упаковке. Мы разработали статистику, основанную на величине изгиба ДНК, для определения характера предпочтения позиционирования нуклеосом в тандемных повторах. Было выявлено статистически значимое отличие профиля изгиба в тандемных повторах от случайной модели. Используя преобразование Фурье, мы выяснили, что не менее 50 % мономеров имеют периодичность профиля изгиба ДНК в районе 170 п.н., что соответствует длине ДНК, обернутой вокруг нуклеосомы, при рассмотрении двух первых гармоник в профиле изгиба ДНК. Мы определили, что в растениях схема позиционирования нуклеосом в субтеломерных сателлитах значимо отличается от аналогичной схемы в центромерных сателлитах.

Ключевые слова: нуклеосома, позиционирование, Фурье преобразование, изгиб ДНК, тандемные повторы.

Введение

Период 2008–2010 гг. ознаменовал завершение 30-летнего поиска кода нуклеосомного позиционирования (Trifonov, 1980, 2011), с одной стороны, и генерацию большого числа последовательностей ДНК, связывающихся с нуклеосомой, высокопроизводительным методом (Schones *et al.*, 2008; Valouev *et al.*, 2008, 2011), с другой стороны. Было опубликовано множество статей и компьютерных приложений по предсказанию нуклеосомного позиционирования (Gupta *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2009, 2010; Xi *et al.*, 2010). Стоит отметить, что нуклеосомный код базируется в основном на специфике изгиба ДНК (Sussman, Trifonov, 1978; Schones *et al.*, 2008; Trifonov, 2011). Поскольку связывание нуклеосомы с ДНК стохастично по своей природе, сравнение существующих полногеномных программ предсказания позиционирования нуклеосом выявляет их существенные различие (Tanaka, Nakai, 2009). Основной причиной этих несоответствий является достаточно низкая энергия связывания нуклеосом (Locke *et al.*, 2010; Valouev *et al.*, 2011), отражающая легкость удаления и восстановления связывания нуклеосомы для функционирования хроматина (Deal *et al.*, 2010). Более того, код нуклеосомного позиционирования часто перекрывается с другими информационными сигналами ДНК, такими, как репликационные, транскрипционные и трансляционные коды (Cohanim, Haran, 2009). Учитывая вышеизложенные обстоятельства, мы сфокусировались на определенных геномных районах, а именно – сателлитных повторах, где схема нуклеосомной упаковки хроматина играет основную функциональную роль.

Для анализа мы использовали данные из базы данных PlantSat (Macas *et al.*, 2002). Как видно из рис. 1, существует явное предпочтение мономеров к длине 140–170 п.н. и 330–350 п.н. В статье было предположено, что это предпо-

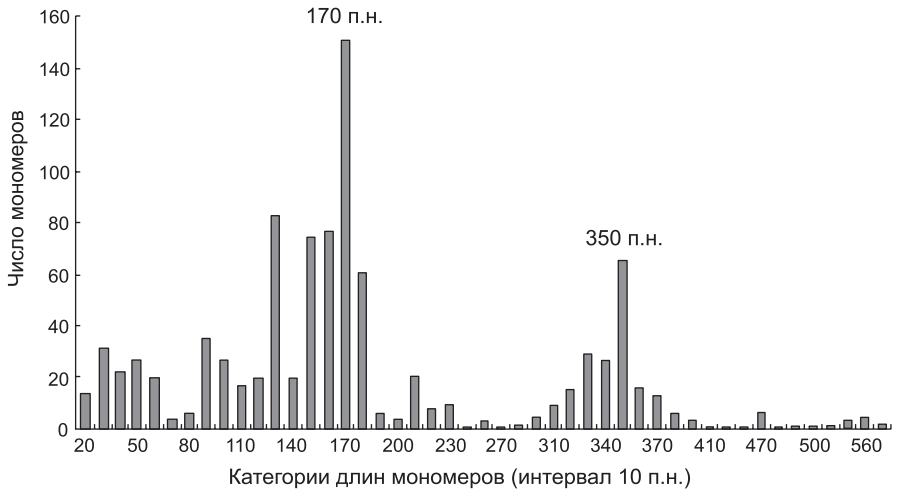


Рис. 1. Распределение длин мономеров из базы данных PlantSat (Macas *et al*., 2002).

чтение отражает длину обертывания ДНК вокруг нуклеосомы 140–180 п.н. (Macas *et al.*, 2002), но гипотеза не была подтверждена ни статистически, ни экспериментально. Более того, больше 60 % мономеров не попадают в эти интервалы по длине. Если для распределения длин мономеров в базе данных отобрать единственного представителя семейства для удаления избыточности, то профиль распределения длин становится еще менее иллюстративным. Цель данной работы – выяснить причины такой вариации длины и ее возможные последствия для позиционирования нуклеосом.

Материалы и методы

Мы использовали выборку из базы данных PlantSat (версия 2008 г.), содержащей 140 видов растений и 975 последовательностей мономеров пяти основных классов по локализации: центромерных – 258, парацентромерных – 121, интеркалярных – 218, диспергированных – 14 и нуклеолярных (NOR) – 24, остальные – без локализации (Macas *et al.*, 2002). Последовательности были сгруппированы в 165 семейств повторов (по гомологии).

Мы использовали программу Phase, доступную на сайте http://wwwmgs.bionet.nsc.ru/mgs/gnw/nucleosom/, для оценки паттерна распределения нуклеосом вдоль тандемно повторенных последовательностей. Алгоритм Phase использует неслучайное превышение (в зависимости от ожидаемых по случайным причинам) динуклеотидов, фазированных (идентичных) на периоде 10–11 п.н., что влияет на адаптивный изгиб ДНК при оборачивании вокруг нуклеосомы. В целом алгоритм достаточно точно отражает профиль изгиба ДНК по отношению к нуклеосомному связыванию (Deal *et al.*, 2010; Locke *et al*., 2010). Таким образом, для предсказания нуклеосомного потенциала далее использовался один фактор, а именно вышеназванный профиль изгиба ДНК, основанный на периодичности динуклеотидных частот.

Мы также применили дискретное преобразование Фурье (ДПФ) к профилям изгиба ДНК к последовательно повторенным мономерным последовательностям длиной 10 тыс. п.н. с помощью оригинальной программы, написанной на языке Perl.

Для вычисления коэффициентов преобразования Фурье использовались формулы из книги Феллера (Feller, 1971):

$$a_k = \frac{2}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i \cos(\omega_k), \quad b_k = \frac{2}{n}\sum_{i=1}^{n} X_i \sin(\omega_k),$$

где $\omega_k = \frac{2\pi k}{n}$ – частота Фурье, $k = -\left[\frac{n-1}{2}\right], \ldots, \left[\frac{n}{2}\right]$, n – длина последовательности ДНК, $[i]$ – целая часть от i, X_i – значение профиля изгиба ДНК в позиции i.

В этом случае периодограмма выглядит как:

$$I_k = \frac{n}{2}\sum_{i=1}^{n} (a_k^2 + b_k^2).$$

Результаты

Максимальная амплитуда профиля изгиба ДНК как неслучайная характеристика позиционирования нуклеосом на сателлитах

Мы вычислили профили ДНК с помощью программы Phase для 901 мономера (74 мономера имели вырожденные последовательности, поэтому были исключены из анализа). После изучения профилей изгиба ДНК мы заключили, что большая часть мономеров имеет специфический профиль с высокими пиками и глубокими падениями. Основываясь на опубликованных ранее данных о выраженных амплитудах профиля изгиба ДНК для ряда функциональных элементов, таких, как старты транскрипции, экзоны, поли-А-сигналы (Spies *et al.*, 2009; Ringrose, 2010), свидетельствующих о степени предпочтения нуклеосомного позиционирования в районах этих элементов, мы предположили, что высокая амплитуда является специфическим признаком для позиционирования нуклеосом в тандемных повторах. Для более детального исследования этого эффекта был построен график зависимости амплитуды от длины мономера для 901 элемента базы PlantSat (рис. 2, а). Параллельно была проведена симуляция для 901 мономера путем случайного перемешивания последовательности с теми же весами динуклеотидов, что и в исходной последовательности (рис. 2, б). Как видно, значение максимальной амплитуды экспоненциально зависит от длины, что вполне согласуется с теорией временных рядов и экстре-

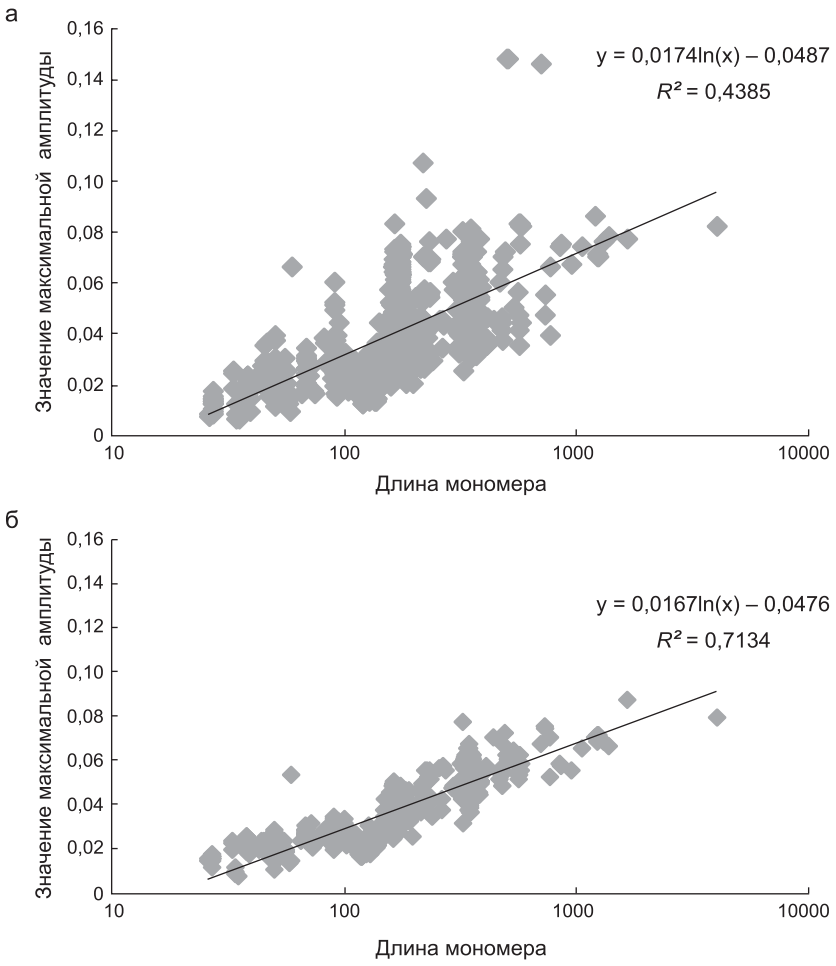


Рис. 2. Зависимость значения амплитуды профиля изгиба ДНК от длины мономера для: а – 901 мономера из PlantSat; б – 901 симулированного значения амлитуды, полученного путем усреднения 100 испытаний для каждого мономера путем перемешивания последовательности с идентичным динуклеотидным составом.

мальных значений в приложении к ДНК (Karlin, Altschul, 1990).

При одинаковых параметрах (тангенс угла наклона и смещение) регрессионных линий (рис. 2, а, б) значения остаточной вариации (R^2) резко отличаются. Дисперсионный критерий Фишера статистически подтвердил это, отвергнув гипотезу о гомогенности реальных и смоделированных данных с уровнем значимости $P < 10^{-5}$. Для того чтобы выявить факторы, обусловившие эту разницу, мы предприняли следующие шаги.

Значение максимальной амплитуды и распределение длины сателлитных мономеров

Стоит заметить, что значение максимальной амплитуды, кроме корреляции с длиной (рис. 2, а, б), зависит также от профиля изгиба ДНК. Была поставлена цель – оценить черты этой статистики на основе нескольких характерных примеров.

Мы выбрали последовательности со значением амплитуды профиля изгиба ДНК, превышающую случайное значение с определенным порогом. Для этого мы провели симуляцию, аналогичную упоминавшейся выше, путем перемешивания исходной последовательности с фиксированным динуклеотидным составом. Получив 100 точек для случайных последовательностей, мы оценили среднее и дисперсию для каждого мономера. Реальное значение амплитуды было выше случайного на два стандартных отклонения в 103 случаях, на одно стандартное отклонение – для 218 мономеров. Мы назвали последние мономеры (218) «лучшими» (рис. 3). В то же время мономеры со значениями амплитуды меньше случайного среднего на одно стандартное отклонение и более мы назвали «худшими» (рис. 3).

Как можно видеть на рис. 3, популяция «лучших» мономеров имеет 2 пика: один – в районе 170 п.н., другой – в районе 350 п.н. Число «худших» мономеров оказалось чрезвычайно малым – 14 случаев.

Используя информацию о локализации мономеров, мы построили диаграмму (рис. 4), из которой можно сделать вывод о том, что высокие значения амплитуды профиля изгиба ДНК характеризуют последовательности центромерных и парацентромерных повторов, в то время как субтеломерные повторы практически не позиционируют нуклеосомы в целом. Эти выводы хорошо согласуются с различными моделями процесса сборки нуклеосом в зависимости от локализации (Kiyama, Trifonov, 2002; Valouev *et al.*, 2008).

Симметрия профиля изгиба в ДНК мономеров благоприятна для гладкой стыковки

Для мономеров с высоким значением амплитуды мы наблюдали в основном профили в виде буквы «U». Поскольку во многих случаях

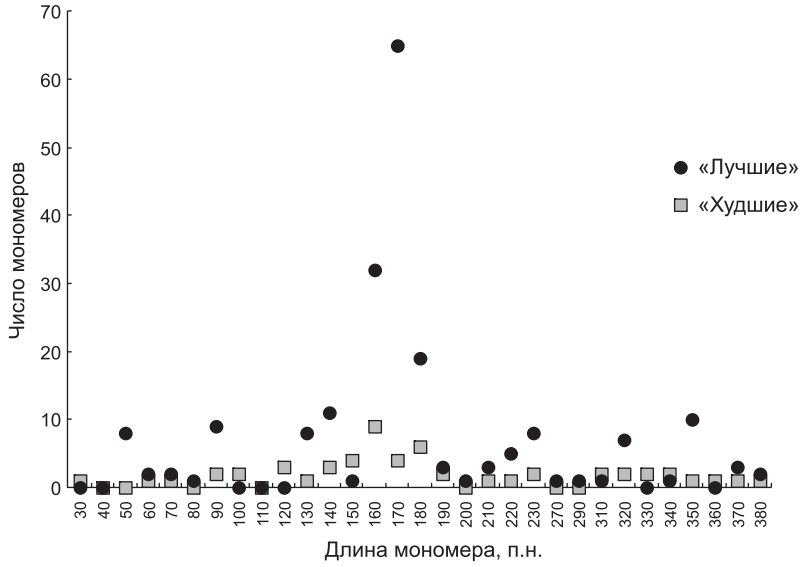


Рис. 3. «Лучшие» мономеры: их амплитуда превышает среднее на 1 станд. откл. «Худшие» мономеры: их значения амплитуды меньше случайного, по крайней мере, на 1 станд. откл.

период изгиба профиля ДНК равен длине мономера (рис. 2, 4), гладкая стыковка мономеров, возможно, обусловливает равное значение профиля на начале и конце мономера, что еще раз подтверждает неслучайный паттерн профиля изгиба ДНК на мономерах.

Наблюдалась также форма профиля, обратного к «U», но не так часто. Количество несимметричных мономеров с монотонно возрастающим или убывающим профилем было крайне мало. Мономеры с нерегулярным трендом профиля изгиба имели низкое значение амплитуды, согласно теории стохастического движения. Вероятно, такие мономеры не предполагают строгого позиционирования нуклеосом.

Стоит отметить, что максимальное значение профиля изгиба мономеров, показанное программой Phase, не превосходит в большинстве случаев случайное среднее значение, что свидетельствует, с одной стороны, об относительной природе способа позиционирования нуклеосом, а с другой – об ограничении максимальной энергии связывания ДНК с нуклеосомой для функциональности хроматина, как было указано выше.

Спектральный анализ профиля изгиба ДНК мономеров

Мы провели анализ Фурье профилей изгиба ДНК для 901 мономера. Периодограммы, полученные в результате анализа, изучали двумя способами: а) анализировалось распределение периодов, соответствующих наивысшей гармонике (гармоники с максимальным вкладом) (рис. 5, а); б) анализировалось распределение, соответствующее двум высшим гармоникам (рис. 5, б). Во втором случае выявили, что 50 % мономеров (436 из 901) имеют период, близкий к 170 п.н. Если добавить мономеры, высшая гармоника которых лежит в интервале периодов 20–90 п.н. (рис. 5, б), являющихся кратным значений 160–180 п.н., тогда можно считать, что большинство мономеров (763 из 901) имеют изгиб, подходящий для оптимального плотного позиционирования нуклеосом. Когда рассматривалась только наивысшая гармоника (рис. 5, а), в интервал периодов 150–190 п.н. укладывалось более 30 % мономеров (317 из 901). В то же время период высшей гармоники был примерно равен длине мономера в 60 % последовательностей (587 из 901). Остальные 40 % имели период, значительно отличающийся от длины мономера (рис. 6).

Даже при рассмотрении двух высших гармоник наблюдается повышение числа последовательностей с периодом в районе 320–340 п.н. (рис. 5, а, б). Возможно, это подтверждает гипотезу двустадийной сборки нуклеосом в процессе формирования нитей хроматина: на первом шаге нуклеосомы формируют разряженную регулярную сеть на ДНК, на втором шаге

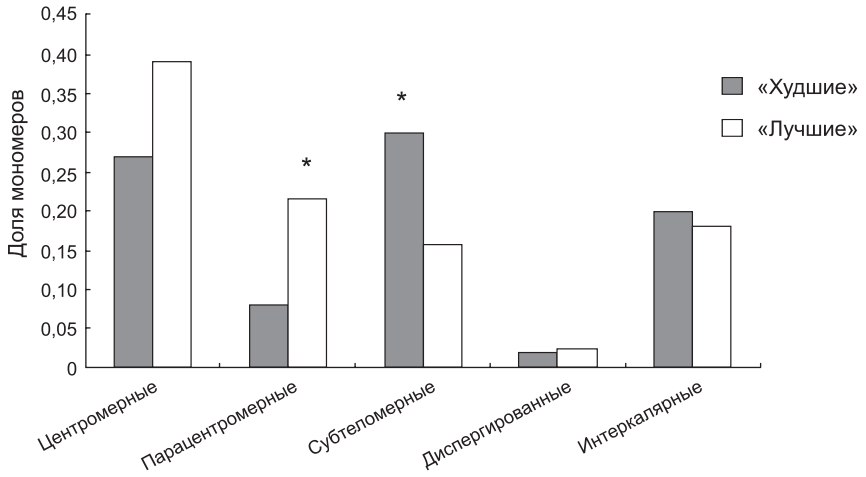


Рис. 4. «Лучшие» и «худшие» мономеры в различных локализациях.

* Статистически значимая разница ($P < 0,05$) между «лучшими» и «худшими» внутри класса локализации.

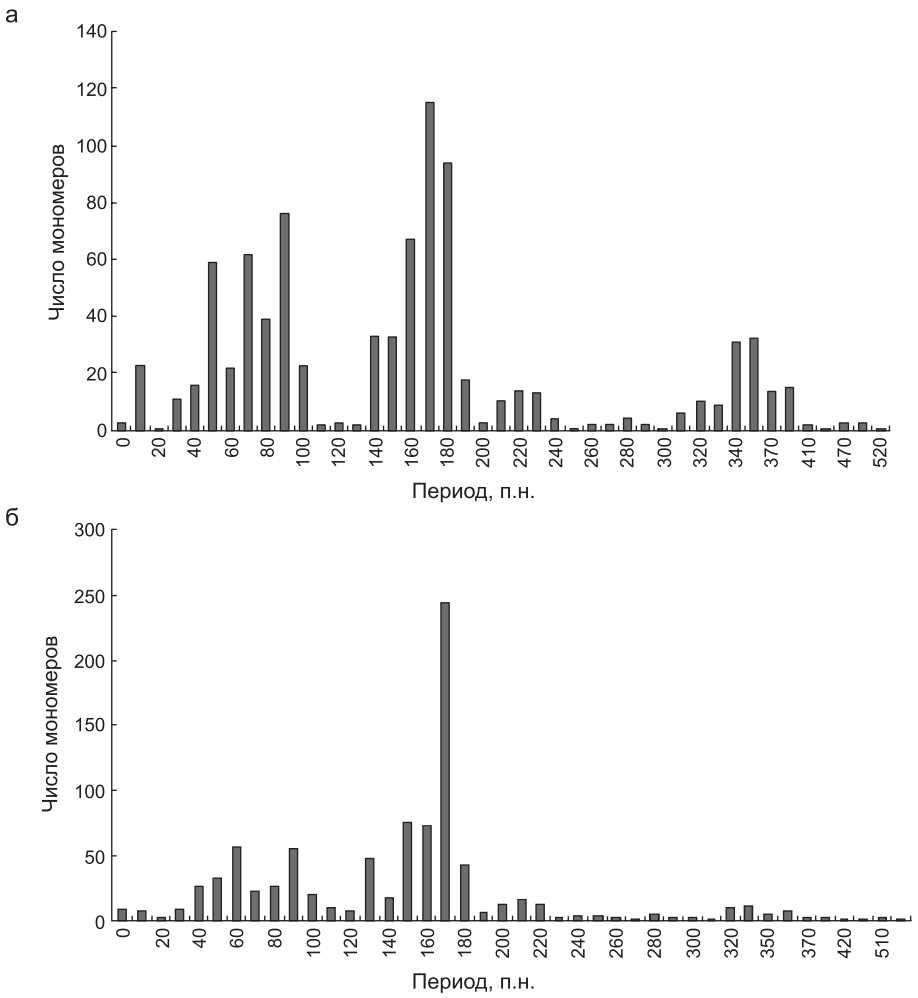


Рис. 5. Распределение мономеров в зависимости от периода, соответствующего высшей гармонике (а); двум высшим гармоникам (б).

нуклеосомы неспецифически заполняют пустые места для формирования плотно упакованного хроматина (Kiyama, Trifonov, 2002; Valouev *et al.*, 2008).

Обсуждение

Мы дополнили начальное наблюдение неслучайного распределения длин мономеров (рис. 1) двумя относительно независимыми типами анализа на основе профиля изгиба ДНК: 1) путем введения статистики значения амплитуды; 2) дискретным преобразованием Фурье (рис. 5). На основании этих исследований можно заключить, что предпочтительная длина мономеров в 170 п.н. основана на специфике формирования изгиба ДНК, имеющее отношение к позиционированию нуклеосом. Более того, анализ Фурье подтвердил, что большое число мономеров имеет период, значительно отличающийся от длины (рис. 6).

В свою очередь, нуклеосомное позиционирование с периодом в 170 п.н. не является характеристикой всех сателлитных мономеров. В таких случаях возможно, что ДНК мономера не нуждается в позиционировании нуклеосом по ряду причин (в частности, от влияния положения сателлита на хромосоме – центромерный или теломерный).

На основании анализа значения амплитуды, можно констатировать, что максимальная амплитуда характерна для мономеров с длиной 170 п.н., но при этом даже в этом случае только 50 % таких мономеров превышают случайное значение на одно стандартное отклонение (рис. 7). Таким образом, «строгость» нуклео-

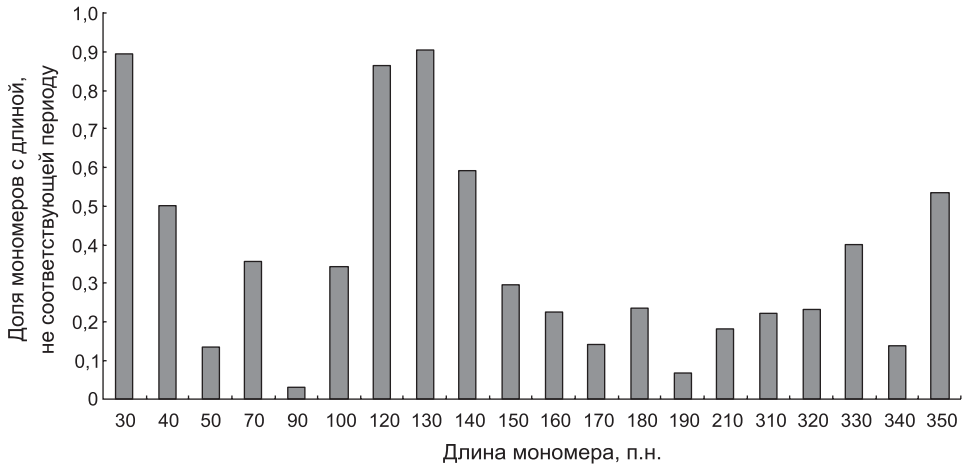


Рис. 6. Доля мономеров с отличием длины более чем на 30 п.н. от периода, соответствующего высшей гармонике.

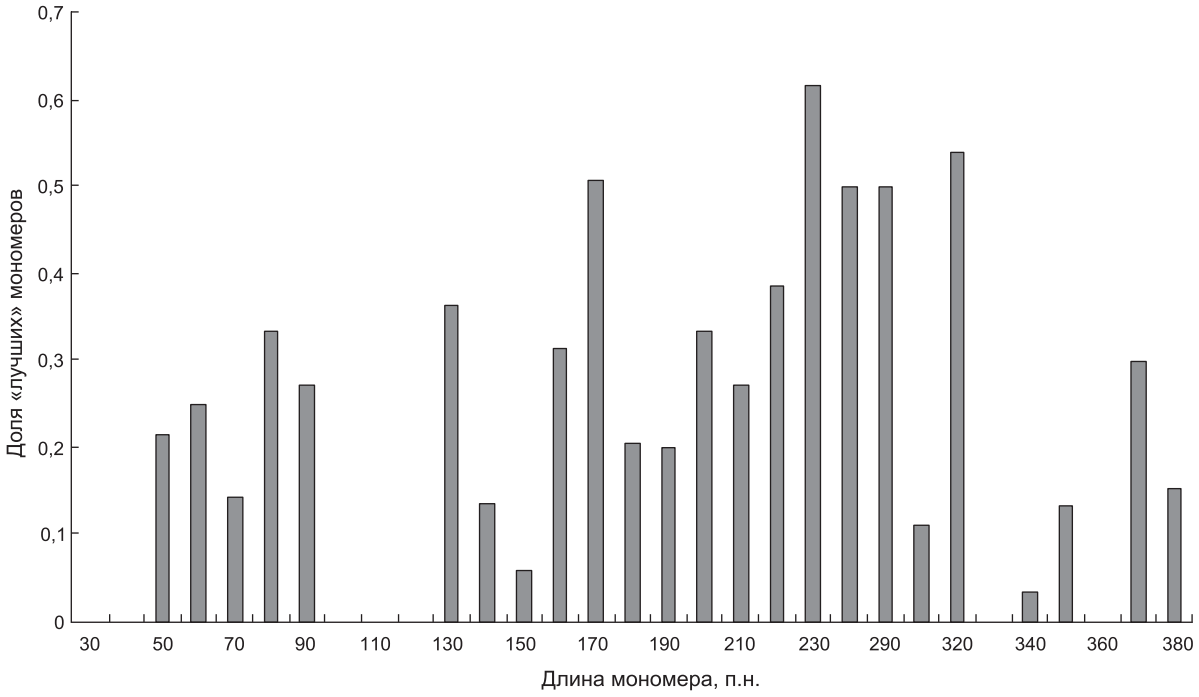


Рис. 7. Доля «лучших» мономеров в каждой категории длины.

сомного позиционирования варьирует для разных длин мономеров. Возможно, что это обусловлено также как контекстом, так и локализацией мономеров.

В целом приведенные результаты подтверждают заключение, сделанное в работе E. Segal, J. Widom (2009) о том, что нуклеосомы позиционируются в основном путем исключения их посадки в определенных сайтах ДНК. Таким образом, можно предположить, что глубокие «ямы» профиля изгиба ДНК – это основная черта, определяющая строгость нуклеосомного позиционирования на примере сателлитных повторов.

Благодарности

Авторы выражают благодарности В.Г. Левицкому и А.В. Вершинину за критические замечания. Работа была частично поддержана

Госконтрактом № 07.514.11.4003. Вычисления производились в суперкомпьютерном центре ИВМиМГ СО РАН (www.sscc.ru).

Литература

Deal R.B., Henikoff J.G. Henikoff S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones // Science. 2010. V. 328. P. 1161–1164.

Cohanim A.B., Haran T.E. The coexistence of the nucleosome positioning code with the genetic code on eukaryotic genomes // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. No 19. P. 6466–6476.

Feller W. An Introduction to Probability Theory and its Applications. V. 2. N.Y.: Wiley, 1971.

Gupta S., Dennis J., Thurman R.E. *et al.* Predicting human nucleosome occupancy from primary sequence // PLoS Comput. Biol. 2008. I4:eI000134.

Kaplan N., Moore I.K., Fondufe-Mittendorf Y. *et al*. The DNA-Encoded nucleosome organization of an eukaryotic genome // Nature. 2009. V. 458. P. 362–366.

Kaplan N., Moore I., Fondufe-Mittendorf Y. *et al*. Nucleosome sequence preferences influence in vivo nucleosome organization // Nat. Struct. Mol. Biol. 2010. V. 17. No 8. P. 918–920.

Karlin S., Altschul S.F. Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. No 6. P. 2264–2268.

Kiyama R., Trifonov E.N. What positions nucleosomes? – A model // FEBS Lett. 2002. V. 523. No 1/3. P. 7–11.

Locke G., Tolkunov D., Moqtaderi Z. *et al*. High-throughput sequencing reveals a simple model of nucleosome energetic // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. No 49. P. 20998–21003.

Macas J., Meszaros T., Nouzova M. PlantSat: a specialized database for plant satellite repeats // Bioinformatics. 2002. V. 18. P. 28–35.

Ringrose L. How do RNA sequence, DNA sequence, and chromatin properties regulate splicing? // F1000 Biol. Rep. 2010. 2. P. 74.

Segal E., Widom J. What controls nucleosome positions? // Trends Genet. 2009. V. 25. P. 335–343.

Schones D.E., Cui K., Cuddapah S. *et al*. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome // Cell. 2008. V. 132. No 5. P. 887–898.

Spies N., Nielsen C.B., Padgett R.A., Burge C.B. Biased chromatin signatures around polyadenylation sites and exons // Mol. Cell. 2009. V. 36. No 2. P. 245–254.

Sussman J.L., Trifonov E.N. Possibility of nonkinked packing of DNA in chromatin // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1978. V. 75. No 1. P. 103–107.

Tanaka Y., Nakai K. An assessment of prediction algorithms for nucleosome positioning // Genome Inform. 2009. V. 23. No 1. P. 169–178.

Trifonov E.N. Sequence-dependent deformational anisotropy of chromatin DNA // Nucl. Acids Res. 1980. V. 8. No 17. P. 165–171.

Trifonov E.N. Cracking the chromatin code: Precise rule of nucleosome positioning // Phys. Life Rev. 2011. V. 8. No 1. P. 39–50.

Valouev A., Ichikawa J., Tonthat T. *et al*. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning // Genome Res. 2008. V. 18. No 7. P. 1051–1063.

Valouev A., Johnson S.M., Boyd S.D. *et al*. Determinants of nucleosome organization in primary human cells // Nature. 2011. V. 474. No 7352. P. 516–522.

Xi L., Fondufe-Mittendor Y., Xia L. *et al*. Predicting nucleosome positioning using a duration Hidden Markov Model // BMC Bioinformatics. 2010. doi:10.1186/1471-2105-11-346.

NUCLEOSOME ORGANIZATION IN PLANT DNA SATELLITES

V.N. Babenko[1], K.O. Kutashev[1], V.F. Matvienko[2]

[1] Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia, e-mail: bob@bionet.nsc.ru;
[2] Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Satellite DNA, consisting of tandem repeats, forms heterochromatic regions packed into nucleosomes. Sequence and conformational DNA features responsible for the high efficiency of this package have been sought with a Fourier transform. The curvature profiles in tandem repeats differ significantly from a random model. As many as 50 % of the monomers have a periodicity of DNA bends in the vicinity of 170 bp, fitting the wrapping length of a single nucleosome within two highest-order harmonics in the DNA curvature profile. The nucleosome positioning scheme in subtelomeric satellites in plants differs from that in centromeric satellites.

Key words: nucleosome, positioning, Fourier transform, satellite repeats.

УДК 633.1:575.2

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ОБРАЗЦОВ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ (× *TRITICOSECALE* WITTMACK) ПОСРЕДСТВОМ RAPD- И ISSR-МАРКЕРОВ

© 2012 г. **О.А. Орловская, Л.В. Корень, Л.В. Хотылева**

Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь, e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

Поступила в редакцию 9 февраля 2012 г. Принята к публикации 20 февраля 2012 г.

Проведено изучение молекулярно-генетической гетерогенности 20 образцов яровой тритикале. Использованные ISSR- и RAPD-маркеры выявили высокий уровень полиморфизма (в среднем 80,2 и 89,9 % соответственно), что дало возможность сгруппировать изученные образцы тритикале по степени генетического родства и подобрать генетически дивергентные родительские пары для скрещиваний с целью получения гибридов с эффектом гетерозиса.

Ключевые слова: тритикале, RAPD- и ISSR-анализ, гетерозис.

Введение

Тритикале является самой молодой зерновой культурой и первым злаком, синтезированным человеком. Сочетая свойства пшеницы и ржи, данная культура может давать высокие урожаи в районах с неблагоприятными почвенно-климатическими условиями (засушливые районы, суровые условия в зимний период, неплодородные почвы), а по устойчивости к болезням тритикале не уступает ржи. В последние годы значительно возрос интерес к яровой тритикале. По уровню устойчивости к болезням, урожайности, кормовым качествам зерна и зеленой массе она составляет достойную конкуренцию другим яровым зерновым культурам. По урожайности зерна яровая тритикале значительно превышает пшеницу и овес и находится на уровне ячменя. Современные сорта существенно отличаются от своих предшественников, так как являются относительно низкорослыми, устойчивыми к полеганию, более скороспелыми. Следует отметить, что по уровню содержания белка в зерне (13–15 %) яровая тритикале достоверно превышает озимую. Отдельные сортообразцы характеризуются содержанием белка более 16 % при достаточно высоком уровне продуктивности. Кроме того, яровая тритикале в 1,5 раза превосходит ячмень по содержанию белка и в 1,6 раза озимую рожь по содержанию важнейшей незаменимой аминокислоты метионина.

Одним из направлений в селекции тритикале в последнее время является использование явления гетерозиса для создания высокопродуктивных гибридов с высокими кормовыми достоинствами зерна (Oettler *et al*., 2005; Tams *et al*., 2005; Fischer *et al*., 2010). Известно, что для получения гетерозисных гибридов предпочтительнее скрещивания между генетически отдаленными формами, чем между близкородственными формами. Для оценки генетического разнообразия селекционного материала широко используются такие молекулярно-генетические методы анализа, как RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). Есть сведения о применении SSR- и AFLP-маркеров для исследования генетической дивергенции озимых тритикале (Goral *et al*., 2005; Kuleung *et al*., 2006), а также данные об использовании ДНК-маркеров для предсказания гетерозиса у гибридов кукурузы, пшеницы и других культур (Bernardo, 1994;

Diers *et al*., 1996; Fabrizius *et al*., 1998). Проводятся исследования по установлению связи между степенью генетического сходства родительских компонентов и специфической комбинационной способностью (Tams *et al*., 2006). Таким образом, использование молекулярно-генетических методов помогает разрабатывать новые подходы идентификации ценного исходного материала для селекции на гетерозис, которые обеспечат сокращение затрат на создание новых конкурентоспособных гибридов.

Целью данного исследования является оценка степени генетической дивергенции образцов ярового тритикале посредством методов молекулярного маркирования для отбора исходного материала при селекции на гетерозис.

Материалы и методы

В исследование включены 3 белорусских сорта тритикале: Узор, Лотос и Ульяна; 3 сорта польской селекции: Матейко, Ванад и Дублет; 6 линий яровой тритикале из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино): МАН-17568, Bogo-47, Г-64, Г-80, Г-114, Г-225; 8 форм тритикале с различными системами генов яровизации, отобранных из F_8, синтезированных нами ранее первичных тритикале. Пшенично-ржаные амфигаплоиды получены на основе почти изогенных по локусам *Vrn1–Vrn3* линий мягкой пшеницы, созданных на генофонах сортов Triple Dirk и Мироновской 808. В качестве опылителя использовали диплоидную озимую рожь Восход и яровую аллоплазматическую рожь (Генетические основы …, 2010).

Выделение растительной ДНК проводили из зеленых листьев с помощью набора «Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas).

Для ISSR-анализа использовали 7 праймеров, 5 из которых содержали динуклеотидный повтор (ISSR24, ISSR4, ISSR11, ISSR10, ISSR9), 2 – тринуклеотидный (ISSR2, ISSR17) (табл. 1). RAPD-анализ проводили с использованием 5 10-нуклеотидных праймеров, синтезированных по аналогам фирмы «Operon Technologies», USA: OPC-01, OPC-05, OPC-11, OPD-07, OPD-15 (табл. 1). Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 15 мкл содержала: 0,25 мМ каждого dNTP, 2,5 мМ $MgCl_2$, 6/8 (RAPD/ISSR) пМ праймера, 0,11 ед. Taq-полимеразы в 1× буфере и 15/20 (ISSR/RAPD) нг ДНК. ПЦР проводили в амплификаторе Bio-Rad в следующих условиях: 94 °С 3 мин; 40/44 (ISSR/RAPD) циклов –

Таблица 1

Характеристика праймеров, использованных для изучения ДНК-полиморфизма образцов яровой тритикале

Праймер	Последовательность нуклеотидов, 5′-3′	Число ампликонов		Уровень полиморфизма, %
		всего	полиморфных	
ISSR-праймеры				
ISSR2	$(CAG)_5$	24	23	95,8
ISSR4	$(AC)_8AG$	10	9	90,0
ISSR9	$(GA)_8A$	9	4	44,4
ISSR10	$(AG)_8T$	10	4	40,0
ISSR11	$(AG)_8C$	7	5	71,4
ISSR17	$(AGC)_6G$	10	8	80,0
ISSR24	$(AC)_8TC$	16	16	100
RAPD-праймеры				
OPC-01	TTCGAGCCAG	9	7	77,8
OPC-05	GATGACCGCC	18	18	100
OPC-11	AAAGCTGCGG	18	16	88,9
OPD-07	TTGGCACGGG	14	13	92,9
OPD-15	CATCCGTGCT	10	8	80,0

94 °С 1 мин; 36 °/51,5–55,5 °С (RAPD/ISSR) 1 мин; 72 °С 2 мин; 72 °С 2/7 (RAPD/ISSR) мин. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 1,5/1,8 %-м (RAPD/ISSR) агарозном геле с добавлением бромистого этидия и фотографировали в системе GelDoc (Bio-Rad). Размеры амплифицированных фрагментов определяли относительно маркера М3 (100 bp DNA Ladder).

Для оценки уровня полиморфизма маркеров и определения уровня дивергенции между изученными генотипами полученные данные были представлены в виде матрицы состояний бинарных признаков, в которых наличие или отсутствие ПЦР-фрагментов одинаковой длины рассматривалось как состояние 1 и 0 соответственно. Для построения дендрограммы применяли метод невзвешенного парно-группового кластерного анализа с арифметическим усреднением (UPGMA) с использованием программы TREECON (version 1.3b) (Van De Peer, De Wachter, 1994). Генетические дистанции между образцами тритикале рассчитывали по Нею (Nei, Li, 1979).

Результаты и обсуждение

ISSR-маркеры с успехом использовались для оценки полиморфизма у таких культур, как кукуруза (Kantety *et al*., 1995), пшеница (Nagaoka, Ogihara, 1997), ячмень (Fernandez *et al*., 2002). В настоящей работе ISSR-анализ проводили с использованием праймеров, для которых, согласно литературным данным, показана высокая информативность при анализе геномов злаков (Sozen, 2010).

Все ISSR-праймеры дали воспроизводимый результат со всеми изученными образцами яровой тритикале. В целом учитывалось 86 амплифицированных фрагментов, 69 из которых были полиморфными (табл. 1).

Основная зона распределения фрагментов располагалась в диапазоне 300–1500 п.н., при этом большая часть полиморфных фракций (52,2 %) находилась в области 500–1000 п.н. Каждый из образцов имел свой определенный спектр амплифицируемых фрагментов, отличающийся от таковых у других образцов количеством, размером и степенью выраженности. Число локусов, полученных при амплификации ДНК исследованных образцов с каждым из праймеров, варьировало от 7 до 24. Среднее их число на праймер составило 12,3. Максимальное количество полиморфных фрагментов (24) получено в результате амплификации с праймером ISSR2 (рис. 1, а), минимальное (7) – с ISSR11. Установлено широкое варьирование количества полиморфных ISSR-локусов у изученных форм тритикале в зависимости от праймера: от 40 до 100 %. В среднем уровень полиморфизма, выявленный ISSR-анализом, составил 80,2 %. Наибольшая частота встречаемости полиморфных локусов отмечена при использовании ISSR24 (рис. 1, б).

Следует отметить, что в группе праймеров с динуклеотидным повтором наибольшую информативность проявили праймеры с повтором $(AC)_8$ - ISSR4 и ISSR24 (табл. 1). Праймеры ISSR10 и ISSR11, имеющие в своем составе повтор $(AG)_8$ демонстрировали различный уровень полиморфизма (40,0 и 71,4 % соответственно). Один из праймеров, ISSR9, содержал повтор $(GA)_8$, и выявил 44,4 % полиморфных

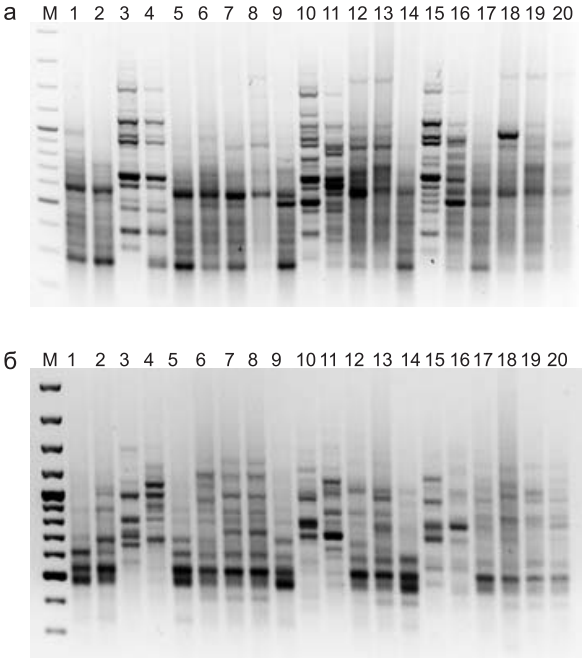


Рис. 1. Электрофоретические спектры ISSR фрагментов 20 образцов яровой тритикале: праймер ISSR2 (а), праймер ISSR24 (б).

М – маркер молекулярного веса, 1 – Узор, 2 – Матейко, 3 – Ульяна, 4 – Лотос, 5 – Ванад, 6 – Дублет, 7–12 – линии из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино), 13–20 – линии, созданные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск).

фрагмента у изученных образцов яровой тритикале. Согласно литературным данным (Sofalian *et al*., 2008), праймеры с динуклеотидным повтором $(GA)_n$, как правило, показывают наиболее низкий уровень полиморфизма, что согласуется с данными, которые получены нами.

ДНК 20 образцов яровой тритикале проанализированы также с использованием RAPD-праймеров (табл. 1). RAPD-анализ широко используется для изучения генетического полиморфизма растений (Welsh, McClelland, 1990; Salem *et al*., 2007). В данном исследовании RAPD-анализ проводили с высокополиморфными праймерами, отобранными на основании литературных данных (Nimbal *et al*., 2009). С помощью 5 RAPD-праймеров выявлены 69 амплифицированных фрагментов, из которых 62 (89,9 %) были полиморфными. Полученные RAPD-спектры состояли из 9–18 ампликонов длиной 200–2000 п.н. В среднем у образцов яровых тритикале один праймер инициировал синтез 13 фрагментов ДНК. Наибольшее число полиморфных ПЦР-локусов получено при амплификации с праймером ОРС-05 (рис. 2). Следует отметить, что данный праймер обнаружил 100 %-й полиморфизм между проанализированными образцами тритикале. Частота встречаемости полиморфных фрагментов для изученного материала была достаточно высокой и варьировала от 77,8 до 100 %, в зависимости от праймера и в среднем составила 89,9 %.

Анализ полиморфизма фрагментов ДНК при использовании данных ISSR- и RAPD-праймеров оказался достаточно информативным методом, который позволил различить образцы яровых тритикале. На основе полученных результатов была построена дендрограмма генетического сходства исследуемого материала (рис. 3).

Все проанализированные генотипы четко разделились на два кластера, содержащих 15 и 5 образцов соответственно. Первый кластер в свою очередь состоит из двух подкластеров, больший из которых включает две группы образцов. В одну группу вошли сорта польской селекционно-семеноводческой фирмы «Danko Hodowla Roslin Sp. z o.o.» (Ванад, Дублет и Матейко) наряду с линиями из Научно-практического центра НАН Беларуси по земледелию: МАН-17568, Bogo-47, Г-114. Данные линии

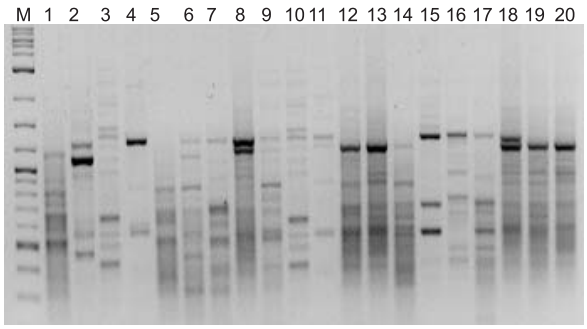


Рис. 2. Электрофоретические спектры RAPD фрагментов 20 образцов яровой тритикале (праймер ОРС-05).

М – маркер молекулярного веса, 1 – Узор, 2 – Матейко, 3 – Ульяна, 4 – Лотос, 5 – Ванад, 6 – Дублет, 7–12 – линии из РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» (г. Жодино), 13–20 – линии, созданные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси (г. Минск).

были созданы на основе сорта тритикале польской селекции Bogo, что объясняет объединение их в одну группу с польскими сортами. Вторую группу сформировали образцы тритикале, полученные в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в результате гибридизации изогенных по локусам *Vrn1–Vrn3* линий и сортов мягкой пшеницы с диплоидной озимой рожью Восход и яровой аллоплазматической рожью. Сорт тритикале Узор, созданный в Научно-практическом центре НАН Беларуси по земледелию, формирует отдельную ветвь в данном подкластере, что может указывать на его обособленность от других образцов. Во втором подкластере группируются только два образца, синтезированные на основе линий пшеницы Мироновская 808-13, TD D и аллоржи.

Второй небольшой кластер объединил в себе материал только белорусской селекции, в котором сорт Лотос группировался с линией Г-80, а сорт тритикале Ульяна – с линией Г-225, что говорит об их генетическом сходстве. Линия TD B × Восход, созданная в Институте генетики и цитологии, входила в один подкластер с сортом Ульяна и линией Г-225.

Необходимо отметить, что наименьшие значения генетических дистанций выявлены между линиями тритикале, созданными на основе изогенных по генам *Vrn1–Vrn3* линий мягкой пшеницы и яровой аллоплазмотической ржи. Так, между образцами TD B × аллорожь и

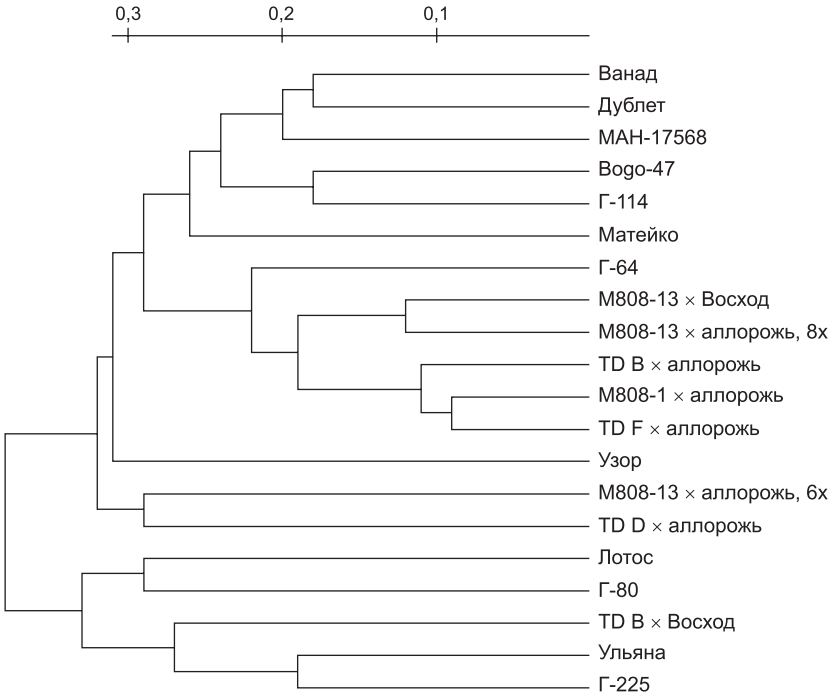


Рис. 3. Дендрограмма генетического сходства образцов яровой тритикале, построенная на основе результатов ISSR- и RAPD-анализов.

TD F × аллорожь генетическая дистанция составила 5,69, между TD F × аллорожь и Мироновская 808-1 × аллорожь – 6,98, между TD B × аллорожь и Мироновская 808-1 × аллорожь – 7,81. Большим генетическим сходством обладали также сорта польской селекции Ванад и Дублет (10,26). По данным ISSR- и RAPD-анализа, существенные различия обнаружены между линиями тритикале, созданными в Институте генетики и цитологии, и сортами яровой тритикале как белорусской, так и польской селекции. Самые большие генетические расстояния отмечены между линией TD B × Восход и сортами Ванад, Узор, Матейко и Дублет (42,28–47,17). С целью получения гетерозисных гибридов для скрещивания отобраны наши линии Мироновская 808-13 × Восход, M808-1 × аллорожь, TD D × аллорожь, TD F × аллорожь, TD B × Восход и сорта Ванад, Дублет, Матейко и Узор.

Заключение

Использованные для изучения молекулярно-генетической гетерогенности 20 образцов яровой тритикале ISSR- и RAPD-праймеры выявили высокий уровень полиморфизма (в среднем 80,2 и 89,9 % соответственно), что позволило сгруппировать образцы ярового тритикале по степени генетического родства и подобрать генетически удаленные родительские пары для скрещиваний с целью получения гибридов с эффектом гетерозиса.

Литература

Генетические основы селекции растений: В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений / Ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск: Беларус. навука, 2010. 579 с.

Bernardo R. Prediction of maize single-cross performance using RFLPs and information from related hybrids // Crop Sci. 1994. V. 34. No 1. P. 20–25.

Diers B.W., Mcvetty P.B.E., Osborn T.C. Relationship between heterosis and genetic distance based on RFLP markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.) // Crop Sci. 1996. V. 36. No 1. P. 79–83.

Fabrizius M.A., Busch R.H., Khan K., Huckle L. Genetic diversity and heterosis of spring wheat crosses // Crop Sci. 1998. V. 38. No 4. P. 1108–1112.

Fernandez M.E., Figueiras A.M., Benito C. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 845–851.

Fischer S., Maurer H.P., Würschum T. *et al*. Development of heterotic groups in Triticale // Crop Sci. 2010. V. 50. No 2. P. 584–590.

Goral H., Tyrka M., Spiss L. Assessing genetic variation to predict the breeding value of winter triticale cultivars and lines // J. Appl. Genet. 2005. V. 46. P. 125–131.

Kantety R.V., Zeng X.P., Bennetzen J.L., Zehr B.E. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification // Mol. Breeding. 1995. V. 1. P. 365–373.

Kuleung C., Baenziger P.S., Kachman S.D., Dweikat I. Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers // Crop Sci. 2006. V. 46. P. 1692–1700.

Nagaoka T., Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphysms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 597–602.

Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. No 10. P. 5269–5273.

Nimbal S., Behl R.K., Chhabra A.K. RAPD analysis for genetic polymorphism in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes varying for grain protein content // The South Pacific J. Nat. Sci. 2009. V. 27. P. 49–56.

Oettler G., Tams S.H., Utz H.F. *et al.* Prospects for hybrid breeding in winter triticale: Heterosis and combining ability for agronomic traits in European elite germplasm // Crop Sci. 2005. V. 45. No 4. P. 1476–1482.

Salem H.H., Ali B.A., Huang T.-H. *et al.* Use of random amplified polymorphic DNA analysis for economically important food crops // J. Integr. Plant Biol. 2007. V. 49. No 12. P. 1670–1680.

Sofalian O., Chaparzadeh N., Javanmard A., Hejazi M.S. Study the genetic diversity of wheat landraces from northwest of Iran based on ISSR molecular markers // Int. J. Agric. Biol. 2008. V. 10. No 3. P. 466–468.

Sozen E. Evaluation of ISSR markers to assess genetic variability and relationship among winter triticale (× *Triticosecale* Wittmack) cultivars // Pak. J. Bot. 2010. V. 42. No 4. P. 2755–2763.

Tams S.H., Melchinger A.E., Bauer E. Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data // Plant Breed. 2005. V. 124. No 3. P. 154–160.

Tams S.H., Bauer E., Oettler G. *et al.* Prospects for hybrid breeding in winter triticale: II. Relationship between parental genetic distance and specific combining ability // Plant Breed. 2006. V. 125. No 5. P. 331–336.

Welsh J., McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers // Nucl. Acids Res. 1990. V. 18. P. 7213–7218.

Van De Peer Y., De Watcher R. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment // Comput. Applic. Biosci. 1994. V. 10. P. 569–570.

EVALUATION OF GENETIC POLYMORPHISM OF SPRING TRITICALE ACCESSIONS (× *TRITICOSECALE* WITTMACK) BASED ON RAPD AND ISSR MARKERS

O.A. Orlovskaya, L.V. Koren, L.V. Khotyleva

Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: O.Orlovskaya@igc.bas-net.by

Summary

Molecular heterogeneity was studied in 20 spring triticale accessions by using ISSR and RAPD markers. The study revealed a high level of polymorphism (80,2 % and 89,9 %, respectively, on the average), which allowed the studied triticale accessions to be grouped according to the degree of genetic relationship and to choose genetically distant parental pairs for crosses to obtain heterotic hybrids.

Key words: triticale, RAPD and ISSR markers, heterosis.

УДК 575.1(091/092)

ЕГО ЖИЗНЬ БЫЛА ПОДЧИНЕНА ОДНОЙ ЗАДАЧЕ: УЗНАТЬ, КАК РАБОТАЕТ ХРОМОСОМА.

К 65-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ ГЕНЕТИКА ЕВГЕНИЯ ВИТАЛЬЕВИЧА АНАНЬЕВА (1947–2008)

© 2012 г. **О.Н. Данилевская**

Pioneer Hi-Bred International, A DuPont Business, USA, e-mail: olga.danilevskaya@pioneer.com

Поступила в редакцию 9 января 2012 г. Принята к публикации 23 января 2012 г.

Евгений Витальевич Ананьев родился 13 января 1947 г. в Москве. Его родители, Виталий Дмитриевич и Мария Андреевна, были молодой супружеской парой, по-существу, два недоучившихся великовозрастных школьника, в силу обстоятельств военного времени призванные трудиться на заводе «Точных измерительных приборов». Родители работали и одновременно доучивались в школе рабочей молодежи, а бабушка, Марфа Петровна, растила внука. Жили вместе в маленькой полуподвальной квартире дома 2/4 по Полуярославскому переулку в Сыромятниках, недалеко от Курского вокзала. Марфа Петровна потеряла мужа и старшего сына на Великой Отечественной войне и проявила незаурядную волю и силу характера, поднимая одна троих детей. Иногда она ходила с ведром на стоянку паровозов на Курском вокзале выбирать несгоревший уголь в отвалах из паровозных топок, чтобы отапливать квартиру. Жили голодно и бедно. Ничто не предвещало, что Женя Ананьев станет ученым-генетиком, что на его долю выпадут выдающиеся открытия и завершит он свой научный путь синтезом искусственной хромосомы.

Почему и как у Жени воникло желание стать биологом, он описал в своих воспоминаниях. «Решение посвятить, по крайней мере, часть своей жизни образованию и науке пришло ко мне довольно рано, лет в двенадцать, когда я впервые испугался стука собственного сердца и стало ясно, что все мы смертны. И этот страх смерти побудил меня обратиться к биологии и медицине. Я со страшной силой стал читать биологические учебники, с тем чтобы понять, в чем же скрыт секрет жизни, где он».

Чтобы иметь один дополнительный летний сезон для поступления в университет, в 1963 г. Женя перешел из дневной школы в десятый класс вечерней школы рабочей молодежи, совмещая учебу с работой рабочим сцены в театре Советской Армии, слесарем Моспромгаза. «Работая в Моспромгазе я увидел подземную часть Москвы и самую ужасную ее сторону – производство. Где я только не бывал: на заводах и фабриках, кожевенных предприятиях, мясокомбинатах и подземных котельнях. Это было дно и утроба Москвы. С одной стороны, это было ужасно, с другой – очень познавательно».

Но мечта стать ученым не оставляла его. Помог случай: «Отец, лечившийся в больнице им. Ганушкина от алкоголизма, разговорился с лечащим врачом Кириллом Вешневым. Он дал отцу телефон своей сестры Ирины Вешневой, которая в то время работала в Институте радиационной физико-химической биологии (будущий Институт молекулярной биологии АН СССР), возглавляемом академиком В.А. Энгельгардом. Я позвонил и познакомился с Виктором Мироновичем Гиндилисом, который в конце-концов и стал моим первым научным наставником».

9 февраля 1965 г. Женя был зачислен в лабораторию А.А. Прокофьевой-Бельговской препаратором с окладом 45 руб. в месяц, где он и проработал последующие три года. Здесь он прошел отличную школу цитогенетики и полу-

Шестилетний Женя Ананьев. Москва, 1953 г. Здесь и далее – фотографии из семейного архива Ананьевых-Данилевских.

В средней школе. Москва, 1960 г.

С В.М. Гиндилисом в Институте радиационной физико-химической биологии АН СССР. Москва, 1966 г.

чил первые представления о систематической работе над научной проблемой. Он был отдан в помощь Виктору Мироновичу Гиндилису. Виктор Миронович понял, что Женя талантливый парень и уделял ему очень много времени, внимания и сил. Он составил для него список книг, которые обязательно надо было прочитать, подарил словарь иностранных слов и стал заниматься с ним английским языком. В то время Виктор Миронович работал над своей кандидатской диссертацией, посвященной описанию нормального кариотипа хромосом человека.

Женя готовил препараты метафазных хромосом, фотографировал их и печатал фотографии, а Виктор Миронович садился за бинокулярную лупу, иголочкой аккуратно наносил точки по длине хромосом и с помощью измерительной лупы измерял дистанцию между точками. Это была кропотливая и изнурительная работа, но она сформировала у Жени интерес к хромосоме, который он пронес через четыре десятилетия своей научной карьеры.

В марте 1965 г. с третьей попытки Женя сдал экзамены в Московский государственный университет и был принят на вечернее отделение биофака. В 1967 г. он перешел с вечернего на дневное отделение, в связи с тем что была снята отсрочка от службы в армии со студентов вечернего отделения. Перейти на дневное отделение ему помогла А.А. Прокофьева-Бельговская. «Я подал заявление в деканат с просьбой о переводе меня на дневное отделение на кафедру генетики и селекции. Но Валентин Андреев, заведующий кафедрой в то время, мне отказал. Тогда Виктор Гиндилис убедил Мадам (А.А. Прокофьева-Бельговская) помочь мне решить эту проблему. Мы поехали вместе с ней на автобусе в университет. Я достал две пятикопеечные монеты, чтобы заплатить за наш проезд. «Что вы, Женя, вот когда вы станете академиком, тогда и будете платить за меня, а пока я заплачу».

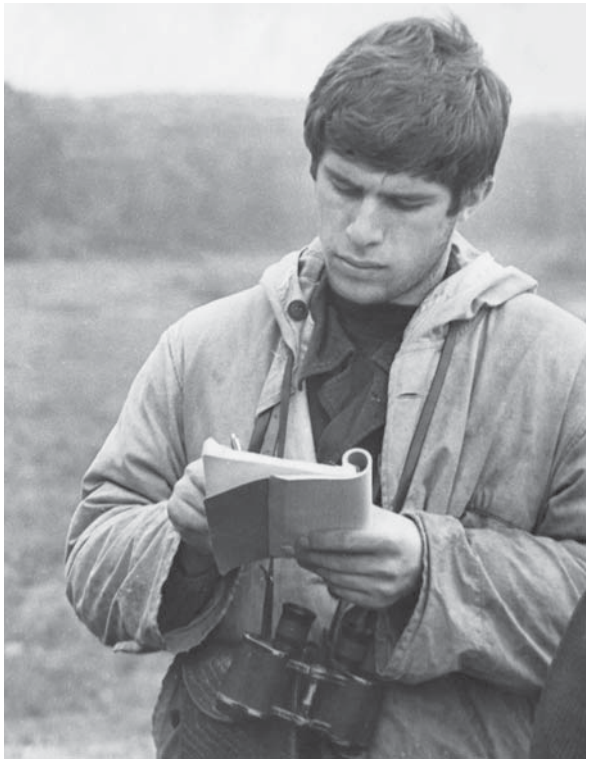
Мы познакомились с Женей в 1967 г. на третьем курсе кафедры генетики биофака МГУ. Его очень интересовала структура хромосомы. Однажды, слушая лекцию Александра Сергеевича Спирина по молекулярной биологии, Женя был поражен экспериментом с разворачиванием рибосомы до нуклеопротеинового тяжа путем снижения концентрации ионов магния. У него тут же возникла идея, что можно таким же способом «развернуть» хромосому и понять, сколько нитей лежит в ее основе. Тогда шли бурные споры о том, «одно-» или «многонитчата» хромосома. Другой яркий эпизод из студенческой жизни связан с идеей получения политенных хромосом человека. Казалось, получи гигантские хромосомы человека – и будут решены многие генетические проблемы. Идея Жени была примитивно проста: добавить в культуру клеток человека экстракт из слюнных желез дрозофилы, в клетках которых происходит политенизация хромосом. Присутствующий в них гипотетический фактор должен вызвать политенизацию хромосом человека. В лаборатории А.А. Прокофьевой-Бельговской дрозофилой не занимались, но Женя решил, что вместо дрозофилы вполне сойдут личинки хирономуса, или, по-простому, мотыля, который рыбаки используют в качестве наживки. Идея требовала немедленного воплощения. Несмотря на лютый январский мороз, в одно из воскресений мы отправились на Птичий рынок. Продавцы держали живой товар в подогреваемых столиках. Чтобы мотыль не замерз, Женя положил бумажные кулечки за пазуху, и мы

О.Н. Данилевская и Е.В. Ананьев в Кремлевском саду. Москва, 15 мая 1968 г.

поехали в лабораторию. Конечно, из этого эксперимента ничего не вышло, но энтузиазм Жени был очень заразителен. Это был уже его стиль – работать быстро, энергично, не откладывая дела и идеи в «долгий ящик». Мы поженились летом в 1969 г. после окончания 4-го курса. Наша семейная и научная жизнь всегда была тесно переплетена.

После окончания МГУ в 1970 г. мы оба поступили на работу в Институт атомной энергии им. И.В. Курчатова, реорганизованный в Институт молекулярной генетики АН СССР в 1978 г. Женя был старшим лаборантом в лаборатории Владимира Алексеевича Гвоздева, а я – аспиранткой в лаборатории Романа Бениаминовича Хесина. В качестве темы для кандидатской диссертации Владимир Алексеевич предложил Жене провести цитогенетический анализ хромосомы дрозофилы при эффекте положения и при дозовой компенсации. Это были классические генетические явления у дрозофилы, молекулярная природа которых в то время была непонятна. Женя очень быстро, всего за два года, сумел показать, что при эффекте положения эукариотические участки хромосом, перенесенные в гетерохроматин, подвергаются недорепликации и снижению транскрипционной активности в соответствующих пуфах. При дозовой компенсации наблюдалось изменение транскрипционного уровня в Х-хромосоме. Обе работы были награждены премией им. И.В. Курчатова для молодых ученых (Ananiev, Gvozdev, 1974; Ananiev *et al.*, 1974). В феврале 1975 г. Женя защитил кандидатскую диссертацию «Исследование репликации ДНК и транскрипции в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*». В эти же годы по своей инициативе он провел серию экспериментов по измерению длины репликонов в культуре клеток дрозофилы, что явилось пионерской работой в этой области (Ananiev *et al.*, 1977).

Необходимо было выбирать новую тему для работы. Это был переходный период в попытках найти перспективную тему для дальнейшей работы. В 1970-х годах появилась новая методика – гибридизация *in situ*, впоследствии в связи с клонированием ДНК ставшая одним из самых эффективных цитологических методов, используемых для изучения структуры хромосомы и экспрессии генов. По предложению Владимира



На летней практике в Звенигороде. 1966 г.

Алексеевича Женя освоил новую методику и с присущим ему мастерством довел гибридизацию *in situ* с политенными хромосомами до совершенства. Владение этой методикой позволило Жене выполнить ключевой эксперимент, который привел к открытию мобильных элементов дрозофилы.

В начале 1976 г. в лаборатории Георгия Павловича Георгиева в Институте молекулярной биологии АН СССР аспирантом Колей Чуриковым были клонированы фрагменты кДНК дрозофилы. По договоренности между Г.П. Георгиевым и В.А. Гвоздевым локализация фрагментов на хромосомах была поручена Жене Ананьеву. Первый эксперимент по гибридизации был проведен в июне 1976 г. с фрагментом *Dm225*, в дальнейшем вошедшим в литературу как МДГ1 (Ananiev *et al.*, 1977; Georgiev *et al.*, 1977; Tchurikov *et al.*, 1978). В своих воспоминания Евгений Витальевич описал сокровенный момент открытия: «К этому времени я уже освоил методику гибридизации *in situ* на политенных хромосомах дрозофилы. На моем первом и единственном препарате я увидел, что, действительно, этот кусочек ДНК

гибридизуется примерно с 40 участками на политенных хромосомах. При сравнении одной и той же хромосомы, например, Х-хромосомы из разных ядер, можно было видеть, что набор гибридизующихся участков и их местоположение в хромосоме были сходны. Одно ядро, однако, привлекло мое внимание. В этом ядре отцовская и материнская хромосомы, составляющие пару гомологичных хромосом, не были тесно сконъюгированы, как обычно наблюдается в большинстве ядер, а несколько разошлись друг от друга. Распределение гибридизующихся участков (так называемых сайтов гибридизации) на этих гомологичных хромосомах оказалось полностью различным. Это было что-то совершенно новое! Согласно классической генетике, гомологичные хромосомы содержат идентичный набор генов, расположенных в строго определенном порядке. А в данном случае ген (в то время мы еще не знали настоящую природу этого кусочка ДНК) находился в разных местах гомологичных хромосом, т. е. был способен “перемещаться” по хромосоме. Это была загадка! Что это? Мобильные элементы, которые недавно были найдены у бактерий, или мистические контролирующие элементы, обнаруженные у кукурузы Барбарой Мак-Клинток? А может, просто некая особенность генома дрозофилы?». Евгений Витальевич ответил на эти вопросы, проведя кропотливый и детальный цитологический анализ распределения сайтов гибридизации в родительских линиях дрозофилы. Он пришел к выводу, что клонированные фрагменты представляют собой мобильные элементы. История этого открытия подробно описана в моей статье (Данилевская, 2011) (рис. 1).

Открытие мобильных элементов дрозофилы было первым серьезным успехом Советской науки в молекулярной генетике и до сих пор является одним из наиболее значительных достижений советской молекулярной биологии. 30 лет тому назад трудно было даже представить, что мобильные элементы, которые казались отклонением от нормы, на самом деле являются самыми многочисленными компонентами геномов и составляют основную «массу» хромосом. Клонирование мобильных элементов без преувеличения открыло новую эру в изучении структуры хромосом. За цикл работ «Мобильные элементы животных» в ноябре 1983 г. коллективу авторов из 10 человек (Г.П. Георгиев, Ю.В. Ильин, А.П. Рысков, Г.К. Скрябин, А.С. Краев, Д.А. Крамеров, Н.А. Чуриков, В.А. Гвоздев, Е.В. Ананьев и А.А. Баев) была присуждена Государственная премия СССР.

Женя защитил докторскую диссертацию «Цитогенетика мобильных элементов дрозофилы» 14 марта 1983 г. Диссертация написана логично и ясно и даже спустя 30 лет звучит современно. «Основным результатом работы

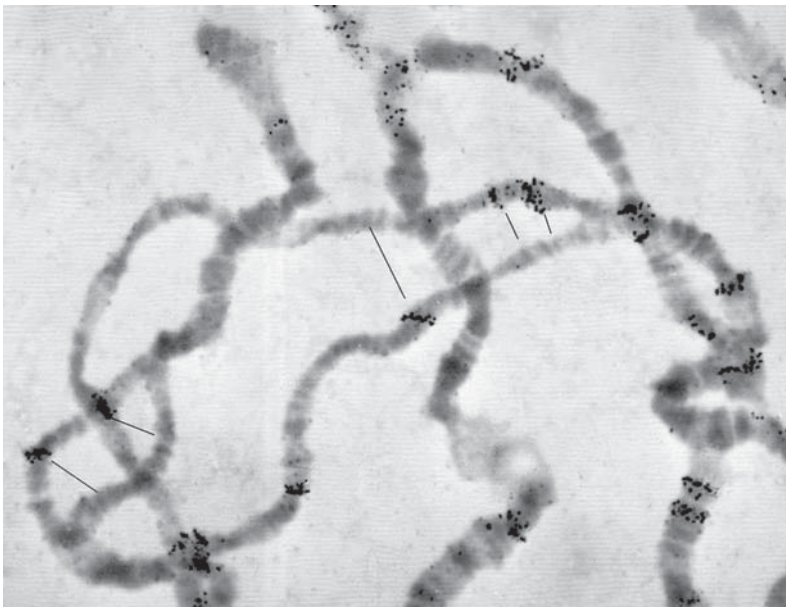


Рис. 1. Гибридизация мобильного элемента МДГ1 (Dm 225) на политенных хромосомах дрозофилы. В месте расхождения родительских хромосом сигнал гибридизации виден в одной и отсутствует в другой хромосоме. 1976 г.

является открытие и подробная молекулярно-генетическая характеристика мобильных генетических элементов дрозофилы». В этой работе он установил ряд фундаментальных свойств мобильных элементов: широкое распространение по всему геному, включая эу- и гетерохроматин; высокий уровень индивидуального полиморфизма по расположению в хромосомах; постоянство локализации в процессе онтогенеза; постоянное число копий одного семейства в пределах одного вида дрозофилы; низкая частота транспозиции, не превышающая порядка величин 10^{-4} на сайт за поколение. Кроме того, эксперименты с разными видами дрозофилы позволили сделать вывод, что мобильные элементы «представляют собой сбалансированную систему генетических элементов, эволюционирующих координированно».

Параллельно с основной работой в лаборатории В.А. Гвоздева Женя много сотрудничал с Витей Барским в Институте молекулярной биологии АН СССР, где они растягивали с помощью микроманипулятора политенные хромосомы дрозофилы для построения электронно-микроскопической карты политенных хромосом. В.Е. Барский недавно написал мне: «В то время Женя параллельно работал со мной. Мы “растягивали” хромосомы, и Женя мне рассказывал о том, как идет работа с Гвоздевым и Георгиевым. Меня тогда поразило, как Женя абсолютно параллельно ведет две практически независимые работы: строение хромосом и локализацию клонов, которые потом оказались МДГ». Их хромосомный атлас был опубликован в виде отдельной книги (Ананьев, Барский, 1985). На хромосомах были локализованы с высокой точностью мобильные элементы и многие клонированные к тому времени гены.

Имея за плечами такой научный багаж и страстно желая вести самостоятельную научную работу, Женя начал искать должность, которая дала бы ему свободу и возможность создать свой коллектив. Такой случай пред-

Лаборатория В.А. Гвоздева в Институте молекулярной генетики АН СССР. Первый ряд слева направо: Андрей Крамеров, Дмитрий Муха; второй ряд слева направо: Галина Коган, Мария Балакириева, Елена Пасюкова, Борис Лейбович; третий ряд слева направо: Евгений Ананьев, Евгений Метаковский, Галина Хромешина, Любовь Полукарова, Владимир Алексеевич Гвоздев, Яков Розовский, Геннадий Толчков, Владимир Алоторцев. Москва, 1982 г.

ставился в 1983 г., когда Алексей Алексеевич Созинов, директор Института общей генетики им. Н.И. Вавилова АН СССР, предложил ему должность заведующего лабораторией, но при одном условии – нужно было сменить объект исследований и заняться генной инженерией ячменя, т. е. он должен был кардинально изменить тематику своих исследований. Это был трудный выбор, сделав который Женя начал с нуля. Он представил научную программу и был единогласно избран Ученым советом Института на должность заведующего лабораторией. В его трудовой книжке от 10 мая 1983 г. записано: «Назначен в связи с избранием по конкурсу в порядке перевода на должность заведующего лабораторией молекулярной цитогенетики».

Предстоял титанический труд, потребовавший неимоверных усилий как по освоению нового объекта, так и по подбору сотрудников и руководству лабораторией. А.А. Созинов поддержал молодого заведующего: выделил помещения, присоединил существующую лабораторию под руковоством Л. Чернина и разрешил нанимать новых сотрудников. В результате у Евгения Витальевича образовался большой научный коллектив.

Основные задачи заключались в изучении различных аспектов структуры генома. Идея состояла в том, чтобы повторить нечто подобное тому, что было сделано на дрозофиле, посмотреть, какой процент генома составляют мобильные генетические элементы. А. Чернышев, который был достаточно опытным и уверенным молекулярным биологом, занялся созданием космидных библиотек из генома ячменя. Работа по изучению структуры генома в основном легла на плечи М. Рыжика и Н. Сониной. Аспирант Д. Белостоцкий занимался «реликтовой» ДНК, которая не разрезается никакими рестриктазами и при разгонке остается на вершине геля, содержит множество своеобразных повторяющихся последовательностей ДНК, включая теломерные последовательности. Аспирантка Цветана Хвырлева изучала струкутру 5S рибосомных генов. Оля Саянова изучала структуру генов запасных белков С-гордеинов. Признанием значимости работ лаборатории явилось приглашение написать главу по структуре генома ячменя (Ananiev, 1992) в книге «Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology», изданной в Англии.

В своем кабинете в Институте общей генетики АН СССР. Москва, 1986 г.

Soviet, U.S. scientists exchange information on crop genetics

Thomas Osborn, center, of the Department of Agronomy discussed his work on crop genetics with Soviet agricultural scientists V. Ananyev, left, and Eleonora Piruzian. Ananyev is chief of Laboratory at the Institute of General Genetics in Moscow and Piruzian is chief of laboratory at the Institute of Molecular Genetics in Moscow. The two were part of a 10-member Soviet delegation that visited the United States to exchange information with U.S. scientists about plant molecular biology and genetic engineering. The group was at the UWMadison on Oct. 8-10, where they met with chancellor Donna E. Shalala, Leo Walsh, dean of the College of Agricultural and Life Sciences, and several plant scientists; they also toured the Biotechnology Center and the Biotron. The visit was part of a workshop sponsored by the National Academy of Sciences and the Academy of Sciences of the USSR.

Е.В. Ананьев и Э.С. Пирузян с делегацией советских ученых в Университете штата Висконсин, США. 8–10 октября 1988 г.

Сложной проблемой была разработка трансформации у злаков. Идеи были новаторские, применили баллистическую пушку и электропорацию, но технические трудности не позволяли довести методики до практического применения. С «личной» лаборанткой Леной Яковлевой, которая перешла вместе с Евгением Витальевичем из Института молекулярной генетики, они пытались заниматься изучением развития зародышей ячменя на ранних стадиях после оплодотворения, что было очень интересно и красиво, но требовало много времени, которого у него катастрофически не хватало. Подводя итог своей деятельности в Институте общей генетики, Евгений Витальевич писал в своих воспоминаниях: «Несмотря на трудности, связанные с финансированием, оборудованием и сотрудниками, тем не менее, пять человек у меня защитили кандидатские диссертации: Дима Белостоцкий, Цветана Хвырлева, Миша Рыжик, Наташа Чемересюк, Оля Саянова. Мы опубликовали, наверное, десятка два статей как в советских так и зарубежных журналах. Так что продукция была, но не достаточно эффективно, как хотелось бы мне».

Начавшаяся в конце 1980-х гг. горбачевская «перестройка» внесла изменения в научные и жизненные планы. Все нарастающая экономическая разруха превратила жизнь в борьбу за выживание. Наукой заниматься стало практически невозможно. Начался массовый отток научных сотрудников за рубеж. Из лаборатории Евгения Витальевича в США уехали А. Колчинский, М. Головкин, С. Мехедов, О. Покровская, А. Газумян, в Англию – Д. Белостоцкий и О. Саянова, в Израиль – М. Рыжик. В нашей семье я первая выехала в США по приглашению Мэри-Лу Пардью работать в ее лаборатории в Массачусетском технологическом институте по структуре теломер дрозофилы. Я занималась этой тематикой уже несколько лет, у меня были хорошие публикации. В конце октября 1991 г. я с сыном улетела в Бостон. Вскоре и Евгению Витальевичу представилась возможность по приглашению Тома Блейка, специалиста по генетики ячменя, поехать в командировку в США в Университет Монтаны, Боземан. «Улетал я из Москвы в Нью-Йорк ранним утром, в 4 часа утра, 13 января 1992 г. Около полуночи я наконец добрался из Нью-Йорка до Бостона. Это был самый длинный день моего рождения. Начался новый этап нашей жизни. Упорная борьба за выживание в чужой стране, освоение языка, работа по 14 часов в университете, приобретение элементарных навыков жизни в капиталистической стране, вождение машины, дороги и т. д.» Евгений Витальевич провел 4 месяца в Университете Монтаны, где уже работал его сотрудник Володя Каназин. За короткий срок они с Володей сделали две работы: одну по полиморфизму запасных белков ячменя и вторую – по структуре локуса рибосомных 5S РНК (Kanazin *et al.*, 1993a, b).

Летом 1992 г. Евгений Витальевич возвращается к нам в Бостон, но найти работу по растительной тематике здесь было невозможно.

Пришлось пойти на компромисс – начать работу на вольвоксе в Университете им. Брандайса, в предместьях Бостона. В январе 1993 г. он написал письмо Юрию Петровичу Алтухову, тогдашнему директору Института общей генетики: «Прошел еще один год жизни и работы в Америке. Жизнь очень насыщенная и напряженная как в Университете, так и в семье. Много событий, проблем, удач и неудач. В начале июня ездил на конференцию в Ноксвилл, где работает Саша Колчинский. Туда же приехал Володя Каназин и Дима Белостоцкий. Четыре человека из одной лаборатории! Встреча была очень теплой. Саша был за хозяина и принимал нас очень хорошо. Все довольны своей жизнью. У всех очень хорошие достижения по работе. У всех молодых людей далеко идущие планы. Что касается меня, то я бы хотел вернуться в Институт в собственную лабораторию. Вместе с тем обстоятельства вынуждают принимать трудные решения. Работать здесь, конечно, сплошное удовольствие, но необходимо обрести твердую основу для того, чтобы уехать отсюда с грантом для совместной работы. К сожалению, решить эту задачу не очень просто. Но я не теряю надежды и работаю над этим. Вместе с тем чувства раздвоены и душа болит. Годы напряженной работы, лишений, нервных срывов, рост лаборатории, весь сложный спектр отношений с сотрудниками, от теплых до холодных, успехи и достижения – все пошло прахом. И это обидно. Ведь это – целая жизнь». Но реализовать это желание – вернуться на Родину с грантом – так и не удалось.

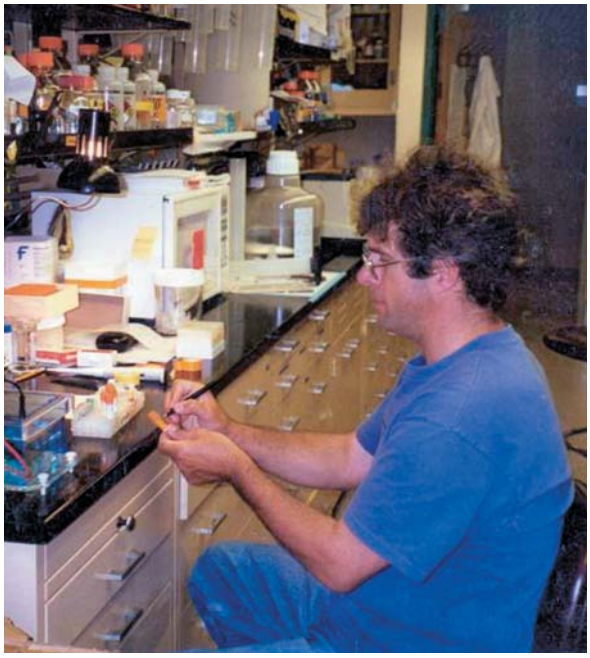
Работа в Брандайсе не приносила никакого удовлетворения. Евгений Витальевич стал целенаправленно искать интересный проект, который дал бы возможность осуществить его замыслы – получить грант и постоянную позицию. О линиях овса с дополнительными хромосомами кукурузы Евгений Витальевич прочел в 1994 г. в журнале «Science» и сразу же оценил огромный потенциал этих линий. Эти удивительные химерные растения овса, несущие по одной хромосоме кукурузы, давали возможность изучать индивидуальную хромосому. Это было то, что интересовало его всегда – хромосома и ее структура. Он написал письмо Рону Филлипсу, директору Института генетики растений при Университете Миннесоты, и получил приглашение на работу. Мы с сыном остались в Бостоне, потому что позиция была временная и не было смысла переезжать всей семьей на короткий срок.

В Университете Миннесоты Евгений Витальевич работал с января 1995 по август 1998 гг. Это был невероятно продуктивный период. За два с половиной года он провел фундаментальные исследования структуры центромеры и гетерохроматических повторов в геноме кукурузы и накопил экспериментальный материал, который был включен в 10 публикаций. В этот короткий срок проявились все лучшие черты его научного характера: безошибочная интуиция в выборе объекта исследования, проницательная наблюдательность, эстетический подход к эксперименту и огромная энергия. Здесь же проявился в полной мере его блестящий талант экспериментатора. Он, работая один, без лаборантов, создавал геномные библиотеки, скринировал, клонировал, секвенировал и, конечно, делал гибридизацию *in situ*. Его цитологические препараты хромосом, гибридизованных с флюоресцентными метками разных цветов, доставляют поистине эстетическое удовольствие. Этих препаратов были тысячи. Они служили одной цели – точно локализовать фрагменты ДНК на хромосомах. В результате были опубликована серия замечательных статей.

Один цикл статей был посвящен структуре гетерохроматических узелков на хромосомах кукурузы, так называемых «нобов», открытых еще Барбарой Мак-Клинток. На основе полиморфизма и структуры, сходной с «fold-back»-транспозонами дрозофилы, Евгений предложил остроумную гипотезу о том, что «нобы» являются гигантскими транспозонами (Ananiev *et al.*, 1998a, b).

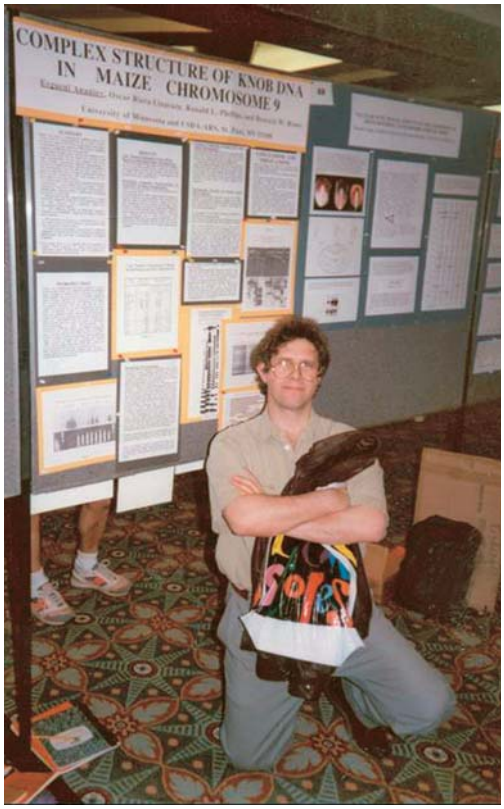
Другой, ставшей классической, была статья по молекулярной организации центромеры кукурузы. В ней было показано, что центромера состоит из короткого сателлит-подобного повтора, названного им *centC*, который организован в длинные тандемные повторы. В эти блоки интегрированы центромер-специфические мобильные элементы. Каждая из 10 центромер кукурузы построена из этих элементарных повторов, но в каждой центромере они имеют свою уникальную организацию (Ananiev *et al.*, 1998c). Этот принцип организации центромеры

На конференции в Университете штата Теннеси. Слева направо: В. Каназин, А. Колчинский и Е. Ананьев. США, 1993 г.



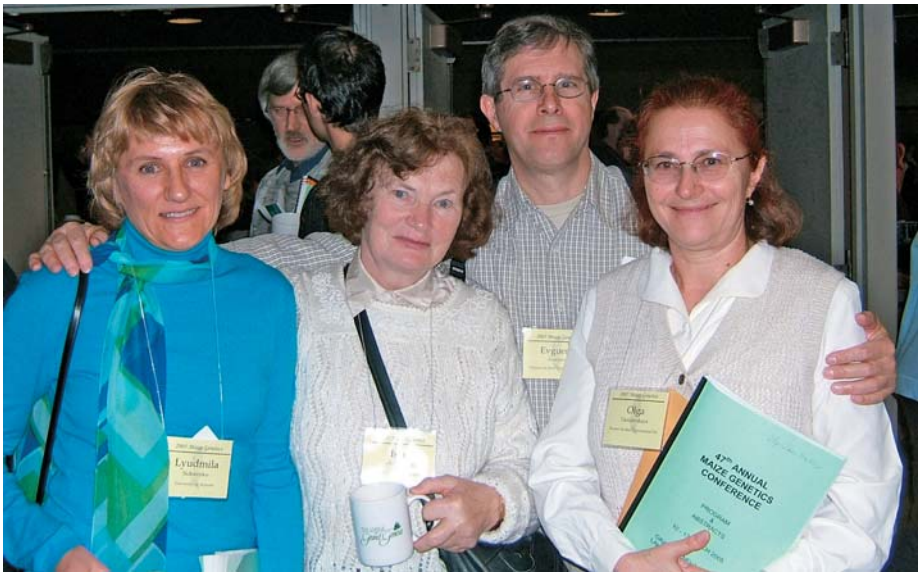
В лаборатории Университета Миннесоты. США, 1996 г.

Самый большой омар, пойманный в Атлантическом океане. Визит в Бостон, 1995 г.



У своего постера на 39-й Конференции по генетике кукурузы. 13–16 марта 1997. Флорида, США.

Сотрудники лаборатории Рона Филлипса на конференции «Геном растений и животных» (первый ряд слева направо): Евгений Ананьев, Изабелла Валес, Оскар Риера-Лизаразу, (второй ряд слева направо): Ховард Райнес и Рон Филлипс. Калифорния, США. 18–22 января 1998 г.



На 47-й Конференции по генетике кукурузы. Слева направо: Людмила Сидоренко, Инна Голубовская, Евгений Ананьев, Ольга Данилевская. Висконсин, США, 10–3 марта 2005 г.

был подтвержден на других растениях, и соответствующие повторы у риса были названы *centO* (*Oryza*). Получение клонированной центромеры побудило его создать искусственную хромосому кукурузы!

Стоит заметить, что, основываясь на первых результатах, Рон Филлипс подал в 1996 г. заявку на получение гранта, в написании которого Евгений Витальевич принимал самое активное участие. Один из рецензентов гранта написал эмоциональное замечание: «Идея гранта – выдающаяся, и я испытываю только одно чувство – зависть. Но разве это справедливо, держать профессора на ставке постдока. Я понимаю,

В лаборатории компании «Пионер» с чашкой Петри, на которой растет культура с первой мини-хромосомой. США, 10 февраля 2006 г.

что он иммигрант, но все же ...». Имея теперь солидный багаж работ, сделанных уже и в США, Евгений Витальевич искал постоянную работу. Это было довольно трудно, так как ему было уже 52 года, а это возраст, при котором американские ученые обычно завершают свою карьеру. Одна из реальных возможностей была найти работу в биотехнологических фирмах. И такая возможность представилась: в начале 1998 г. Евгений прошел интервью и был зачислен на работу в компанию «Пионер» в штате Айова, которая на протяжении 80 лет занималась селекцией высокоурожайных сортов кукурузы, а в последние десятилетия усиленно развивала биотехнологию. Мне тоже предложили работу в «Пионере», и наша семья воссоединилась осенью 1998 г. Это были счастливые годы совместного сотрудничества. Моей тематикой была генетика развития кукурузы. Процесс развития всегда интересовал Евгения Витальевича, и он очень много мне помогал, особенно в приготовлении цитологических препаратов и интерпретации результатов (Danilevskaya *et al.*, 2010). Руки у него были золотые. Он мечтал сделать атлас развития кукурузы, но на это, увы, у него не хватило времени.

В прямые обязанности Евгения Витальевича входило создание и поддержание геномных библиотек кукурузы. Характеризуя библиотеки, он обнаружил удивительное явление, что тринуклеотидные микросаттеллиты могут образовывать в геноме кукурузы мегатреки размером до 1 тыс. КБ (Ananiev *et al.*, 2005). Микросаттеллиты являются хорошо изученным источником полиморфизма в геномах самых разнообразных организмов, но то, что они могут образовывать такие гигантские блоки, было показано впервые.

Однако идея создания искусственной хромосомы его не оставляла. Ему удалось убедить руководство компании, что это реальное дело. В 2005 г. ему выделили ставку постдока, оборудовали цитологическую лабораторию, и работа закипела. Прошло полтора года, и в феврале 2006 г. были получены первые культуры клеток с дополнительными хромосомами. Наконец-то он пришел к своей заветной цели – синтезу искусственной хромосомы из отдельных «строительных блоков» – центромеры, теломеры и инициаторов репликации (Ananiev *et al.*, 2009) (рис. 2).

Но 2006 г. оказался для нас трагическим. В августе у него обнаружили опухоль мозга, прогноз был очень плохой. Он отлично понимал, что болезнь его неизлечима и жить ему осталось немного. «Создание искусственной хромосомы венчает мою научную карьеру». В письме к другу, Е. Метаковскому, он написал: «Я рад, что я не умер внезапно. У меня есть немного времени посмотреть на свою жизнь, подумать о своей карьере, написать историю своей жизни, сделать выводы и изложить мысли на бумаге. Главным образом, для сына и дочери, а может быть, и для внуков. Я нахожу, что описание жизни так же интересно, как и сама жизнь. Это как танцы со словами. Сейчас я работаю над огромным проектом – история моей семьи в виде слайдов и фильмов».

Евгений Витальевич был щедро одарен природой многими талантами. У него было тонкое чувство гармонии и видение образов, которые он хотел создать. Поэтому его цитологические работы совершенны по качеству и красоте. Поэтому он мог купить краски и

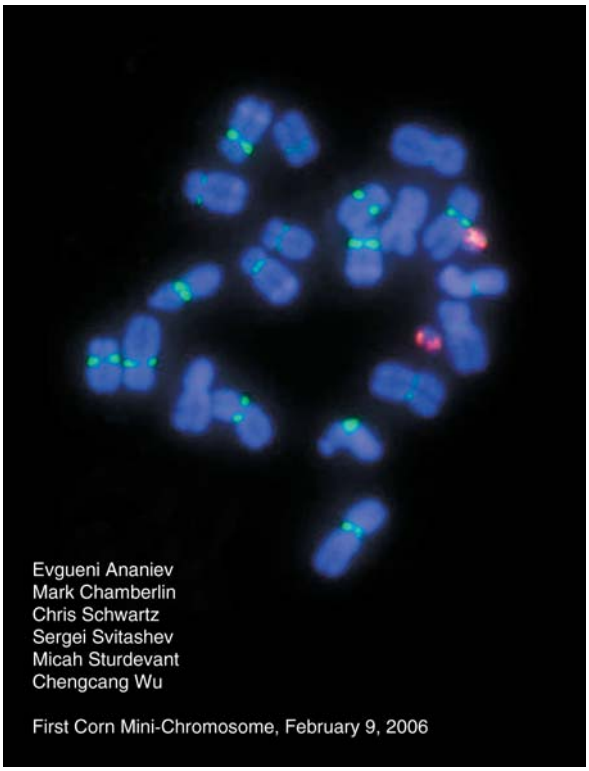


Рис. 2. Микрофотография первой искусственной мини-хромосомы кукурузы. 10 пар нормальных хромосом окрашены в синий цвет. Центромеры окрашены в зеленый цвет в результате гибридизации с CentC-фрагментом. Дополнительная 11-я пара мини-хромосом окрашена в красный цвет в результате гибридизации с селективным маркером. 9 февраля 2006 г.

холсты и писать картины маслом, хотя никогда и нигде этому не учился. У него было запойное увлечение живописью в течение трех лет после защиты кандидатской диссертации. Одним из его больших увлечений были съемки фильмов. Он купил любительскую кинокамеру «Кварц» на деньги, которые нам подарили на свадьбу. Отснял несколько уникальных фильмов: про 50-летний юбилей Р.Б. Хесина в 1972 г., 70-летний юбилей А.А. Прокофьевой-Бельговской в 1973 г., полную хронику 2-го съезда ВОГИС (Всесоюзное общество генетиков и селекционеров) в 1972 г. В этом фильме запечатлены многие выдающиеся генетики того времени: Н.В. Тимофеев-Ресовский, А.А. Прокофьева-Бельговская, Р.Б. Хесин, Н.П. Дубинин, С.С. Алиханаян, Д.К. Беляев, А.Н. Белозерский и многие другие. В 2003 г. к 100-летию со дня рождения А.А. Прокофьевой-Бельговской он смонтировал фильм, который с большим успехом был показан а Институте молекулярной биологии и в многочисленных копиях разошелся по Москве. О каждой лаборатории, где он работал, Евгений Витальевич снимал фильм. Я передала в Институт общей генетики фильм про его лабораторию, отснятый в 1986 г., с его комментариями, сделанными спустя 20 лет, в 2007 г.

Отличительными чертами его характера были глубокая искренность и честность. Он терпеть не мог фальши ни в чем. Поэтому так интересно читать его дневник и рассказы, которые он периодически писал в течение своей жизни. В них написана правда. Как правило, он обращался к бумаге в трудные моменты своей жизни. Наверно, эти «танцы со словами» давали ему успокоение.

Евгений Витальевич умер 10 января 2008 г. не дожив трех дней до своего дня рождения. Прах его похоронен в Москве на Ваганьковском кладбище, рядом с нашими родными. На памятнике высечена метафазная пластинка с искусственной хромосомой. Каждый год я навещаю его в Москве, и в памяти всплывают морозное январское утро, Птичий рынок, Женина увлеченность идеей и мое пронзительное чувство любви и восхищения.

«Мне стыдно, что я умираю и оставляю тебя одну…», – сказал он мне однажды... Но остались его труды, фильмы, картины, дневники и неоконченные воспоминания. Работа над его наследием наполняет мою жизнь смыслом.

Литература

Ананьев Е.В., Барский В.Е. Электронно-микроскопическая карта политенных хромосом слюнных желез дрозофилы. М.: Наука, 1985.

Данилевская О.Н. Мобильные генетические элементы дрозофилы: история открытия и судьба первооткрывателей // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 215–224.

Ananiev E.V., Gvozdev V.A. Changed pattern of transcription and replication in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* resulting from eu- heterochromatin rearrangement // Chromosoma. 1974. V. 45. No 2. P. 173–191.

Ananiev E. Nuclear genome structure and organization. Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology. 1992. C.A.B. International, UK. P. 133–150.

Ananiev E.V., Faizullin L.Z., Gvozdev V.A. The role of genetic balance in control of transcription rate in the X chromosomes of *Drosophila melanogaster* // Chromosoma. 1974. V. 45. No 2. P. 193–201.

Ananiev E.V., Polukarova L.G., Yurov Y.B. Replication of chromosomal DNA in diploid *Drosophila melanogaster* cells cultured *in vitro* // Chromosoma, 1977. V. 59. No 3. P. 259–272.

Ananiev E.V., Gvozdev V.A., Ilyin Yu.V. *et al.* Reite-rated genes with varying location in intercalary hetero-chromatin regions of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes // Chromosoma. 1978. V. 70. No 1. P. 1–17.

Ananiev E.V., Chamberlin M.A., Klaiber J., Svitashev S. Microsatellite megatracts in the maize (*Zea mays* L.) genome // Genome. 2005. V. 48. No 6. P. 1061–1069.

Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Complex structure of knob DNA on maize chromosome: Retrotransposon invasion into heterochromatin // Genetics. 1998a. V. 149. No 4. P. 2025–2037.

Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. A knob-associated tandem repeat in maize capable of forming fold-back DNA segments: are chromosome knobs megatransposons? // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998b. V. 95. No 18. P. 10785–10790.

Ananiev E.V., Phillips R.L., Rines H.W. Chromosome-specific molecular organization of maize (*Zea mays* L.) centromeric regions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998c. V. 95. No 22. P. 13073–13078.

Ananiev E.V., Wu C., Chamberlin M.A. *et al.* Artificial chromosome formation in maize (*Zea mays* L.) // Chromosoma. 2009. V. 118. No 2. P. 157–177.

Danilevskaya O.N., Xin Meng, Ananiev E.V. Concerted modification of flowering time and inflorescence architecture by ectopic expression of *TFL1*-like genes in maize // Plant Physiol. 2010. V. 153. No 1. P. 238–251.

Georgiev G.P., Ilyin Y.V., Ryskov A.P. *et al.* Isolation of eukaryotic DNA fragments containing structural genes and the adjacent sequences // Science. 1977. V. 195. P. 394–397.

Kanazin V., Ananiev E., Blake T. Variability among members of the *Hor-2* multigene family // Genome. 1993a. V. 36. N 3. P. 397–403.

Kanazin V., Ananiev E., Blake T. The genetics of 5S rRNA encoding multigene families in barley // Genome. 1993b. V. 36. No 6. P. 1023–1028.

Tchurikov N.A., Ilyin Y.V., Ananiev E.V., Georgiev G.P. The properties of gene *Dm 225*, a representative of dispersed repetitive genes in *Drosophila melanogaster* // Nucl. Acids Res. 1978. V. 5. No 6. P. 2169–2187.

ПРАВИЛА ОФОРМЛЕНИЯ РУКОПИСЕЙ ДЛЯ ПУБЛИКАЦИИ В «ВАВИЛОВСКОМ ЖУРНАЛЕ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ»

Общие положения

«Вавиловский журнал генетики и селекции» публикует на русском (или английском) языке работы по всем разделам генетики, селекции, а также смежных наук. К публикации принимаются результаты оригинальных экспериментальных исследований; теоретические и обзорные статьи, представляющие интерес для научного сообщества; краткие сообщения; рецензии; письма редактору; персоналии; хроника; информация; сообщения из отделений ВОГиС; материалы и документы по истории генетики и селекции. Печатаются также материалы, касающиеся образовательных программ и методики преподавания генетики и селекции в средней и высшей школах. Журнал печатает заказные обзоры и проблемные статьи. Отдельные тематические выпуски посвящаются актуальным проблемам и направлениям генетики и селекции.

Хотя журнал и является официальным изданием Вавиловского общества генетиков и селекционеров, членство авторов в обществе необязательно – журнал одинаково открыт для всех.

Сайт журнала в Интернете:

http://www.bionet.nsc.ru/vogis/vavilov_journal

В редакцию статьи представляются в электронном виде в формате MS WinWord 6.0 (и выше) на дискетах размером 3,5”, на CD, через FTP или по электронной почте в форме присоединенных файлов. Текст статьи, включая аннотации на русском и английском языках, таблицы, иллюстрации и подписи к ним, а также список литературы оформляются одним файлом. Иллюстрации дополнительно присылаются отдельными файлами. Если пересылаемый материал велик по объему, следует архивировать файлы в формат *.zip или *.rar.

Текст статьи на бумаге обязателен.

Наш адрес: 630090, Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10, Институт цитологии и генетики СО РАН. Редакция «Вавиловского журнала генетики и селекции». Электронный адрес: vavilov_journal@bionet.nsc.ru

К публикации в «Вавиловском журнале генетики и селекции» принимаются статьи, прошедшие рецензирование. Решение о публикации принимается редакционной коллегией журнала на основании экспертных оценок рецензентов с учетом соответствия представленных материалов тематической направленности журнала, их научной значимости и актуальности.

Поступившая в редакцию рукопись направляется на рецензию специалистам в данной области исследований. Авторы статьи могут назвать двух–трех потенциальных рецензентов. Наряду с фамилией каждого рецензента обязательно указание его полного имени и отчества, места работы, телефона, адреса электронной почты. Окончательный выбор рецензентов остается за редколлегией журнала. Рукопись, получившая отрицательные отзывы двух независимых рецензентов, решением редколлегии отклоняется.

Статья, нуждающаяся в доработке, направляется авторам с замечаниями рецензента и научного редактора. Авторы должны учесть все замечания, сделанные в процессе рецензирования и редактирования статьи, ответить на каждое из замечаний и указать место в рукописи, где сделаны изменения. В случае несогласия с рецензентом или редактором автор должен кратко и четко обосновать свою позицию. Сделанные автором изменения в рукописи необходимо внести в электронный вариант текста и возвратить в редакцию.

Статья, отправленная редакцией на доработку после рецензии и исправленная в соответствии с замечаниями рецензента, должна быть возвращена в редакцию в течение 15 дней с момента ее получения авторами. Статья, возвращенная в редакцию по прошествии месяца, будет иметь новую дату поступления. После принятия рукописи к печати с автором заключается Договор о временной передаче авторских прав.

Редакция не предоставляет авторам копии корректуры статьи на бумаге. Статья высылается автору в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если в корректуру вносятся исправления, при возвращении ее в редакцию необходимо приложить в виде отдельного файла подробный список сделанных исправлений.

Редакция оставляет за собой право отклонять без рецензии статьи, не соответствующие профилю журнала или оформленные с нарушением правил.

На всех стадиях работы с рукописями и для общения с авторами редакторами и рецензентами используется электронная почта, поэтому авторы должны быть внимательны при указании своего электронного адреса.

Требования к оформлению рукописей

Статьи должны быть написаны на русском (или английском) языке, отредактированы и оформлены в соответствии с нижеследующими требованиями.

Объем статьи – до 20 страниц формата А4, нумерация страниц сквозная. В этот объем входят текст, аннотация, список литературы, таблицы, иллюстрации и подписи к ним. Основной текст набирается шрифтом Times New Roman через 1,5 интервала с выравниванием по ширине и без переносов, размер шрифта 12 pt. Поля – 3 см со всех сторон страницы.

Статьи большего объема принимаются только после предварительного согласования с редакцией.

Латинские названия объектов исследований в названии статьи и в тексте пишутся с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры: бинарные видовые – курсивом (*Drosophila melanogaster*), таксонов более высокого ранга – прямым шрифтом (Drosophila или Drosophilidae). При первом упоминании в тексте родовые и видовые названия приводятся без сокращений, далее по тексту родовое название обозначается одной прописной (первой) буквой, а видовое указывается полностью (*D. melanogaster*).

Названия и символы генов набираются курсивом, а названия их продуктов – с прописной буквы прямым шрифтом. Например: гены *fos*, *c-myc*, *ATM*; белки Fos, c-Myc, ATM. Курсивом выделяются обозначения мобильных элементов, например, *hobo*-элемент, а также три первых буквы названий сайтов рестрикции, например, *Hind*III. Названия фагов и вирусов пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.

Следует использовать общепринятые сокращения и аббревиатуры или приводить их дополнительно в тексте. Все физические размерности рекомендуется приводить в международной системе СИ.

Математические формулы и уравнения набираются в редакторах MS WinWord (версия 6.0 и выше) или MathType. Уравнения располагаются по центру строки и нумеруются арабскими цифрами в круглых скобках в порядке их упоминания в тексте. Номера уравнений выравниваются по правому краю строки. Уравнения отделяются от текста сверху и снизу одной пустой строкой. При написании нескольких уравнений они также разделяются пустой строкой.

Таблицы и иллюстрации (графики, схемы, фотографии, штриховые рисунки) представляются в черно-белом варианте.

Таблицы, иллюстрации и подписи к ним размещаются в тексте статьи при первом их упоминании. При этом не следует использовать опцию «обтекание текста».

Таблицы снабжаются тематическими заголовками и нумеруются арабскими цифрами в порядке их упоминания в тексте. Все графы в таблицах должны иметь заголовки. Сокращение слов в таблицах не допускается. Все аббревиатуры должны быть расшифрованы в сносках к таблице.

Число иллюстраций в статье не должно быть больше 6 (исключения согласовываются с редакцией). Максимальный размер иллюстраций или таблиц не должен превышать размера рабочего поля 15,7 × 23 см. Весь иллюстративный материал должен иметь минимум надписей.

На графиках необходимо указывать величины, значения которых даются на осях, и обозначение их размерностей.

Имеющиеся в схемах детали обозначаются арабскими цифрами или буквами русского алфавита и расшифровываются в подписях.

Иллюстрации нумеруются в порядке их упоминания в тексте. При ссылке в тексте на иллюстрацию указывается ее номер и буквенные

и цифровые обозначения ее деталей, например: рис. 1, а, кривая 2.

Графики и схемы должны выполняться с помощью векторных программ (MicrosoftExcel, CorelDraw 9, Microsoft PowerPoint), их следует присылать в виде отдельных файлов с сохранением форматов, использованных для их создания. Если они выполнялись в других векторных программах, то необходимо использовать формат EPS.

Фотографии представляются в виде отдельных файлов в форматах JPEG, TIFF, BMP, PNG с разрешением 300–600 dpi.

Штриховые рисунки, выполненные от руки, должны быть отсканированы в режиме bitmap с разрешением 800 dpi и сохранены в формате TIFF.

Структура рукописи

Материалы должны быть размещены следующим образом:

1. УДК.

2. Название статьи. Должно быть кратким и отражать содержание работы. Печатается прописными буквами прямым полужирным шрифтом без подчеркивания и разрядки. Латинские названия объектов исследований в названии статьи пишутся без сокращений, с соблюдением общепринятых правил таксономической номенклатуры.

3. Инициалы и фамилия (фамилии) автора(ов) (А.А. Иванов, Б.В. Петров...). Печатаются прямым строчным шрифтом и отделяются от названия статьи пустой строкой.

4. Полное название и адрес учреждения, где работает автор(ы) – шрифт прямой строчной; адрес(а) электронной почты автора(ов) – шрифт прямой строчной.

Отметить арабскими цифрами соответствие фамилий авторов учреждениям, в которых они работают; звездочкой пометить фамилию автора, с которым будет вестись переписка.

5. Аннотация (резюме) статьи на русском и английском языках с кратким изложением основной цели работы и ее результатов (не более 20 строк). На английском языке – название статьи, общепринятую версию названия учреждения, где выполнена работа, и транслитерацию фамилий авторов, текст аннотации, ключевые слова. Для англоязычных статей аннотация оформляется на русском языке. Шрифт – прямой строчной.

6. Ключевые слова (не более 10). Шрифт – прямой строчной. В ключевых словах должны быть отражены: (1) объект; (2) метод; (3) область исследования; (4) специфика данной работы.

7. Текст статьи, оформленный в соответствии с правилами.

8. Благодарности и ссылки на источники финансирования работы.

9. Литература.

Для экспериментальных статей рекомендуются следующие разделы: **Введение; Материалы и Методы; Результаты; Обсуждение; Литература.**

Теоретические, обзорные и проблемные статьи могут иметь произвольную структуру, но обязательно должны содержать резюме. Названия разделов в таких статьях определяются автором.

Названия разделов печатаются строчными буквами на отдельной строке без подчеркивания и отделяются от текста одной пустой строкой. Шрифт – прямой полужирный. Подзаголовки внутри разделов печатаются на отдельной строке строчными буквами. Шрифт – прямой полужирный. Заголовки и подзаголовки выравниваются по центру.

Раздел «Литература» отделяется от текста статьи пустой строкой и содержит перечень цитированных источников с обязательным указанием заглавия (см. ниже образец). Библиографические ссылки внутри текста приводятся в круглых скобках. При этом указывается фамилия автора публикации без инициалов и год публикации, например: (Иванов, 1999). Если у публикации два автора, то указываются обе фамилии и год издания, например: (Gihr, Smith, 2001). Работы трех и более авторов цитируются следующим образом: (Gatsby *et al*., 1998; Добров и др., 2000).

При ссылках на несколько публикаций ссылки в скобках располагаются в хронологическом порядке, например: «В ряде работ (Смирнов, 1978; Smith, Gatsby, 1998; Павлова и др., 2001)...». При этом если цитируются работы одного и того же года, ссылки располагаются в алфавитном порядке (сначала русские, потом иностранные фамилии). Если цитируются не-

сколько работ одного и того же автора (или одной и той же группы авторов), опубликованных в одном и том же году, то к году добавляются русские или латинские строчные буквы в алфавитном порядке.

Например: Смирнов и др., 1995а, б; Smith 1997a, d; Ulrich *et al*., 1998b. Порядок расстановки букв определяется положением статьи в разделе «Литература».

Список литературы должен содержать библиографическое описание всех литературных источников, ссылки на которые фигурируют в тексте статьи. Цитированная литература сводится в алфавитные списки сначала на русском языке, потом на иностранных языках с указанием фамилий и инициалов всех авторов каждой публикации. Работы одного и того же автора располагаются в хронологической последовательности. В случае если в списке приводятся несколько работ одного автора, опубликованных в одном и том же году, им дают буквенные обозначения: 1999а, б, в и т. д.; для иностранных авторов – 1999a, b, c и т. д.

При количестве авторов более 4 приводятся только 3 автора, далее используется обозначение (и др.) *et al*.

Оформляйте список по следующему образцу, обращая внимание на знаки препинания и пробелы.

Литература

ДЛЯ КНИГ:

Завадский К.М. Развитие эволюционной теории после Дарвина (1859–1920-е годы). Л.: Наука, 1973. 423 с. (или конкретные страницы, например С. 22–32).

Searle A.G. Comparative Genetics of Coat Color in Mammals. L.; N.Y.: Logos Press, Acad. Press, 1968. 303 p.

ДЛЯ ЖУРНАЛОВ:

Кольцов Н.К. Проблема прогрессивной эволюции // Биол. журнал. 1933. Т. 2. Вып. 4/5. С. 475–500.

Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer // Cell. 2000. V. 100. No. 2. P. 57–70.

Zhao S.H., Recknor J., Lunney J.K. *et al*. Validation of a first-generation long-oligonucleotide microarray for transcriptional profiling in the pig // Genomics. 2005. V. 86. No. 5. P. 618–625.

ДЛЯ СБОРНИКОВ:

Розова М.А., Янченко В.И., Мельник В.М. Зависимость урожайности яровой твердой пшеницы от метеорологических факторов в Приобской лесостепи Алтайского края // Современные проблемы и достижения аграрной науки в животноводстве и растениеводстве: Сб. статей Междунар. науч.-практ. конференции. Барнаул, 2003. Ч. 1. С. 71–74.

Golygina V.V., Istomina A.G., Kiknadze I.I. Chromosomal polymorphism in natural populations of *Chironomus balatonicus* Dévai, Wülker et Scholl // Late 20th century research on Chironomidae / Ed. O. Hof-frichter. Aachen: Shaker-Verlag, 2000. P. 89–92.

ДЛЯ ТЕЗИСОВ ДОКЛАДОВ:

Peshkov I.M., Likhoshvai V.A., Matushkin Yu.G., Fadeev S.I. On research into hypothetical networks on ecological nature // Proc. of the 4th Intern. Conf. on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure (BGRS'2004). Novosibirsk, 25–30 July 2004. Novosibirsk: Inst. Cytol. Genet., 2004. V. 2. P. 128–130.

ДЛЯ ИНТЕРНЕТ-ПУБЛИКАЦИЙ:

Smith A., Green P. RepeatMasker. 1999. available at http://ftp.genome.washington.edu/RM/RepeatMasker.html.

Schwenger G.T.F., Mordvinov V.A., Fournier R. *et al.* (2000). Interleikin-5. In: Academic Press Cytokine Reference Database. DOI:10.1006/rwcy.2000.0902.

На отдельной странице следует привести:

– оригинальное написание иностранных фамилий, встречающихся в тексте статьи, подписях к иллюстрациям и таблицам.

– на русском языке – сведения об авторах (фамилии, имена, отчества полностью, ученые степени, звания, должности, место работы, полные почтовые адреса с индексами, домашние и служебные телефоны, факсы, адреса электронной почты и адреса личных страниц в Интернете).

Федеральное государственное унитарное предприятие «ПОЧТА РОССИИ»

Бланк заказа периодических изданий Ф. СП-1

АБОНЕМЕНТ на газету / **журнал** **4 2 1 5 3**

(индекс издания)

Вавиловский журнал

(наименование издания)

генетики и селекции

Количество Комплектов

на 20__год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

Куда

(почтовый индекс) (адрес)

Кому

(фамилия, инициалы)

---------- Линия отреза ----------

ПВ | Место | Литер

ДОСТАВОЧНАЯ КАРТОЧКА **4 2 1 5 3**

(индекс издания)

На Газету / Журнал **Вавиловский журнал генетики и селекции**

(наименование издания)

Стоимость

подписки	руб.	Кол-во комп-лектов	
переадресовки	руб.		

на 20__год по месяцам

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

		город	
		Село	
почтовый индекс		область	
		район	
код улицы		улица	
дом	корпус	квартира	

Фамилия И.О.

Отредактировано и подготовлено к печати
в редакционно-издательском отделе ИЦиГ СО РАН

Редакторы: А.А. Ончукова, И.Ю. Ануфриева
Дизайн: А.В. Харкевич
Компьютерная графика: А.В. Харкевич, Т.Б. Коняхина
Компьютерная верстка: Т.Б. Коняхина, Н.С. Глазкова

Ответственный секретарь редакции: С.В. Зубова,
тел. 363-4922 *1351

Подписано в печать 17.03.2012 г.
Формат бумаги 60×84 1/8. Усл.-печ. л. 35,3. Уч.-изд. л. 33,3
Тираж 400. Заказ 114

Отпечатано в типографии ФГУП «Издательство СО РАН»
630090, Новосибирск, Морской проспект, 2