
БАВИЛОВСКИЙ ЖУРНАЛ ГЕНЕТИКИ И СЕЛЕКЦИИ

ОСНОВАН В 1997 г.

Том 18

4/1

Декабрь 2014

VAVILOV JOURNAL OF GENETICS AND BREEDING

FOUNDED IN 1997

Vol. 18

4/1

December 2014

«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

Ответственный секретарь редакции:

С.В. Зубова,

тел. 363-4977 *5415

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, 2014

© Вавиловский журнал генетики и селекции, 2014

© Сибирское отделение Российской академии
наук, 2014

Приглашенные редакторы: А.В. Кочетов, Е.А. Салина

Содержание

<i>А.В. Кочетов, Е.А. Филипенко, О.Г. Смирнова, В.К. Шумный</i> ЭНХАНСЕРЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ.....	610
<i>А.Б. Щербань</i> ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ	618
<i>О.Г. Силкова, Д.Б. Логинова, Ю.Н. Иванова (Кабаненко), Е.Б. Бондаревич, Л.А. Соловей, Т.И. Штык, Н.И. Дубовец</i> ИНТРОГРЕССИЯ ХРОМАТИНА РЖИ В ГЕНОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ	630
<i>Р.С. Юдина, И.Н. Леонова, Е.А. Салина, Е.К. Хлёткина</i> ВЛИЯНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ИНТРОГРЕССИЙ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ НА ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ	643
<i>Т.С. Осадчая, Л.А. Першина, Н.В. Трубачеева, И.А. Белан, Л.П. Россеева, Э.П. Девяткина</i> СПОСОБНОСТЬ К АНДРОГЕНЕЗУ ЭУПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ (<i>H. VULGARE</i>)- <i>T. AESTIVUM</i> С ТРАНСЛОКАЦИЯМИ 1RS.1BL И 7DL-7A1 И ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ.....	650
<i>Т.А. Гавриленко, Г.И. Пендинен, В.-М. Рокка, О.Ю. Антонова, Р. Тиме</i> СПАРИВАНИЕ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ У ОТДАЛЕННЫХ АЛЛОГАПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ РОДА <i>SOLANUM</i>	660
<i>О.Б. Добровольская, П. Мартинек, И.Г. Адонина, Е.Д. Бадаева, Ю.Л. Орлов, Е.А. Салина, Л.И. Лайкова</i> ВЛИЯНИЕ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМОСОМ 2-й ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ НА МОРФОЛОГИЮ КОЛОСА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ.....	672
<i>И.Н. Леонова, О.А. Орловская, М.С. Родер, М.А. Нестеров, Е.Б. Будашкина</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (<i>T. AESTIVUM</i> / <i>T. TIMORHEEVII</i>)	681

<i>И.Е. Лихенко, А.И. Стасюк, А.Б. Щербань, А.Ф. Зырянова, Н.И. Лихенко, Е.А. Салина</i> ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ <i>VRN-1</i> И <i>PPD-1</i> У РАННЕСПЕЛЫХ И СРЕДНЕРАННИХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СИБИРИ	691
<i>В.С. Арбузова, Т.Т. Ефремова, П. Мартинек, Е.В. Чуманова, О.Б. Добровольская</i> ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКОВ ПРОДУКТИВНОСТИ КОЛОСА У ГИБРИДОВ F_2 , ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НОВОСИБИРСКАЯ 67, САРАТОВСКАЯ 29, PUZA-4 С МНОГОЦВЕТКОВОЙ ЛИНИЕЙ SKLE 123-09	704
<i>Н.И. Савельев, И.Н. Шамшин, Н.Н. Савельева, А.С. Лыжин</i> ПОЛИМОРФИЗМ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РОДА <i>MALUS</i> MILL. ПО ГЕНУ (<i>MD-EXP-7</i>) БИОСИНТЕЗА ЭКСПАНСИНА	713
<i>М.А. Слугина, Е.З. Кочиева</i> ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА ГЕНА КИСЛОЙ ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ <i>PAIN-1</i> У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ	718
<i>Е.А. Дьяченко, М.А. Филюшин, Е.П. Пронин, Е.З. Кочиева</i> ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ИНТРОНА ПЛАСТИДНОГО ГЕНА <i>trnL</i> У ВИДОВ <i>FABOIDEAE</i> (СЕМ. <i>FABACEAE</i>)	724
<i>Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков, В.А. Филобок, Ж.Н. Худокормова</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ им. П.П. ЛУКЪЯНЕНКО	732
<i>А.С. Садовая, Е.И. Гультаева, О.П. Митрофанова, Е.Л. Шайдаюк, А.Г. Хакимова, Е.В. Зуев</i> ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ СОРТОВ И ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР, НЕСУЩИХ ЧУЖЕРОДНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ	739
<i>О.С. Афанасенко, А.В. Козьяков, П. Хедлэй, Н.М. Лашина, А.В. Анисимова, О. Маннинен, М. Ялли, Е.К. Потокينا</i> КАРТИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ЯЧМЕНЯ К РАЗЛИЧНЫМ ИЗОЛЯТАМ <i>Pyrenophora teres f. teres</i> И <i>Cochlidiobolus sativus</i>	751
<i>О.Г. Смирнова, А.В. Кочетов</i> ПРОМОТОРЫ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ЗАЩИТЕ ОТ ПАТОГЕНОВ	765
<i>А.В. Войлоков, А.Н. Лыхолой, В.Г. Смирнов</i> ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АНТОЦИАНОВОЙ ОКРАСКИ У РЖИ	776
<i>Е.К. Хлёткина, О.Ю. Шоева, Е.И. Гордеева</i> ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ ПШЕНИЦЫ	784
<i>В.В. Коврижных, Н.А. Омелянчук, Т.П. Пастернак, В.В. Миронова</i> КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ PIN БЕЛКОВ В ТРАНСПОРТЕ АУКСИНА В КОРНЕ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> L.	797
<i>Л.В. Обухова, Е.Б. Будашкина</i> КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ СИЛЫ МУКИ ОТ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ПШЕНИЦЫ	807

<p><i>С.О. Батурин, И.К. Аполинарьева, А.А. Кузьмина</i></p> <p>ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОРОДНОГО СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА У РЕМОНТАНТНОЙ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ (<i>FRAGARIA</i> × <i>ANANASSA</i> DUCH.).....</p>	812
<p><i>Е.К. Потокина, А.А. Киселева, М.А. Николаева, С.А. Иванов, П.С. Улянич, А.Ф. Потокин</i></p> <p>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРОВ ОРГАНЕЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА ФИЛОГЕОГРАФИИ ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ <i>PICEA ABIES</i> (L.) H. KARST.</p>	818
<p><i>О.Е. Kosterin</i></p> <p>THE LOST ANCESTOR OF THE BROAD BEAN (<i>VICIA FABA</i> L.) AND THE ORIGIN OF PLANT CULTIVATION IN THE NEAR EAST</p>	831

Invited editors: A.V. Kochetov, E.A. Salina

Content

<i>A.V. Kochetov, E.A. Filipenko, O.G., V.K. Shumny</i> TRANSLATIONAL ENHANCERS FOR PLANT GENE ENGINEERING	610
<i>A.B. Shcherban</i> REPETITIVE DNA SEQUENCES IN THE GENOMES OF PLANTS	618
<i>O.G. Silkova, D.B. Loginova, Yu.N. Ivanova (Kabanenko), E.B. Bondarevich, L.A. Solovei, T.I. Shtyk, N.I. Dubovets</i> RYE CHROMATIN INTROGRESSION IN THE BREAD WHEAT GENOME: CYTOGENETIC ASPECTS.....	630
<i>R.S. Yudina, I.N. Leonova, E.A. Salina, E.K. Khlestkina</i> EFFECT OF ALIEN GENOMIC INTROGRESSIONS ON THE OSMOTIC TOLERANCE OF WHEAT.....	643
<i>T.S. Osadchaya, L.A. Pershina, N.V. Trubacheeva, I.A. Belan, L.P. Rosseeva, E.P. Devyatkina</i> ANDROGENESIS ABILITY IN COMMON WHEAT EUPLASMIC LINES AND ALLOPLASMIC RECOMBINANT LINES (<i>H. VULGARE</i>)- <i>T. AESTIVUM</i> POSSESSING 1RS.1BL AND 7DL-7A1 TRANSLOCATIONS AND PRODUCTION OF DOUBLED HAPLOIDS LINES.....	650
<i>T.A. Gavrilenko, G.I. Pendinen, V.-M. Rokka, O.Y. Antonova, R. Thieme</i> INTERGENOMIC CHROMOSOME PAIRING IN ALLOHAPLOID HYBRIDS OF GENUS <i>SOLANUM</i>	660
<i>O.B. Dobrovol'skaya, P. Martinek, I.G. Adonina, E.D. Badaeva, Yu.L. Orlov, E.A. Salina, L.I. Laikova</i> EFFECT OF REARRANGEMENTS OF HOMOELOGOUS GROUP 2 CHROMOSOMES OF BREAD WHEAT ON SPIKE MORPHOLOGY	672
<i>I.N. Leonova, O.A. Orlovskaya, M.S. Roder, M.A. Nesterov, E.B. Budashkina</i> MOLECULAR DIVERSITY OF COMMON WHEAT INTROGRESSION LINES (<i>T. AESTIVUM</i> / <i>T. TIMOPHEEVII</i>)....	681
<i>I.E. Likhenko, A.I. Stasyuk, A.B. Shcherban', A.F. Zyryanova, N.I. Likhenko, E.A. Salina</i> ANALYSIS OF THE ALLELIC VARIATION OF THE <i>VRN-1</i> AND <i>PPD-1</i> GENES IN SIBERIAN EARLY AND MEDIUM EARLY VARIETIES OF SPRING WHEAT	691

<i>V.S. Arbuzova, T.T. Efremova, P. Martinek, E.V. Chumanova, O.B. Dobrovolskaya</i> VARIABILITY OF SPIKE PRODUCTIVITY IN F ₂ HYBRIDS OBTAINED BY CROSSING COMMON WHEAT VARIETIES NOVOSIBIRSKAYA 67, SARATOVSKAYA 29, AND PUZA-4 TO THE SKLE 123-09 MULTIFLORET LINE	704
<i>N.I. Savel'ev, I.N. Shamshin, N.N. Savel'eva, A.S. Lyzhin</i> POLYMORPHISM FOR THE <i>MD-EXP-7</i> GENE FOR EXPANSIN BIOSYNTHESIS IN WILD SPECIES OF THE GENUS <i>MALUS</i> MILL	713
<i>M.A. Slugina, E.Z. Kochieva</i> VARIABILITY OF A FRAGMENT OF THE ACID VACUOLAR INVERTASE <i>PAIN-1</i> GENE IN POTATO CULTIVARS	718
<i>E.A. D'yachenko, M.A. Filyushin, E.P. Pronin, E.Z. Kochieva</i> PLASTID <i>trnL</i> INTRON VARIABILITY IN <i>FABOIDEAE</i> SPECIES (FABACEAE).....	724
<i>E.R. Davoyan, L.A. Bespalova, R.O. Davoyan, Yu.S. Zubanova, D.S. Mikov, V.A. Filobok, J.N. Khudokormova</i> USE OF MOLECULAR MARKERS IN WHEAT BREEDING FOR RESISTANCE TO LEAF RUST AT THE LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE	732
<i>A.S. Sadovaya, E.I. Gulyaeva, O.P. Mitrofanova, E.L. Shaidayuk, A.G. Hakimova, E.V. Zuev</i> LEAF RUST RESISTANCE IN COMMON WHEAT VARIETIES AND LINES FROM THE COLLECTION OF THE VAVILOV PLANT INDUSTRY INSTITUTE CARRYING ALIEN GENETIC MATERIAL	739
<i>O.S. Afanasenko, A.V. Koziakov, P. Hedlay, N.M. Lashina, A.V. Anisimova, O. Manninen, M. Jalli, E.K. Potokina</i> MAPPING OF THE LOCI CONTROLLING THE RESISTANCE TO <i>PYRENOPHORA TERES</i> F. <i>TERES</i> AND <i>COCHLIOBOLUS SATIVUS</i> IN TWO DOUBLE HAPLOID BARLEY POPULATIONS.....	751
<i>O.G. Smirnova, A.V. Kochetov</i> PLANT GENE PROMOTERS RESPONSIVE TO PATHOGEN INVASION	765
<i>A.V. Voylovok, A.N. Lykholay, V.G. Smirnov</i> GENETIC CONTROL OF ANTHOCYANIN COLORATION IN RYE	776
<i>E.K. Khlestkina, O.Y. Shoeva, E.I. Gordeeva</i> FLAVONOID BIOSYNTHESIS GENES IN WHEAT	784
<i>V.V. Kovrizshnykh, N.A. Omelyanchuk, T. Pasternak, V.V. Mironova</i> THE KEY ROLE OF PIN PROTEINS IN AUXIN TRANSPORT IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ROOTS.....	797
<i>L.V. Obukhova, E.B. Budashkina</i> ANALYSYS OF THE CORRELATION BETWEEN WHEAT DOUGH STRENGTH AND STORAGE PROTEINS	807
<i>S.O. Baturin, I.K. Apolinariyeva, A.A. Kuzmina</i> PROSPECTS OF OBTAINING UNIFORM SEED PROGENY OF EVERBEARING GARDEN STRAWBERRY (<i>FRAGARIA</i> × <i>ANANASSA</i> DUCH.)	812

<i>E.K. Potokina, A.A. Kiseleva, M.A. Nikolaeva, S.A. Ivanov, P.S. Ulianich, A.F. Potokin</i>	
ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF ORGANELLE DNA TO ELUCIDATE THE PHYLOGEOGRAPHY OF NORWAY SPRUCE IN THE EAST EUROPEAN PLAIN.....	818
<i>O.E. Kosterin</i>	
THE LOST ANCESTOR OF THE BROAD BEAN (<i>VICIA FABA</i> L.) AND THE ORIGIN OF PLANT CULTIVATION IN THE NEAR EAST	831

УДК 577.217:577.21

ЭНХАНСЕРЫ ТРАНСЛЯЦИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ИНЖЕНЕРИИ РАСТЕНИЙ

© 2014 г. А.В. Кочетов^{1,2}, Е.А. Филипенко¹, О.Г. Смирнова¹, В.К. Шумный^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: ak@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 октября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Трансгенные растения широко используются для проведения фундаментальных и прикладных исследований. Эффективная экспрессия трансгенов зависит от правильного выбора служебных элементов при планировании структуры генетической конструкции, в частности, важное значение имеет структура 5'-нетранслируемого района, влияющая на эффективность инициации трансляции мРНК. В статье рассмотрены характеристики 5'-НТП, определяющие эффективность трансляции мРНК в клетках растений, а также различные трансляционные энхансеры.

Ключевые слова: трансгенные растения, генная инженерия, трансляция, характеристики мРНК, энхансеры.

ХАРАКТЕРИСТИКИ мРНК ГЕНОВ РАСТЕНИЙ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБЩУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНИЦИАЦИИ ТРАНСЛЯЦИИ

«Линейное сканирование» – базовый эукариотический механизм инициации трансляции

Считается, что в клетках эукариот инициация трансляции (взаимодействие рибосомы и мРНК, а также поиск и распознавание стартового кодона) может происходить по двум основным путям: по механизму «линейного сканирования» и с помощью сайтов внутренней инициации трансляции. Кроме этого, существует несколько модификаций основных механизмов (шунтирование потока рибосом, трансляционные энхансеры) (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010). «Линейное сканирование» может рассматриваться в качестве механизма, используемого «по умолчанию», поскольку все остальные варианты требуют присутствия в структуре мРНК дополнительных сигналов. В большинстве случаев типичные генетические

конструкции для экспрессии трансгенов в растениях (особенно для фундаментальных исследований) не содержат специальных сигналов и трансляция мРНК трансгена происходит по механизму «линейного сканирования».

Согласно этому механизму, 40S субъединица рибосомы в комплексе с факторами инициации трансляции и метиониновой инициаторной тРНК распознает кеп на 5'-конце мРНК и линейно (т. е. последовательно и непрерывно) движется вдоль матрицы в 3'-направлении в поиске стартового кодона трансляции. По-видимому, в большинстве случаев в качестве стартового кодона у эукариот используется триплет AUG, хотя результаты последних высокопроизводительных экспериментов (Ribo-seq) показали, что в клетках млекопитающих и дрожжей рибосомы могут с высокой частотой распознавать не-AUG триплеты (Ingolia *et al.*, 2009, 2011). Однако в настоящее время данных по не-AUG стартовым кодонам недостаточно для их адекватной интерпретации и они не принимаются в расчет в процедурах картирования структуры эукариотических генов. Известно, что распознавание триплета AUG в качестве сайта инициации

трансляции (translation initiation site, TIS) зависит от его нуклеотидного окружения (контекста): если контекст оптимален, большинство 40S-субъединиц рибосом распознает AUG и инициирует на нем трансляцию. Однако, если контекст субоптимален, часть 40S-субъединиц рибосом не сможет распознать такой стартовый кодон, пропустит его, продолжит сканирование в 3'-направлении и может инициировать трансляцию на нижерасположенном стартовом кодоне (так называемом механизме «leaky scanning»). Соотношение количества 40S субъединиц рибосом, распознавших и пропустивших стартовый кодон в субоптимальном контексте, в основном зависит от характеристик его нуклеотидного контекста и некоторых структурных особенностей мРНК (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010).

Контекст стартового кодона трансляции

Хорошо известно, что частоты нуклеотидов в позициях вокруг стартового кодона трансляции отклоняются от средних по соответствующему функциональному району мРНК (5'-нетранслируемой последовательности (5'-НТП) и белок-кодирующей части (coding DNA sequence, CDS)). Считается, что консенсусная последовательность соответствует оптимальному контексту, т. е. варианту нуклеотидного окружения, обеспечивающему распознавание стартового кодона подавляющим большинством 40S субъединиц рибосом, поступивших на мРНК. У млекопитающих консенсус контекста стартового кодона выглядит как GCCRCCAUGG (R = A или G). Относительная значимость нуклеотидов в разных позициях была оценена экспериментально (хотя и не систематически). Показано, что позиции -3 и +4 особенно значимы. Контексты A_{nn}AUG_n и G_{nn}AUGG считаются близкими к оптимальным, контекст Y_{nn}AUGH (Y = U или C; H = не G) считается наименее эффективным (наиболее «пропускающим»). Относительную «силу» других вариантов контекста оценить трудно. Считается, что если в позиции -3 расположен пиримидиновый нуклеотид (U или C), эффективность распознавания увеличивается в тех случаях, когда в остальных позициях расположены нуклеотиды, соответствующие консенсусу (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010; Volkova, Kochetov, 2010).

Структура контекста стартового кодона у однодольных растений близка к таковой у млекопитающих (консенсус GCRGCARCCAUGGC), в то время как у двудольных растений она отличается (консенсус AAAAAAAAAAMAUGGC; M = A или C) (Cavener, Ray, 1991). Показано, что наиболее значимыми позициями контекста стартового кодона трансляции в клетках растений также являются -3 и +4; к числу существенных минорных позиций относят -2, -1, +5. Варианты контекста GCCAUGGC и AAAAUGGC были наиболее эффективными в протопластах кукурузы и табака соответственно (Lukaszewicz *et al.*, 2000). Были сделаны попытки систематического сравнительного анализа эффективности вариантов контекста стартового кодона, в частности, перебор вариантов контекста в позициях от -3 до -1 показал, что эффективная трансляция наблюдалась для контекстов (A/G)(a/c)(a/g)AUG в клетках *Arabidopsis thaliana* и (A/G)(u/C)(g/C)AUG в клетках *Oryza sativa* (прописные буквы соответствуют более эффективному варианту) (Sugio *et al.*, 2010). В другом исследовании было найдено, что в клетках *A. thaliana* эффективность трансляции мРНК репортерного гена при изменении структуры 5'-НТП могла изменяться в 200 раз. Аденины в позициях от -5 до -1 оказывали наиболее положительный эффект на распознавание стартового кодона (уридины в этих позициях были наименее эффективны). В целом эффективность трансляции положительно коррелировала с присутствием аденинов в позициях от -21 до -1 (Kim *et al.*, 2014).

Размер 5'-НТП

Существует ограничение на минимальный размер 5'-НТП: показано, что если лидерный район меньше 15 нуклеотидов, то часть поступающих на 5'-конец мРНК 40S субъединиц рибосом не сможет распознать такой сайт инициации трансляции. По-видимому, это связано с особенностями организации 48S-комплекса, взаимодействующего с мРНК – в его структуре антикодон инициаторной мет-тРНК расположен на расстоянии в 13–15 н. от края комплекса, движущегося вдоль мРНК в 3'-направлении. При посадке комплекса на 5'-конец мРНК те триплеты AUG, которые расположены на этом

или меньшем расстоянии от 5'-конца, могут не распознаваться в качестве сайтов инициации трансляции вследствие конформационных затруднений (Kozak, 2005; Jackson *et al.*, 2010). Принципиальных ограничений на верхний предел размера 5'-НТП нет: если лидерный район мРНК не содержит триплетов AUG (так называемых upstream AUG, uAUG) и не формирует стабильную вторичную структуру, то он может обеспечивать эффективную посадку 40S субъединиц рибосом и их перемещение до сайта инициации трансляции. Однако чем больше размер 5'-НТП, тем выше вероятность формирования стабильных шпильки или появления uAUG по случайным причинам (например вследствие мутаций). Считается, что размер лидерного района между 50 и 75 нуклеотидами является наиболее благоприятным, тогда как 5'-НТП больше 175 нуклеотидов чаще способны уменьшать трансляционную активность мРНК генов растений (Kawaguchi, Bailey-Serres, 2005).

Вторичная структура мРНК

Стебле-петлевые структуры (шпильки) даже при их относительно небольшой стабильности способны существенно снизить трансляционную активность мРНК, если они расположены близко к 5'-концу матрицы. Предполагают, что при таком расположении шпильки могут мешать взаимодействию кэпа и кеп-связывающего комплекса eIF-4F. Стабильные шпильки, расположенные не на 5'-конце лидерного района, также способны снижать интенсивность трансляции, так как 40S субъединица рибосомы должна разрушить вторичную структуру (с помощью факторов инициации трансляции с РНК-геликазной активностью), что приводит к замедлению процесса линейного сканирования (Kozak *et al.*, 2005; Jackson *et al.*, 2010). Несмотря на то что представления о роли вторичной структуры в 5'-НТП в трансляционном процессе выглядят достаточно простыми, предсказание как вторичной структуры, так и ее ингибирующего эффекта весьма проблематично. По-видимому, молекулы мРНК в цитоплазме существуют в виде динамичного набора взаимопереходящих друг в друга конформаций, причем взаимодействия РНК с рибосомами,

факторами трансляционного аппарата и другими белками могут стабилизировать определенные сегменты матрицы в расплетенном состоянии. Эта область структурной биологии требует дополнительных высокопроизводительных экспериментов (Kertesz *et al.*, 2010), что позволит накопить больше данных и построить адекватные модели.

Обычно считается, что 5'-НТП с меньшим содержанием G+C могут обеспечить более высокую эффективность инициации трансляции, так как комплементарные взаимодействия между этими нуклеотидами вносят больший вклад в энергию вторичной структуры (Kozak, 2005; Kawaguchi, Bailey-Serres, 2005). Однако эта точка зрения не является полностью верной, так как нуклеотидная последовательность может содержать много G и C в сумме, но их соотношение может быть сильно сдвинуто в сторону одного из нуклеотидов и в таком случае число комплементарных взаимодействий будет небольшим. Было показано, что эукариотические 5'-НТП специфически характеризуются дисбалансом в содержании комплементарных нуклеотидов (Kochetov *et al.*, 2002a, b, 2005), причем более эффективно транслируемые матрицы также характеризуются более выраженным дисбалансом в содержании G/C и A/U (Kochetov *et al.*, 1998, 1999).

Типичные причины низкой эффективности трансляции мРНК трансгена в растениях

Список существенных характеристик 5'-НТП включает: размер больше 30 нуклеотидов (предпочтительно между 40 и 80 н.), отсутствие uAUG, отсутствие стабильной вторичной структуры (по крайней мере вблизи 5'-конца молекулы), оптимальный контекст стартового кодона (пуриновый нуклеотид в позиции -3, желателен гуанин в позиции +4; контекст aaaAUG предпочтителен для двудольных, a/gccAUG – для однодольных растений). Нужно отметить, что 5'-НТП – важный структурный элемент генетической конструкции. В литературе встречается много случаев, в которых белок-кодирующая часть изучаемого гена клонирована в стандартном векторе с неоптимизированным лидерным районом. Например, при клонировании в pVi121 5'-НТП будет слишком коротким, а контекст стартового кодона субоптимальным.

Кроме этого, в векторах 5'-НТП часто содержит элементы полилинкера с сайтами рестрикции, представляющими собой инвертированные повторы, что может приводить к формированию стабильных вторичных структур. Неудивительно, что использование модифицированного варианта рВi121 с улучшенным 5'-НТП обеспечило 10-кратное увеличение уровня экспрессии гена-репортера (De Amicis *et al.*, 2007).

Другая проблема может быть связана с потенциальным использованием альтернативных стартовых кодонов. Если 5'-НТП слишком короток или стартовый кодон расположен в субоптимальном контексте, трансляция может инициироваться на нижерасположенном (следующем) AUG. Если такой альтернативный TIS расположен в той же рамке считывания, что и CDS, может синтезироваться укороченная с N-конца изоформа белка. Этот механизм используется для синтеза некоторых клеточных белков, например, митохондриальная и ядерная изоформы ДНК-лигазы 1 *A. thaliana* синтезируются с одной мРНК с двух последовательно расположенных стартовых кодонов AUG, первый из которых расположен в субоптимальном контексте (Sunderland *et al.*, 2004). Показано, что альтернативные стартовые кодоны и механизм «leaky scanning» используются для синтеза пластидной и цитоплазматической/ядерной изоформ тРНК-лигазы *A. thaliana* и *O. sativa*, пластидной и митохондриальной изоформ протопорфириногеноксидазы шпината, ДНК-полимеразы арабидопсиса и т. п. (Christensen *et al.*, 2005; Englert *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2001). Однако, если следующий AUG расположен в рамке +1 или +2, то такой альтернативный стартовый кодон будет соответствовать небольшой рамке считывания, полностью отличной от аннотированной CDS. По-видимому, довольно большая часть эукариотических (в том числе и растительных) мРНК может содержать альтернативные рамки считывания и кодировать дополнительные изоформы известных белков или новые полипептиды (Kochetov, 2008; Vazykin, Kochetov, 2011; Ingolia *et al.*, 2009, 2011). Небольшие белки могут выполнять ряд важных функций у растений (регулировать процессы роста и развития, участвовать в защите от фитопатогенов и т. п.) и их изучение считается актуальным направлением развития современной

геномики и протеомики (Andrews, Rothnagel, 2014; Marmioli, Maestri, 2014).

Возможность присутствия альтернативных сайтов инициации трансляции должна приниматься во внимание в тех случаях, когда трансгенные растения используются в качестве модели для исследования функций конкретных генов. Следует учесть, что если стартовый кодон изучаемого гена был расположен в субоптимальном контексте, а в созданной для его изучения генетической конструкции был использован оптимальный контекст (для увеличения уровня экспрессии), то существует вероятность, что такая модель не будет полностью адекватной, так как альтернативные рамки считывания в модельном трансгенном растении транслироваться не будут.

ТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ЭНХАНСЕРЫ, УСИЛИВАЮЩИЕ ОБЩУЮ (НЕСПЕЦИФИЧЕСКУЮ) ТРАНСЛЯЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ мРНК

Многие РНК-позитивные вирусы растений в ходе эволюции выработали механизмы, позволяющие их мРНК транслироваться на очень высоком уровне (Nicholson, White, 2011). Было показано, что некоторые 5'-НТП вирусного или клеточного происхождения способны усиливать эффективность трансляции гетерологичных мРНК в тех случаях, когда они использованы вместо аутологичных лидерных районов. Эти так называемые «трансляционные энхансеры» могут использоваться при планировании генетических конструкций. 67-нуклеотидный 5'-НТП вируса табачной мозаики («Omega leader») (Gallie *et al.*, 1987a) является наиболее широко используемым трансляционным энхансером в генной инженерии растений. Он позволяет существенно усиливать эффективность трансляции гетерологичных мРНК в клетках двудольных растений (Fan *et al.*, 2012). Механизмы, лежащие в основе этого эффекта, не вполне понятны: было показано, что эта нуклеотидная последовательность может взаимодействовать с факторами инициации трансляции eIF4G и eIF3, а также с HSP101 (Gallie, 2002). В составе энхансера выделяют (CAA)_n – повтор, способный формировать специфическую структуру,

вовлеченную во взаимодействие с клеточными белками (Agalarov *et al.*, 2011). С нашей точки зрения, 5'-НТП вируса табачной мозаики может рассматриваться в качестве типового элемента генетической конструкции в тех случаях, когда необходимо увеличить уровень синтеза трансгенного белка (нужно отметить, что для биопродукции в технологических целях обычно используют специально разработанные более продвинутые подходы (см. Nopo *et al.*, 2012; Akua, Shaul, 2013; Meshcheriakova *et al.*, 2014)). Другой распространенный трансляционный энхансер – 5'-НТП РНК4 вируса мозаики люцерны (Gallie *et al.*, 1987b). Он короче и несколько менее эффективен в сравнении с Омегалидером, но также был использован во многих экспериментах для увеличения трансляционной активности мРНК трансгенов в растениях. Эти два 5'-НТП представляют собой классические примеры кеп-зависимых трансляционных энхансеров, имеющих в инструментарии генной инженерии растений.

Известно несколько других 5'-НТП, для которых была показана способность усиливать трансляционную активность гетерологичных мРНК в клетках растений. Однако следует учитывать тот факт, что во многих случаях такое усиление было продемонстрировано в сравнении с контрольными конструкциями, у которых 5'-НТП был взят из векторной плазмиды и трансляционная активность репортерных мРНК в контроле могла быть ниже, чем у растительных матриц (как в случае рBi121, см. выше). Возможно, некоторые из таких «трансляционных энхансеров» представляли собой 5'-НТП, оптимизированные для взаимодействия с аппаратом трансляции в клетках растений (т. е. их активность не определялась какими-то дополнительными механизмами).

В качестве примеров таких усилителей трансляции можно привести 65-нуклеотидный лидерный район глутаминсинтетазы сои (Ortega *et al.*, 2012; контрольный вектор САНБИА 2301 содержал 5'-НТП размером 20 н.). 5'-НТП из мРНК генов *HSP18.2*, *HSP17.4*, *HSP81-1*, *HSP81-2*, *HSP81-3* усиливали трансляцию репортерных мРНК в клетках табака и арабидопсиса (рBi121 был использован как контроль) (Dansako *et al.*, 2003). 5'-НТП мРНК генов алкогольдегидрогеназы арабидопсиса,

табака и риса усиливали трансляцию репортерных конструкций в клетках табака, 5'-НТП гена алкогольдегидрогеназы риса также обладала энхансерными свойствами в клетках *Oryza sativa* (Satoh *et al.*, 2004; Sugio *et al.*, 2008; Matsui *et al.*, 2009). Список трансляционно активных 5'-НТП включает также ряд других примеров (Yamamoto *et al.*, 1995; De Loose *et al.*, 1995; Kanoria, Burma, 2012).

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭНХАНСЕРЫ ТРАНСЛЯЦИИ

Известно, что эффективность трансляции мРНК может регулироваться тканеспецифически или зависеть от определенной фазы развития организма (Mustroph *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2012). Трансляционные энхансеры такого типа были найдены в мРНК ферредоксина, 5'-НТП которой содержит так называемые светочувствительные элементы, присутствие которых приводит к быстрому снижению эффективности трансляции при наступлении темноты (Hansen *et al.*, 2001). Недавно были проведены высокопроизводительные эксперименты, показавшие, что изменение эффективности трансляции при изменении освещенности характерно для мРНК целого ряда генов растений (Juntawong, Bailey-Serres, 2012; Liu *et al.*, 2012). Другие примеры ткане- и стадийспецифических трансляционных энхансеров включают 5'-НТП гена *npt303* табака (Hulzink *et al.*, 2002), *RbcS1* амаранта (Patel *et al.*, 2006) и т. п.

ТРАНСЛЯЦИЯ В УСЛОВИЯХ СТРЕССА

Хорошо известно, что разные виды абиотических стрессов приводят к специфическому снижению трансляционной активности большинства мРНК, в то время как часть матриц сохраняет трансляционную активность (Munoz, Castellano, 2012; Ueda *et al.*, 2012; Echevarría-Zomeco *et al.*, 2013; Roy, Arnim, 2013). Похожие изменения в трансляционной активности мРНК были найдены и при развитии вирусной инфекции (Moeller *et al.*, 2012). Механизмы, регулирующие эти процессы и регуляторные сигналы, опосредующие стресс-специфическую трансляционную активность мРНК, остаются малоизученными (Matsuura *et al.*, 2010).

Следует отметить, что растения часто оказываются в стрессовых условиях. Даже модельные эксперименты, которые проводят на трансгенных растениях, могут быть нацелены на выявление функций генов растений в стрессовых условиях (воздействие патогенов, засуха, изменение температуры и т. п.). Если экспрессия трансгена должна поддерживаться во время стресса, необходимо учесть это обстоятельство при планировании генетической конструкции. Было показано, что 5'-НТП некоторых стресс-индуцируемых генов способны обеспечить стресс-специфическую трансляцию мРНК репортерных генов. Например, 5'-НТП мРНК гена *FAD3* арабидопсиса обеспечивала 2-кратное усиление эффективности трансляции репортерной мРНК при низкотемпературном стрессе (Wang, Xu, 2010). 5'-НТП мРНК гена алкогольдегидрогеназы кукурузы усиливала трансляцию мРНК трансгена в клетках *Nicotiana benthamiana* в условиях кислородного голодания и теплового шока (Mardanova *et al.*, 2007). Омега-лидер также придавал мРНК трансгена способность транслироваться в условиях теплового шока (Gallie, 2002). Некоторые сигналы, обеспечивающие стресс-специфическую трансляцию при тепловом шоке, были недавно обнаружены в 5'-терминальной части 5'-НТП ряда клеточных мРНК (Matsuura *et al.*, 2008, 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этой статье кратко рассмотрены структура 5'-НТП мРНК растений и влияние этого функционального района на эффективность экспрессии трансгенов. Трансляция мРНК является одной из критических стадий процесса экспрессии, определяющих интенсивность синтеза белка, поэтому правильный выбор 5'-НТП является одной из важных предпосылок эффективного планирования экспериментов с трансгенными растениями.

Авторы признательны программе РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития» и РФФИ (14-04-01036) за поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

Agalarov S.C., Sogorin E.A., Shirokikh N.E., Spirin A.S. Insight into the structural organization of the omega leader of TMV RNA: the role of various regions of the

- sequence in the formation of a compact structure of the omega RNA // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 404. P. 250–253.
- Akua T., Shaul O. The Arabidopsis thaliana MHX gene includes an intronic element that boosts translation when localized in a 5' UTR intron // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 4255–4270.
- Andrews S.J., Rothnagel J.A. Emerging evidence for functional peptides encoded by short open reading frames // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 193–204.
- Bazykin G.A., Kochetov A.V. Alternative translation start sites are conserved in eukaryotic genomes // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. P. 567–577.
- Cavener D.R., Ray S.C. Eukaryotic start and stop translation sites // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 3185–3192.
- Christensen A.C., Lyznik A., Mohammed S. *et al.* Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons // *Plant Cell.* 2005. V. 17. P. 2805–2816.
- Dansako T., Kato K., Satoh J. *et al.* 5' untranslated region of the HSP18.2 gene contributes to efficient translation in plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2003. V. 95. P. 52–58.
- De Amicis F., Patti T., Marchetti S. Improvement of the pBI121 plant expression vector by leader replacement with a sequence combining a poly(CAA) and a CT motif // *Transgenic Res.* 2007. V. 16. P. 731–738.
- De Loose M., Danthinne X., Van Bockstaele E. *et al.* Different 5' leader sequences modulate b-glucuronidase accumulation levels in transgenic *Nicotiana tabacum* plants // *Euphytica.* 1995. V. 85. P. 209–216.
- Echevarría-Zomeño S., Yángüez E., Fernández-Bautista N., Castro-Sanz A.B. Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. P. 4670–4683.
- Englert M., Latz A., Becker D. *et al.* Plant pre-tRNA splicing enzymes are targeted to multiple cellular compartments // *Biochimie.* 2007. V. 89. P. 1351–1365.
- Fan Q., Treder K., Miller W.A. Untranslated regions of diverse plant viral RNAs vary greatly in translation enhancement efficiency // *BMC Biotechnol.* 2012. V. 12. P. 22.
- Gallie D.R. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. P. 3401–3411.
- Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. *et al.* The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts *in vitro* and *in vivo* // *Nucl. Acids Res.* 1987a. V. 15. P. 3257–3273.
- Gallie D.R., Sleat D.E., Watts J.W. *et al.* A comparison of eukaryotic viral 5'-leader sequences as enhancers of mRNA expression *in vivo* // *Nucl. Acids Res.* 1987b. V. 15. P. 8693–8711.
- Hansen E.R., Petracek M.E., Dickey L.F., Thompson W.F. The 5' end of the pea ferredoxin-1 mRNA mediates rapid and reversible light-directed changes in translation in tobacco // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 770–778.
- Hulzink R.J., Groot de P.F., Croes A.F. *et al.* The 5'-untranslated region of the ntp303 gene strongly enhances translation during pollen tube growth, but not during pollen maturation // *Plant Physiol.* 2002. V. 129. P. 342–353.
- Ingolia N.T., Ghaemmaghami S., Newman J.R., Weissman J.S. Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucle-

- otide resolution using ribosome profiling // *Science*. 2009. V. 324. P. 218–223.
- Ingolia N.T., Lareau L.F., Weissman J.S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes // *Cell*. 2011. V. 147. P. 789–802.
- Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 10. P. 113–127.
- Juntawong P., Bailey-Serres J. Dynamic light regulation of translation status in *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2012. V. 3. P. 66.
- Kanoria S., Burma P.K. A 28 nt long synthetic 5'UTR (synJ) as an enhancer of transgene expression in dicotyledonous plants // *BMC Biotechnol.* 2012. V. 12. P. 85.
- Kawaguchi R., Bailey-Serres J. mRNA sequence features that contribute to translational regulation in *Arabidopsis* // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. 955–965.
- Kertesz M., Wan Y., Mazor E. *et al.*, Genome-wide measurement of RNA secondary structure in yeast // *Nature*. 2010. V. 467. P. 103–107.
- Kim Y., Lee G., Jeon E. *et al.* The immediate upstream region of the 5'-UTR from the AUG start codon has a pronounced effect on the translational efficiency in *Arabidopsis thaliana* // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 485–498.
- Kochetov A.V. Alternative translation and hidden coding potential of eukaryotic mRNAs // *BioEssays*. 2008. V. 30. P. 683–691.
- Kochetov A.V., Ischenko I.V., Vorobiev D.G. *et al.* Eukaryotic mRNAs encoding abundant and scarce proteins are statistically dissimilar in many structural features // *FEBS Lett.* 1998. V. 440. P. 351–355.
- Kochetov A.V., Ponomarenko M.P., Frolov A.S. *et al.* Prediction of eukaryotic mRNA translational properties // *Bioinformatics*. 1999. V. 15. P. 704–712.
- Kochetov A.V., Sarai A., Rogozin I.B. *et al.* The role of alternative translation start sites in generation of human protein diversity // *Mol. Genet. Genomics*. 2005. V. 273. P. 491–496.
- Kochetov A.V., Sarai A., Vorob'ev D.G., Kolchanov N.A. The context organization of functional regions in yeast genes with high-level expression // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2002a. V. 36. P. 1026–1034.
- Kochetov A.V., Svirnik O.A., Rogozin I.B. *et al.* Context organization of mRNA 5'-untranslated regions of higher plants // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2002b. V. 36. P. 649–656.
- Kozak M. Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes // *Gene*. 2005. V. 361. P. 13–37.
- Liu M.J., Wu S.H., Chen H.M. Widespread translational control contributes to the regulation of *Arabidopsis* photomorphogenesis // *Mol. Syst. Biol.* 2012. V. 8. P. 566.
- Lukaszewicz M., Feuermann M., Jerouville B. *et al.* *In vivo* evaluation of the context sequence of the translation initiation codon in plants // *Plant Sci*. 2000. V. 154. P. 89–98.
- Mardanov E.S., Zamchuk L.A., Ravin N.V. The 5' untranslated region of the maize alcohol dehydrogenase gene provides efficient translation of mRNA in plants under stress conditions // *Mol. Biol. (Mosk)*. 2007. V. 41. P. 1002–1008.
- Marmioli N., Maestri E. Plant peptides in defense and signaling // *Peptides*. 2014. V. 56. P. 30–44.
- Matsui T., Asao H., Ki M. *et al.* Transgenic lettuce producing a candidate protein for vaccine against edema disease // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2009. V. 73. P. 1628–1634.
- Matsuura H., Ishibashi Y., Shinmyo A. *et al.* Genome-wide analyses of early translational responses to elevated temperature and high salinity in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Cell. Physiol.* 2010. V. 51. P. 448–462.
- Matsuura H., Shinmyo A., Kato K. Preferential translation mediated by Hsp81-3 5'-UTR during heat shock involves ribosome entry at the 5'-end rather than an internal site in *Arabidopsis* suspension cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. P. 39–47.
- Matsuura H., Takenami S., Kubo Y. *et al.* A computational and experimental approach reveals that the 5'-proximal region of the 5'-UTR has a cis-regulatory signature responsible for the heat stress-regulated mRNA translation in *Arabidopsis* // *Plant Cell. Physiol.* 2013. V. 54. P. 474–483.
- Meshcheriakova Y.A., Saxena P., Lomonosoff G.P. Fine-tuning levels of heterologous gene expression in plants by orthogonal variation of the untranslated regions of a nonreplicating transient expression system // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 718–727.
- Moeller J.R., Moscou M.J., Bancroft T. *et al.* Differential accumulation of host mRNAs on polyribosomes during obligate pathogen-plant interactions // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. P. 2153–2165.
- Mustroph A., Zanetti M.E., Jang C.J. *et al.* Profiling translomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in *Arabidopsis* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 18843–18848.
- Munoz A., Castellano M.M. Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: Is it a conserved or not so conserved process among eukaryotes? // *Comp. Funct. Genomics*. 2012:406357.
- Nicholson B.L., White K.A. 3' Cap-independent translation enhancers of positive-strand RNA plant viruses // *Curr. Opin. Virol.* 2011. V. 1. P. 373–380.
- Nopo L., Woffenden B.J., Reed D.G. *et al.* Super-promoter: TEV, a powerful gene expression system for tobacco hairy roots // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 824. P. 501–526.
- Ortega J.L., Wilson O.L., Sengupta-Gopalan C. The 5' untranslated region of the soybean cytosolic glutamine synthetase $\beta(1)$ gene contains prokaryotic translation initiation signals and acts as a translational enhancer in plants // *Mol. Genet. Genomics*. 2012. V. 287. P. 881–893.
- Patel M., Siegel A.J., Berry J.O. Untranslated regions of FbRbcS1 mRNA mediate bundle sheath cell-specific gene expression in leaves of a C4 plant // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 25485–25491.
- Roy B., Arnim von A.G. Translational regulation of cytoplasmic mRNAs // *Arabidopsis Book*. 2013. V. 11. e0165.
- Satoh J., Kato K., Shinmyo A. The 5'-untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant // *J. Biosci. Bioeng.* 2004. V. 98. P. 1–8.
- Sugio T., Matsuura H., Matsui T. *et al.* Effect of the sequence context of the AUG initiation codon on the rate of translation in dicotyledonous and monocotyledonous plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2010. V. 109. P. 170–173.
- Sugio T., Satoh J., Matsuura H. *et al.* The 5'-untranslated region of the *Oryza sativa* alcohol dehydrogenase gene functions

- as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells // *J. Biosci. Bioeng.* 2008. V. 105. P. 300–302.
- Sunderland P.A., West C.E., Waterworth W.M., Bray C.M. Choice of a start codon in a single transcript determines DNA ligase I isoform production and intercellular targeting in *Arabidopsis thaliana* // *Biochem. Soc. Transact.* 2004. V. 32. P. 614–616.
- Ueda K., Matsuura H., Yamaguchi M. *et al.* Genome-wide analyses of changes in translation state caused by elevated temperature in *Oryza sativa* // *Plant Cell. Physiol.* 2012. V. 53. P. 1481–1491.
- Volkova O.A., Kochetov A.V. Interrelations between the nucleotide context of human start AUG codon, N-end amino acids of the encoded protein and initiation of translation // *J. Biomol. Struct. Dynam.* 2010. V. 27. P. 611–618.
- Wang C.T., Xu Y.N. The 5' untranslated region of the FAD3 mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in *Arabidopsis* roots // *Plant Sci.* 2010. V. 179. P. 234–240.
- Watanabe N., Che F.-S., Iwano M. *et al.* Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 20474–20481.
- Yamamoto Y.Y., Tsuji H., Obokata J. 5'-leader of a photosystem I gene in *Nicotiana sylvestris*, *psaDb*, contains a translational enhancer // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 12466–12470.

TRANSLATIONAL ENHANCERS FOR PLANT GENE ENGINEERING

A.V. Kochetov^{1,2}, E.A. Filipenko¹, O.G. Smirnova¹, V.K. Shumny^{1,2}

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

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Transgenic plants are often used in both fundamental and applied research. It is well known that transgene expression strongly depends on the genetic construct design. In particular, 5'-UTR is an important element, as it influences mRNA translation efficiency and the protein synthesis rate. The review considers 5'-UTR features controlling translation efficiency in plant cells and some useful translational enhancers.

Key words: transgenic plants, gene engineering, translation, mRNA features, enhancers.

УДК 575.2:582.542.1

ПОВТОРЯЮЩИЕСЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК В ГЕНОМАХ РАСТЕНИЙ

А.Б. Щербань

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

Поступила в редакцию 25 сентября 2014 г. Принята к публикации 16 октября 2014 г.

Обзор посвящен характеристике основных классов повторяющихся последовательностей ДНК, включая кодирующие (гены рРНК) и некодирующие последовательности (тандемные и диспергированные повторы). Обсуждается особая роль этих компонентов в формировании структурно-функциональной организации генома высших растений, а также в обеспечении повышенной по сравнению с геномом животных генетической изменчивости на уровне как отдельных последовательностей, так и генома.

Ключевые слова: высшие растения, повторяющиеся последовательности ДНК, гены рРНК, тандемный повтор, мобильный элемент.

ДНК ядерного генома растений содержит уникальные или низкокопийные кодирующие последовательности ДНК, непосредственно связанные с ними регуляторные элементы, а также различные классы повторяющихся последовательностей (ПП) ДНК (Schmidt, Heslop-Harrison, 1998). Часть ПП ДНК может иметь кодирующую функцию как, например, гены рибосомальной РНК (рРНК). Другая часть этих последовательностей не несет функцию кодирования белков, необходимых для функционирования и воспроизводства организма. Однако они могут кодировать белки, важные для их собственного размножения в геноме (мобильные генетические элементы).

ПП ДНК являются основным компонентом генома растений. По разным данным, у злаков к ним может относиться до 90–95 % ядерной ДНК (Flavell *et al.*, 1974; Paux *et al.*, 2006). ПП представляют собой высокогетерогенную группу, представленную тысячами или даже десятками тысяч семейств, отличающихся по длине мотива, уровню копийности и организации в геноме (Flavell, 1986; Kubis *et al.*, 1998; Heslop-Harrison, 2000). Причины поддержания столь значительного количества ПП ДНК, а так-

же высокого разнообразия их состава до конца не изучены. Предполагают, что они играют важную роль в стабилизации и поддержании структуры хромосом, участвуют в «узнавании» и правильном расхождении хромосом во время митоза и мейоза (Vershinin *et al.*, 1995; Kubis *et al.*, 1998). Локусы некоторых семейств сателлитных ДНК выступают как точки рекомбинации хромосом в мейозе (Vershinin *et al.*, 1995; Linares *et al.*, 1998). Теломерно-ассоциированные повторы выполняют функцию защиты теломер и участвуют в регуляции генов, локализованных в субтеломерных районах (Sykorova *et al.*, 2003). Показано, что видообразование у растений часто связано с быстрыми изменениями фракции ПП ДНК (Flavell, 1982; Dvorak *et al.*, 1998; Cuadrado, Jouve, 2002).

ГЕНЫ рРНК

Наряду с первичной перетяжкой в области центромеры у метафазной хромосомы существует вторичная перетяжка в районе организации ядрышка (NOR – nucleolar organizer region). Этот район соответствует сайтам локализации генов, кодирующих рРНК, которая считывается

в виде единого транскрипта с коэффициентом седиментации 45S. Данная РНК затем подвергается процессингу с образованием 18S, 5,8S и 26S субъединиц рРНК. Тандемно организованные повторяющиеся единицы рДНК, наряду с цистроном 18S–5,8S–26S рРНК, содержат межгенный спейсерный район, в котором локализуется сайт инициации транскрипции для РНК-полимеразы I, сайты инициации и терминации транскрипции рРНК и другие регуляторные элементы (рис. 1.) (Gerlach, Bedbrook, 1979; Reeder, 1984; Vincentz, Flavell, 1989). Нетранскрибируемый спейсер содержит также ряд повторяющихся нуклеотидных последовательностей, так называемых субповторов А, В, С и D, протяженность и число которых варьируют у разных видов растений; при этом внутри отдельных кластеров длина повторяющейся единицы, как правило, одинаковая (Appels, Dvořák, 1982a, b). У злаков (Triticeae) имеется несколько дискретных локусов рДНК, расположенных на коротких плечах хромосом 1, 5 и 6, каждый из которых содержит ~ 1200 повторяющихся единиц длиной ~ 9 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.) (Flavell, O'Dell, 1976; Gerlach, Bedbrook, 1979). У арабидопсиса локусы рДНК расположены на двух хромосомах с числом копий ~360 единиц/локус, что в сумме составляет около 5 % всего генома (Copenhaver, Pikaard, 1996).

Гены, кодирующие 5S субъединицу рРНК, локализованы отдельно от 45S рРНК генов, но имеют тот же принцип организации. У злаков локусы 5S рРНК расположены на хромосомах 1 и 5 и содержат до нескольких тысяч единиц, каждая из которых состоит из консервативной кодирующей части длиной 120 пар нуклеотидов (п.н.) и варибельного нетранскрибируемого спейсера (рис. 1) (Appels *et al.*, 1980). В геноме Triticeae присутствуют два подсемейства: 5SDna-1 и 5SDna-2 с длиной спейсеров 200–349 и 350–380 п.н. соответственно (Gerlach, Dyer, 1980). Различия в размере единиц 5S рДНК обусловлены инсерциями/делециями в средней полиморфной части спейсера, тогда как 5'- и 3'-фланкирующие районы генов являются консервативными и содержат сайт связывания РНК-полимеразы III и сайт терминации соответственно (Appels *et al.*, 1992). У некоторых видов *Brachypodium* были обнаружены очень короткие спейсеры длиной 30 п.н., поэтому можно предполагать, что у рас-

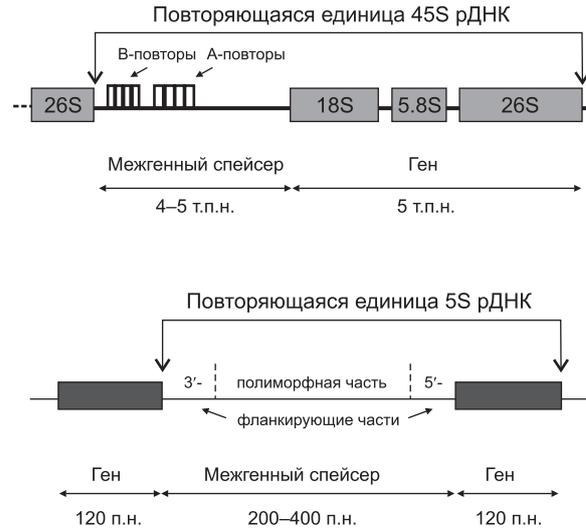


Рис. 1. Организация рибосомальных генов, кодирующих 45S и 5S рРНК.

тений часть спейсерных последовательностей лишена какой-либо функции (Cox *et al.*, 1992).

Как 45S рРНК, так и 5S рРНК локусы часто подвергаются реорганизации в ходе эволюции. Так, у двух экотипов *A.thaliana* (Landsberg и Columbia) локусы 5S рРНК расположены на разных хромосомах (Murata *et al.*, 1997). У злаков как размер локусов рРНК, так и их расположение на хромосомах сильно отличаются даже между близкородственными видами (Castilho, Heslop-Harrison, 1995).

ТАНДЕМНО ОРГАНИЗОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Первые представления о тандемно организованных ПП были получены при изучении сателлитной ДНК. Сначала этим термином обозначали ту часть генома, которая отделялась при градиентном ультрацентрифугировании (Kit, 1961) и, следовательно, по плотности и содержанию АТ/ГС пар должна была отличаться от основной массы ДНК. В настоящее время под этим термином подразумевается характерный компонент эукариотического генома, состоящий из тандемно организованных повторов. Сателлитная ДНК не кодирует белки и локализована в конститутивном гетерохроматине хромосом (см. обзор: Хемлебен и др., 2003). Сателлитная ДНК состоит из рядов идентичных повторяющихся единиц (мономеров), число

которых может варьировать от нескольких сот до более миллиона. В зависимости от размера повторяющихся единиц различают микро- и минисателлитную ДНК. Микросателлиты (SSR – simple sequence repeats) имеют длину мономера не более 10 п.н., тогда как у минисателлитов она колеблется в пределах 10–100 п.н. (Sharma, Raina, 2005). Остальные повторы с длиной мономера выше 100 п.н. относятся к сателлитной ДНК. В геномах пшеницы и ячменя микросателлитная ДНК составляет 1,2% и 3,8% соответственно и в основном представлена короткими высокоповторяющимися последовательностями $(GAA)_n(GAG)_m$ (Mitra, Bhatia, 1986). Были выделены и охарактеризованы динуклеотидные микросателлитные последовательности *Ae. tauschii*, донора генома D мягкой пшеницы (Pestsova *et al.*, 2000a). Микросателлитные повторы имеют, главным образом, интерстициальное расположение на хромосомах и широко используются в качестве маркеров для построения молекулярно-генетических карт, в частности мягкой пшеницы (Pestsova *et al.*, 2000a; Paillard *et al.*, 2003; Somers *et al.*, 2004). Для минисателлитной и сателлитной ДНК характерно более локализованное распределение на концах хромосом или в центромерных районах. Так, например, протяженные тандемные повторяющиеся единицы входят в состав теломерного гетерохроматина ржи *Secale cereale*, занимая 8–12% генома (Bedbrook *et al.*, 1980). Были детально исследованы четыре семейства теломерных повторов ржи, имеющих сложную иерархическую структуру. Основным является семейство 120 п.н. (pSc119.2), первоначально клонированное из *Secale cereale* и впоследствии обнаруженное у многих видов трибы Triticeae и сестринской трибы Avenae (Bedbrook *et al.*, 1980; McIntyre *et al.*, 1990; Vershinin *et al.*, 1995; Salina *et al.*, 1998). Повторяющиеся единицы остальных семейств содержат простые субповторы длиной 120 п.н. в сочетании с другими последовательностями (Bedbrook *et al.*, 1980).

Из *Aegilops speltoides* было выделено видоспецифичное теломерное семейство повторов Spelt1, составляющее около 2% ядерной ДНК данного вида (Salina *et al.*, 1998). Указанные повторы длиной 178 п.н. входят в состав теломерных районов хромосом наряду с более общим для злаков семейством Spelt52, при этом Spelt1

повторы расположены дистально (Salina *et al.*, 2006). Семейство Spelt52 содержит мономеры двух типов: Spelt52.1 и Spelt52.2, которые имеют одинаковую консервативную часть длиной 283 п.н. и негомологичные участки длиной 92 и 106 п.н. соответственно (Salina *et al.*, 2004).

Помимо уже указанных семейств тандемных повторов, у представителей трибы Triticeae был найден ряд других семейств, имеющих теломерную (центромерную) локализацию:

а) *Afa* (pAs1)-семейство повторов длиной 340 п.н., которые локализованы в теломерных и интерстициальных хромосомных районах *Ae. tauschii*, *T. aestivum*, видов *Hordeum*, *Elymus trachycaulus* (Rayburn, Gill, 1986; Nagaki *et al.*, 1995, 1998). К этой же группе можно отнести семейство тандемно организованных последовательностей pAesKB52, расположенных в теломерных районах хромосом у некоторых видов Triticeae, относящихся к S-геному (*Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis* и *Ae. longissima*) (Anamthawat-Josson, Heslop-Harrison, 1993; Zhang *et al.*, 2002; Salina *et al.*, 2004);

б) семейство *Tail*, состоящее из тандемных повторов длиной 570 п.н., обнаруженных в теломерных районах большинства видов Triticeae, за исключением видов *Triticum* и *Aegilops*, у которых выявлено центромерное расположение указанных повторов (Kishii, Tsujimoto, 2002);

в) специфичный для центромер тандемный повтор *CentC* кукурузы *Zea mays* длиной 156 п.н. (Ananiev *et al.*, 1998);

г) *HvRT*-теломерные повторы *Hordeum vulgare* с длиной мономера 118 п.н., имеющие сложную иерархическую организацию (Kilian, Kleinhofs, 1992).

Тандемные повторы могут распространяться по геному посредством неравного кроссинговера между парами сестринских хроматид или гомологичных хромосом (Charlesworth *et al.*, 1994), а также с помощью репликации экстрахромосомной ДНК по модели «катящегося колеса» (Navratilova *et al.*, 2008).

ДИСПЕРГИРОВАННЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Известно, что основная масса диспергированных ПП ДНК возникла в результате активности мобильных элементов. Мобильные

элементы (МЭ) генома подразделяют на два класса: элементы класса I (ретротранспозоны), которые перемещаются с помощью механизма «копирования–встраивания» с использованием РНК-посредников; и элементы класса II (ДНК-транспозоны), которые используют механизм «вырезания–встраивания», с образованием либо одно-, либо двухцепочечных разрывов ДНК (Wicker *et al.*, 2007) (рис. 2).

Класс I, ретротранспозоны

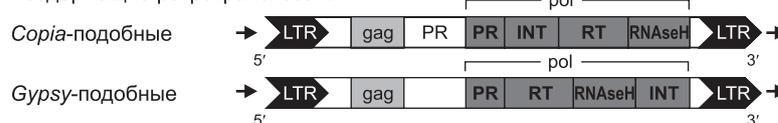
Согласно общепринятой классификации, по наличию–отсутствию длинных концевых повторов (LTR) ретротранспозоны делятся на LTR-содержащие (LTR ретротранспозоны) и несодержащие ретротранспозоны. Последние в свою очередь делятся на длинные диспергированные (*LINE*) и короткие диспергированные (*SINE*) элементы (рис. 2). Кроме этих основных групп, выделяют дополнительные группы: *DIRS*- и *Penelope*-подобные элементы, а также неавтономные варианты LTR-ретротранспозонов: *TRIM*- (Terminal-Repeat Retrotransposons In Miniature) и *LARD*-элементы (Large Retrotransposon Derivatives) (см. обзор Сергеева, Салина, 2011).

Выделяют два основных суперсемейства LTR-ретротранспозонов: *Gypsy* и *Copia*, различающихся порядком расположения генов

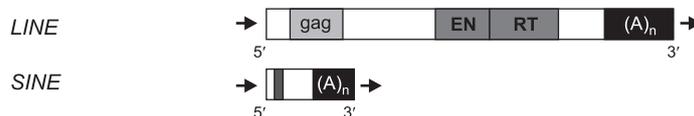
обратной транскриптазы и интегразы друг относительно друга, но имеющих одинаковый механизм транспозиции (Wicker *et al.*, 2007). У растений LTR-ретротранспозоны являются преобладающей группой МЭ. Они составляют от 15 % генома у *Arabidopsis thaliana* и до 90 % у некоторых представителей *Liliaceae* (Flavell *et al.*, 1992; Voytas *et al.*, 1992; Bennetzen, 1996; SanMiguel *et al.*, 1996; Suoniemi *et al.*, 1998; Kumar, Bennetzen, 1999; Vicient *et al.*, 2001; Vitte, Panaud, 2005; Sabot, Schulman, 2006; Vitte, Bennetzen, 2006). Длина этих элементов варьирует от нескольких т.п.н. до 25 т.п.н., а размер LTR – от нескольких сотен п.н. до нескольких т.п.н. LTR ограничены инвертированными динуклеотидами TG/CA и содержат промотор с энхансером, а также сайт полиаденилирования. При интеграции LTR ретротранспозоны образуют дубликацию сайта-мишени (TSD) длиной 4–6 п.н. Внутренняя область LTR ретротранспозонов содержит 2 открытые рамки считывания (ORF): GAG для структурного белка вирусоподобных частиц и POL, кодирующую аспарагиновую протеиназу (PR), обратную транскриптазу (RT), РНКазу H (RH) и интегразу (INT) (рис. 2). LTR ретротранспозоны также содержат специальные сигналы для упаковки, димеризации, обратной транскрипции и интеграции. Растения с большими геномами, такие как кукуруза, пшеница, ячмень, могут содержать

Класс 1. Ретротранспозоны

LTR-содержащие ретротранспозоны



LTR-несодержащие ретротранспозоны



Класс 2. ДНК-транспозоны



Рис. 2. Основные группы мобильных элементов (по: Wicker *et al.*, 2007).

тысячи семейств LTR-ретротранспозонов. Однако в каждом геноме основную массу диспергированных повторов ДНК составляют, как правило, несколько или даже одно семейство ретротранспозонов, например *BARE1* у ячменя (Vicent *et al.*, 1999), *Opie* у кукурузы (SanMiguel *et al.*, 1998).

В настоящий момент нет точных данных о содержании *LINE* элементов в геномах растений из-за сложности их идентификации, однако, по видимому, они составляют гораздо меньшую часть генома в сравнении с LTR ретротранспозонами (Сергеева, Салина, 2011). Автономные *LINE* элементы кодируют по меньшей мере RT и эндонуклеазу (EN) в одной рамке считывания (POL), необходимые для транспозиции (Ostertag, Kazazian, 2005) (рис. 2). У некоторых представителей *LINE* выявлена GAG-подобная ORF с 5'-конца от POL, однако ее функция еще не ясна. Хотя *LINE* и образуют TSD в результате транспозиции, редуцированные 5'-концы делают их сложными для определения. Редукция, возможно, является результатом преждевременной терминации обратной транскрипции (Petrov, Hartl, 1998). На 3'-конце *LINE* могут содержать поли(A)-хвост, тандемный повтор или A-богатый район. Таким образом, *LINE* элементы более разнообразны по своей структуре, чем LTR ретротранспозоны. К наиболее известным растительным *LINE* элементам относятся представители суперсемейств *L1* и *RTE* (Zupunski *et al.*, 2001).

SINE элементы формально отнесены к классу 1, хотя имеют другое происхождение. Это неавтономные элементы, но они не являются делеционными производными других ретротранспозонов. В отличие от ретропроцессированных псевдогенов, они содержат внутренний промотор. *SINE* элементы перемещаются пассивно, под действием белковых факторов, кодируемых *LINE* элементами (RT) (Kajikawa, Okada, 2002; Kramerov, Vassetzky, 2005). Длина *SINE* элементов составляет 80–500 п.н. Они образуют TSD (5–15 п.н.). «Голова» или передняя часть *SINE* содержит промотор для РНК полимеразы III и определяет суперсемейство *SINE* элемента в зависимости от его происхождения: тРНК, 7SL РНК и 5S РНК. Внутренние районы *SINE* элементов (50–200 п.н.) специфичны для семейства и имеют различное происхождение,

иногда могут быть результатом димеризации или тримеризации *SINE* элементов. Источник 3'-района обычно неясен (иногда – это укороченный *LINE* элемент). Он может быть АТ-богатым, содержать 3–5 п.н. тандемные повторы или поли(Т)-хвост, сигнал терминации (Kramerov, Vassetzky, 2005).

Класс II, ДНК транспозоны

ДНК транспозоны, как и ретротранспозоны, обнаружены почти у всех эукариот. Они обычно представлены в небольшом количестве, тем не менее некоторые, как, например, *Pogo-Fot1* (Daboussi, Cary, 2003) у грибов или *CASTA* у пшеницы (Wicker *et al.*, 2003), распространились более успешно. Класс II содержит два подкласса: первый объединяет элементы, которые перемещаются с помощью классического механизма «вырезания–встраивания» с образованием двухцепочечного разрыва ДНК, а второй подкласс использует для перемещения механизм «катящегося кольца» (Сергеева, Салина, 2011).

Подкласс 1 содержит классические мобильные элементы, характеризующиеся наличием концевых инвертированных повторов (TIR) переменной длины (рис. 2). Транспозиция осуществляется с помощью белка транспозазы, который узнает концевые инвертированные повторы и разрезает обе цепи на обоих концах элемента. TIR-содержащие ДНК транспозоны представлены надсемействами *hAT*, *Tc-Mariner*, *Mutator* (*MULU*), *P*, *PIF-Harbinger* и *CASTA* (Wicker *et al.*, 2007). Наиболее подробно изучены *hAT*-семейства: *Ac-Ds*-элементы кукурузы и *Tam3* львиного зева (Rubin *et al.*, 2001). Суперсемейство *PIF-Harbinger* предпочтительно встраивается рядом с ТАА-мотивом. Эти мобильные элементы содержат две ORF: одна кодирует ДНК-связывающий белок, другая – транспозазу (Jurka, Kapitonov, 2001).

CASTA элементы имеют характерную структурную черту: на внешних концах TIR присутствует консервативный мотив *CASTA*. Наиболее хорошо изученным является *CASTA*-транспозон семейства *Spm* (*Suppressor-Mutator*) кукурузы (Frey *et al.*, 1990). Члены суперсемейства *CASTA* кодируют транспозазу и ORF с неизвестной функцией. У растений короткие

TIR ограничены высококонсервативными САСТА (иногда САСТГ) мотивами и фланкированы 3 п.н. TSD (табл.). TIR обычно фланкируют сложные массивы субтерминальных повторов (Wicker *et al.*, 2003).

К подклассу 1 принадлежит многочисленная и гетерогенная группа неавтономных элементов *MITE* (Miniature Inverted-Repeat Transposable Element) (Сергеева, Салина, 2011). Эти элементы имеют размер от нескольких десятков до нескольких сотен п.н.. Размер TIR весьма вариабелен и составляет от нескольких десятков до нескольких сотен п.н. *MITE* элементы образуют TSD длиной 9–11 п.н. Основываясь на нуклеотидной последовательности TIR, *MITE* разделяют на два больших надсемейства: *Stowaway*-подобные и *Tourist*-подобные элементы. В геномах растений эти элементы часто расположены рядом с генами (Bureau, Wessler, 1992, 1994).

Подкласс 2 содержит мобильные элементы, процесс транспозиции которых влечет за собой репликацию без двунитевых разрывов, чем резко отличается от подкласса 1. Эти мобильные элементы перемещаются путем репликации, приводящей к переносу только одной цепи. С подклассом 1 их связывает только признак отсутствия РНК-посредников, но не наличие общих предков (Wicker *et al.*, 2007). Подкласс 2 в геномах растений представлен элементами суперсемейства *Helitron*, которые хорошо описаны в геноме кукурузы (Kapitonov, Jurka, 2001). Концы этих элементов не содержат TIR, но имеют TC или CTRR мотивы (где R – пурин). Автономные элементы *Helitron* кодируют тирозиновую рекомбиназу Y2-типа с геликазным доменом и способностью к инициации репликации. Также они могут кодировать белки, связывающие одноцепочечную ДНК, или другие белки (Kapitonov, Jurka, 2001). Любопытно, что многие *Helitron*-элементы несут случайно захваченные фрагменты генов хозяина. Хотя эти мобильные элементы были описаны в основном для растений, они также найдены у животных и грибов (Poulter, Goodwin, 2005).

Некоторые группы ДНК-транспозонов остаются неклассифицированными, поскольку для них известны последовательности только неавтономных вариантов. Такую группу малоизученных МЭ представляют *Foldback*-(FB)

элементы, сходные с одноименным элементом *Drosophila melanogaster*. Эти элементы представлены в широком ряду организмов, в том числе и растений: у риса *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, ржи *Secale cereale*, пасленовых *Solanaceae* (Feschotte, Pritham, 2007).

ИЗМЕНЧИВОСТЬ РАЗМЕРА ЯДЕРНОГО ГЕНОМА У ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Размер ядерного генома у высших (покрытосеменных) растений варьирует в широких пределах, хотя для каждого вида он обычно имеет более или менее постоянное значение. Размер генома, измеряемый в количестве ДНК (в млн пар нуклеотидов, м.п.н.) на гаплоидный геном (1C), варьирует от 63 м.п.н. у плотоядного растения *Genlisea aurea* ($2n = 52$) до 149 000 м.п.н. у вида лилий *Paris japonica* ($2n = 40$), т.е. различия могут достигать 2 300 раз (Bennett, Leitch, 2011). Растения с маленьким геномом (< 200 м.п.н.) включают одно семейство однодольных и 13 семейств двудольных. Растения с огромным геномом часто встречаются среди видов однодольных, особенно относящихся к порядку Liliales, тогда как только 9 семейств двудольных имеют виды с геномом более 15 000 м.п.н. (Leitch *et al.*, 2007; Bennett, Leitch, 2011). Средний размер генома покрытосеменных растений составляет 5 800 м.п.н. (у однодольных – 10 200 м.п.н.; у двудольных – 2 800 м.п.н.) (рис. 3).

Средняя длина гена (за исключением интронов) у эукариот равна 1 346 п.н. (с небольшой вариацией между таксонами) (Xu *et al.*, 2006), тогда как число генов у диплоидных высших растений – около 30 000 (Ming *et al.*, 2008), что составляет в сумме 40 м.п.н.. Если сюда добавить структурные районы хромосом (центромеры и теломеры), рДНК, регуляторные последовательности и интроны, то получим оценку ~ 60 м.п.н., сопоставимую с минимальным размером генома. Большинство известных растительных видов имеют размер генома, значительно превышающий минимальное значение. Увеличение размера ядерного генома может достигаться за счет мультипликации либо части генома, либо генома в целом (полиплоидизация). Полиплоидия происходила многократно в ходе эволюции растительных видов и была

Таблица

Классификация мобильных элементов и их распространенность у разных групп организмов (по: Wicker *et al.*, 2007)

Классификация		Структура	TSD	Распространенность
Порядок	Суперсемейство			
Класс 1 – ретротранспозоны				
LTR	Copia	→ [GAG AP INT RT RH] →	4–6	Р, Г, М, О
	Gypsy	→ [GAG AP RT RH INT] →	4–6	Р, Г, М, О
	Bel-Pao	→ [GAG AP RT RH INT] →	4–6	М
	Retrovirus	→ [GAG AP RT RH INT ENV] →	4–6	М
	ERV	→ [GAG AP RT RH INT ENV] →	4–6	М
DIRS	DIRS	> [GAG AP RT RH YR] <	0	Р, Г, М, О
	Ngaro	→ [GAG AP RT RH YR] → → →	0	М, Г
	VIPER	→ [GAG AP RT RH YR] → → →	0	О
PLE	Penelope	← [RT EN] →	вар.	Р, Г, М, О
LINE	R2	— [RT EN] —	вар.	М
	RTE	— [APE RT] —	вар.	М
	Jockey	— [ORF1] [APE RT] —	вар.	М
	L1	— [ORF1] [APE RT] —	вар.	Р, Г, М, О
	I	— [ORF1] [APE RT RH] —	вар.	Р, Г, М
SINE	tRNA	— [] —	вар.	Р, Г, М
	7SL	— [] —	вар.	Р, Г, М
	5S	— [] —	вар.	М, О
Класс 2 – ДНК-транспозоны. Подкласс 1				
TIR	Tc1-Mariner	> [Tase'] <	ТА	Р, Г, М, О
	hAT	> [Tase'] <	8	Р, Г, М, О
	Mutator	> [Tase'] <	9–11	Р, Г, М, О
	Merlin	> [Tase'] <	8–9	М, О
	Transib	> [Tase'] <	5	М, Г
	P	> [Tase] <	8	Р, М
	PiggyBac	> [Tase] <	ТТА	М, О
	PIF-Harbinder	> [Tase'] [ORF2] <	3	Р, Г, М, О
	CACTA	> [Tase] [ORF2] <	2–3	Р, Г, М
Crypton	Crypton	— [YR] —	0	Г
Класс 2 – ДНК-транспозоны. Подкласс 2				
Helitron	Helitron	— [RPA] // [Y2 HEL] —	0	Р, Г, М
Maverick	Maverick	> [C-INT] [ATP] // [CYP] [POL B] <	6	Г, М, О

Примечания. → — LTR, длинный концевой повтор; [] — кодирующая область; — — некодирующая область; > — < — TIR, концевые инвертированные повторы; [] — диагностические особенности в некодирующей области; // — район, содержащий одну или более дополнительных OFR.

AP — аспарагиновая протеаза; ENV — белок оболочки; POL B — ДНК-полимераза В; Tase — транспозаза (' — с DDE-мотивом); APE — апуриновая эндонуклеаза; GAG — капсидный белок; RH — РНКазы H; ATP — упаковочная АТФаза; HEL — геликаза; RPA — репликативный белок А (только у растений); YR — тирозиновая рекомбиназа; C-INT — C-интеграза; CYP — цистеиновая протеаза; PFR — открытая рамка считывания с неизвестной функцией; RT — обратная транскриптаза; Y2 — YR с YY-мотивом; EN — эндонуклеаза; Р — растения; Г — грибы; М — Metazoa; О — остальные организмы.

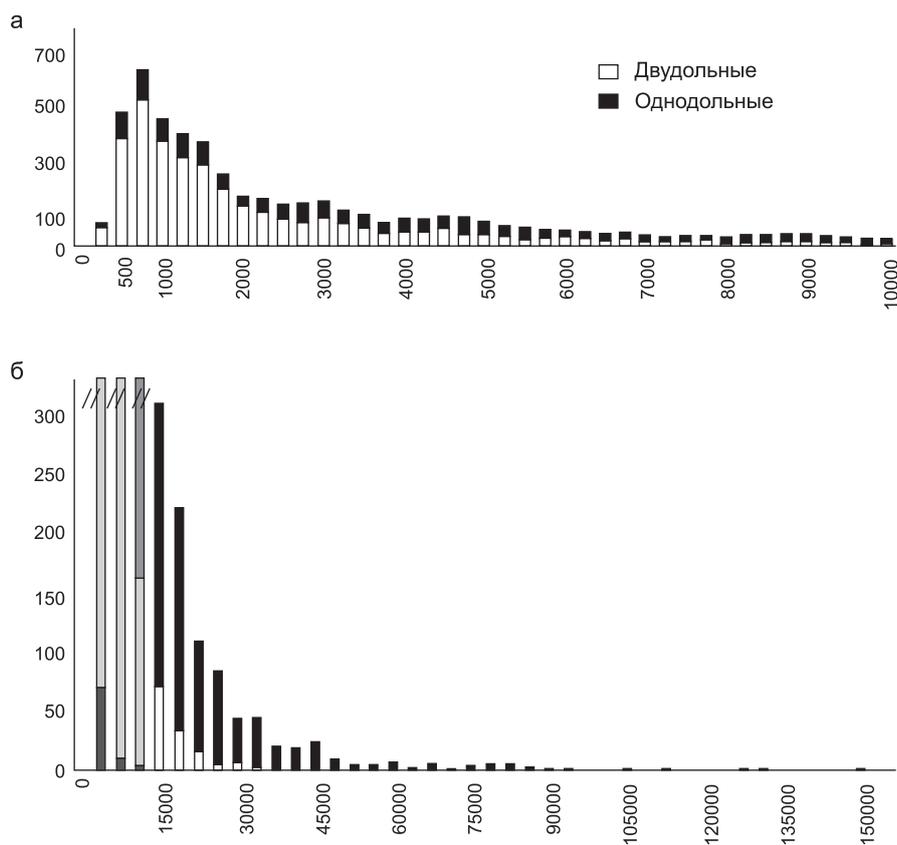


Рис. 3. Размер генома у покрытосеменных растений.

а – до 10 000 м.п.н.; б – от 15 000 до 150 000 м.п.н. По оси X – размер генома (1С в м.п.н.); по оси Y – частота. Данные взяты из: <http://data.kew.org/cvalues/cvalOrigReference.html> (по: Bennett, Leitch, 2011).

установлена в недавнем эволюционном прошлом у примерно половины изученных видов растений (Schranz *et al.*, 2012). Вторым источником вариации размера генома – амплификация последовательностей геномной ДНК. Помимо амплификации, в геноме могут происходить делеции как генов (особенно дублированных), так и повторяющихся некодирующих последовательностей, что может отражаться на размере генома. Например, геном *Arabidopsis thaliana* на примерно 50 % меньше генома близкородственного вида *A. lyrata*, хотя эти виды разошлись от общего предка сравнительно недавно – около 10 млн лет назад (Hu *et al.*, 2011). В этом случае различие в размере генома обусловлено множественными делециями в некодирующих межгенных районах, насыщенных мобильными элементами. Межвидовая гибридизация довольно часто сопровождается делециями ДНК (Ma, Gustafson, 2008). Изучая эволюцию размера генома в семействе Brassicaceae, ученые обна-

ружили 16-кратные различия среди 185 видов (Lysak *et al.*, 2009). Половина этих видов имели уменьшенный размер генома по сравнению с общим предком, несмотря на динамичные процессы, направленные на увеличение размера генома (транспозиции мобильных элементов и полиплоидизация). До сих пор не установлены общие закономерности и селекционные механизмы, которые лежат в основе вариации размера генома в ту или другую сторону в ходе эволюции растительных видов.

Большинство межвидовых различий в размере генома связаны с содержанием ПП ДНК, которое подвержено быстрым изменениям. У кукурузы существуют большие различия по размеру терминального гетерохроматина хромосом, состоящего из тандемных повторов (Laurie, Bennett, 1985). Большая вариация по содержанию гетерохроматина, отражающаяся на размере генома, наблюдается также у ржи *Secale cereale* ($2n = 14$), причем полиморфизм

затрагивает даже гомологичные хромосомы (Alkhimova *et al.*, 2004). При некоторых условиях повторяющиеся последовательности ДНК терминальных районов хромосом теряются в ходе митоза. Была показана ограниченная вариабельность размера генома у диплоидных и тетраплоидных видов пшеницы, обусловленная активностью ретроэлементов (Ozkan *et al.*, 2010). У льна обнаружены изменения числа копий генов рРНК в результате различных стрессовых воздействий (Cullis, 2005). У кукурузы количественные изменения затрагивают все концевые районы хромосом, в которых происходят интенсивные реорганизации (инсерции, дубликации и делеции) отдельных сегментов размером более 1 т.п.н. (Belo *et al.*, 2010). Такой полиморфизм, по видимому, имеет важное значение для популяций видов растений, для их адаптации, устойчивости к стрессу и гетерозиса (Biemont, 2008; Belo *et al.*, 2010).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурное разнообразие повторяющихся элементов растительного генома отражает его ускоренную эволюцию, в ходе которой происходили многократные раунды полиплоидизации, а также процессы массовой реорганизации геномной ДНК, включающие амплификацию и замещение мобильных элементов, рекомбинацию тандемных повторов теломерного гетерохроматина, быстрые количественные изменения генов рРНК и др. И хотя адаптивная значимость большинства механизмов генетической реорганизации, связанных с ПП ДНК, остается невыясненной, тем не менее ряд данных указывает на селекционное преимущество генотипов, генерирующих большее разнообразие в составе различных фракций ПП ДНК.

Работа выполнена в рамках проекта по фундаментальным научным исследованиям (тема № VI.53.1.5.) при поддержке гранта РФФИ (№ 14-04-00297).

ЛИТЕРАТУРА

- Сергеева Е.М., Салина Е.А. Мобильные элементы и эволюция генома растений // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2011. Т. 15. № 2. С. 382–397.
- Хемлебенб В., Беридзе Т.Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес П. Сателлитные ДНК // Усп. биол. химии. 2003. Т. 43. С. 267–306.
- Alkhimova O.G., Mazurok N.A., Potapova T.A., Zakian S.M. *et al.* Diverse patterns of the tandem repeats organization in rye chromosomes // Chromosoma. 2004. V. 113. P. 42–52.
- Anamthawat-Josson K., Heslop-Harrison J.S. Isolation and characterization of genome-specific DNA sequences in Triticeae species // Mol. Gen. Genet. 1993. V. 240. P. 151–158.
- 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. 1998. V. 95. P. 13073–13078.
- Appels R., Baum B.R., Clarke B.C. The 5S DNA units of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Plant Syst. Evol. 1992. V. 183. P. 183–194.
- Appels R., Dvořák J. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the Triticeae: Implications for the maintenance of homogeneity of a repeated gene family // Theor. Appl. Genet. 1982a. V. 63. P. 361–365.
- Appels R., Dvořák J. The wheat ribosomal DNA spacer region: Its structure and variation in populations and among species // Theor. Appl. Genet. 1982b. V. 63. P. 337–348.
- Appels R., Gerlach W.L., Dennis E.S. *et al.* Molecular and chromosomal organization of DNA sequences coding for the ribosomal RNAs in cereals // Chromosoma. 1980. V. 78. P. 293–311.
- Bedbrook J.H., Jones J., O'Del M. A molecular distribution of telomeric heterochromatin in *Secale* species // Cell. 1980. V. 19. P. 545–560.
- Belo A., Beatty M., Hondred D., Fengler K. *et al.* Allelic genome structural variations in maize detected by array comparative genome hybridization // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 120. P. 355–367.
- Bennett M., Leitch I.J. Nuclear DNA amounts in angiosperms: targets, trends and tomorrow // Ann. Bot. 2011. V. 107. P. 467–590.
- Bennetzen J.L. The contribution of retroelements to plant genome organization, function and evolution // Trends Microbiol. 1996. V. 4. P. 347–353.
- Biemont C. Genome size evolution: within-species variation in genome size // Heredity. 2008. V. 101. P. 297–298.
- Bureau T.E., Wessler S.R. *Tourist*: a large family of inverted-repeat elements frequently associated with maize genes // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 1283–1294.
- Bureau T.E., Wessler S.R. *Stowaway*: a new family of inverted-repeat elements associated with genes of both monocotyledonous and dicotyledonous plants // Plant Cell. 1994. V. 6. P. 907–916.
- Castilho A., Heslop-Harrison J.S. Physical mapping of 5S and 18S-25S rDNA and repetitive DNA sequences in *Aegilops umbellulata* // Genome. 1995. V. 38. P. 91–96.
- Charlesworth B., Sniegowski P., Stephan W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes // Nature. 1994. V. 371. P. 215–220.
- Copenhaver G.P., Pikaard C.S. RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4 // Plant J. 1996. V. 9. P. 259–272.

- Cox A.V., Bennett M.D., Dyer T.A. Specific 5S ribosomal RNA primers for plant species identification in admixtures // *Theor. Appl. Genet.* 1992. V. 83. P. 684.
- Cuadrado A., Jouve N. Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale* // *J. Hered.* 2002. V. 93. P. 339–345.
- Cullis C.A. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax // *Ann. Bot.* 2005. V. 95. P. 201–206.
- Daboussi M., Capy P. Transposable elements in filamentous fungi // *Annu. Rev. Microbiol.* 2003. V. 57. P. 275–299.
- Dvorák J., Luo M.C., Yang Z.L. Restriction fragment length polymorphism and divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing *Aegilops* species // *Genetics.* 1998. V. 148. P. 423–434.
- Feschotte C., Pritham E.J. DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes // *Annu. Rev. Genet.* 2007. V. 41. P. 331–368.
- Flavell R.B. Amplification, deletion and rearrangement: Major sources of variation during species divergence // *Genome Evolution* / Eds G.A. Dover, R.B. Flavell. London: Acad. Press, 1982.
- Flavell R.B. Repetitive DNA and chromosome evolution in plants // *Philos. T. R. Soc. Lon. B.* 1986. V. 312. P. 227–242.
- Flavell R.B., Bennett M.D., Smith J.B., Smith D.B. Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants // *Biochem. Genet.* 1974. V. 12. P. 257–269.
- Flavell R.B., O'Dell M. Ribosomal RNA genes on homologous chromosomes of groups 5 and 6 in hexaploid wheat // *Heredity.* 1976. V. 37. P. 372–385.
- Flavell A.J., Dunbar E., Anderson R. *et al.* Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 3639–3644.
- Frey M., Reinecke J., Grant S. *et al.* Excision of the *En/Spm* transposable element of *Zea mays* requires two element-encoded proteins // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 4037–4044.
- Gerlach W.L., Bedbrook J.R. Cloning and characterization of ribosomal RNA genes from wheat and barley // *Nucl. Acid Res.* 1979. V. 7. P. 1869–1885.
- Gerlach W.L., Dyer T.A. Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. P. 4851–4865.
- Heslop-Harrison J.S. Comparative genome organization in plants: from sequence and markers to chromatin and chromosomes // *Plant Cell.* 2000. V. 12. P. 617–636.
- Hu T.T., Pattyn P., Bakker E.G., Cao J. *et al.* The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change // *Nat. Genet.* 2011. V. 43. P. 476–481.
- Jurka J., Kapitonov V.V. PIFs meet *Tourists* and *Harbingers*: a superfamily reunion // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 12315–12316.
- Kajikawa M., Okada N. *LINEs* mobilize *SINEs* in the eel through a shared 3' sequence // *Cell.* 2002. V. 111. P. 433–444.
- Kapitonov V., Jurka J. Rolling-circle transposons in eukaryotes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 8714–8719.
- Kilian A., Kleinhofs A. Cloning and mapping of telomere-associated sequences from *Hordeum vulgare* L. // *Mol. Gen. Genet.* 1992. V. 235. P. 153–156.
- Kishii M., Tsujimoto H. Genus-specific localization of the *Tail* family of tandem-repetitive sequences in either the centromeric or subtelomeric regions in Triticeae species (Poaceae) and its evolution in wheat // *Genome.* 2002. V. 45. P. 946–955.
- Kit S. Equilibrium sedimentation in density gradients of DNA preparations from animal tissues // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 711–716.
- Kramerov D., Vassetzky N. Short retrotransposons in eukaryotic genomes // *Int. Rev. Cytol.* 2005. V. 247. P. 165–221.
- Kubis S.E., Schmidt, T., Heslop-Harrison J.S. Repetitive DNA elements as a major component of plant genomes // *Ann. Bot.* 1998. V. 82. P. P. 45–55.
- Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // *Annu. Rev. Genet.* 1999. V. 33. P. 479–532.
- Laurie D.A., Bennett M.D. Nuclear DNA content in the genera *Zea* and *Sorghum*. Intergeneric, interspecific and intraspecific variation // *Heredity.* 1985. V. 55. P. 307–313.
- Leitch I.J., Beaulieu J.M., Cheung K., Hanson L. *et al.* Punctuated genome size evolution in Liliaceae // *J. Evol. Biol.* 2007. V. 20. P. 2296–2308.
- Linares C., Ferrer E., Fominaya A. Discrimination of the closely related A and D genomes of the hexaploid oat *Avena sativa* L. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 12450–12455.
- Lysak M.A., Koch M.A., Beaulieu J.M., Meister A., Leitch I.J. The dynamic ups and downs of genome size evolution in Brassicaceae // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. P. 85–98.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in Triticale // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. P. 825–832.
- McIntyre C.L., Pereira S., Moran L.B., Appels R. New *Secale cereale* (rye) DNA derivatives for the detection of rye chromosome segments in wheat // *Genome.* 1990. V. 33. P. 635–640.
- Ming R., Hou S., Feng Y. *et al.* The draft genome of the transgenic tropical fruit tree papaya (*Carica papaya* L.) // *Nature.* 2008. V. 452. P. 991–996.
- Mitra R., Bhatia C.R. Repeated DNA sequences and polyploidy in cereal crops // *DNA Systematics. V. II. Plants* / Ed. S.K. Dutta. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1986. P. 21–43.
- Murata M., Heslop-Harrison J.S., Motoyoshi F. Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones // *Plant J.* 1997. V. 12. P. 31–37.
- Nagaki K., Tsujimoto H., Isono K., Sasakuma T. Molecular characterization of a tandem repeat, *Afa* family, and its distribution among Triticeae // *Genome.* 1995. V. 38. P. 479–486.
- Nagaki K., Tsujimoto H., Sasakuma T.H. Genome specific repetitive sequence, *pEt2*, of *Elimus trachycaulus* in part of *Afa* family of Triticeae // *Genome.* 1998. V. 41. P. 134–136.
- Navratilova A., Koblizkova A., Macas J. Survey of extrachromosomal circular DNA derived from plant satellite repeats // *BMC Plant Biol.* 2008. V. 8. P. 90.
- Ozkan H., Tuna M., Kilian B., Mori N., Ohta S. Genome size variation in diploid and tetraploid wild wheats // *AoB Plants.* 2010. doi: 10.1093/aobpla/plq015.

- Paillard S., Schnurbusch T., Winzeler M., Messmer M. *et al.* An integrative genetic linkage map of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 107. P. 1235–1242.
- Paux E., Roger D., Badaeva E., Gay G. *et al.* Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B // *Plant J.* 2006. V. 48. P. 463–474.
- Pestsova E., Ganal M.W., Rüdger M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat // *Genome.* 2000a. V. 43. P. 689–697.
- Poulter R., Goodwin T. *DIRS 1* and the other tyrosine recombinase retrotransposons // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 575–588.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarosa* // *Plant Mol. Biol.* 1986. V. 4. P. 102–109.
- Reeder R.H. Enhancers and ribosomal gene spacers // *Cell.* 1984. V. 38. P. 349–351.
- Rubin E., Lithwick G., Levy A.A. Structure and evolution of the *hAT* transposon superfamily // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 949–957.
- Sabot F., Schulman A.H. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome // *Heredity.* 2006. V. 97. P. 381–388.
- Salina E.A., Adonina I.G., Vatolina T.Yu., Kurata N.A. Comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species // *Genetica.* 2004. V. 122. P. 227–237.
- Salina E.A., Lim Y.K., 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.* 2006. V. 49. P. 1023–1035.
- Salina E.A., Pestsova E.G., Adonina I.G., Vershinin A.V. Identification of a new family of tandem repeats in Triticeae genomes // *Euphytica.* 1998. V. 100. P. 231–237.
- SanMiguel P., Gaut B.S., Tikhonov A., Nakajima Y., Bennetzen J.L. The paleontology of intergene retrotransposons in maize // *Nature Genet.* 1998. V. 20. P. 43–45.
- SanMiguel P., Tikhonov A., Jin Y.K. *et al.* Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome // *Science.* 1996. V. 274. P. 765–768.
- Schmidt T., Heslop-Harrison J.S. Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 195–199.
- Schranz M.E., Mohammadin S., Edger P.P. Ancient whole genome duplications, novelty and diversification: the WGD Radiation Lag-Time Model // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2012. V. 15. P. 147–153.
- Sharma S., Raina S.N. Organization and evolution of highly repeated satellite DNA sequences in plant chromosomes // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 109. P. 15–26.
- Somers D.J., Isaac P., Edwards K. *et al.* A high-density wheat microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1105–1114.
- Suoniemi A., Tanskanen J., Schulman A.H. Gypsy-like retrotransposons are widespread in the plant kingdom // *Plant J.* 1998. V. 13. P. 699–705.
- Sýkorová E., Lim K.Y., Kunická Z., Chase M.W. *et al.* Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales // *Proc. Biol. Sci.* 2003. V. 270. P. 1893–1904.
- Vershinin A.V., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.S. The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes // *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1823–1833.
- Vicient C.M., Kalendar R., Anamthawat-Jonsson K., Schulman A.H. Structure, functionality, and evolution of the *BARE 1* retrotransposon of barley // *Genetica.* 1999. V. 107. P. 53–63.
- Vicient C.M., Kalendar R., Schulman A.H. Envelope-class retrovirus-like elements are widespread, transcribed and spliced, and insertionally polymorphic in plants // *Genome Res.* 2001. V. 11. P. 2041–2049.
- Vincentz M., Flavell R. Mapping of ribosomal RNA transcripts in wheat // *Plant Cell.* 1989. V. 1. P. 579–589.
- Vitte C., Bennetzen J.L. Analysis of retrotransposon structural diversity uncovers properties and propensities in angiosperm genome evolution // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 17638–17643.
- Vitte C., Panaud O. LTR retrotransposons and flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model // *Cytogenet. Genome Res.* 2005. V. 110. P. 91–107.
- Voytas D.F., Cummings M.P., Konieczny A.K. *et al.* Copia-like retrotransposons are ubiquitous among plant // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992. V. 89. P. 7124–7128.
- Wicker T., Guyot R., Yahiaoui N., Keller B. *CACTA* transposons in Triticeae. A diverse family of high-copy repetitive elements // *Plant Physiol.* 2003. V. 132. P. 52–63.
- Wicker T., Sabot F., Hua-Van A., Bennetzen J.L. *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 973–982.
- Xu L., Chen H., Hu X., Zhang R. *et al.* Average gene length is highly conserved in prokaryotes and eukaryotes and diverges only between the two kingdoms // *Mol. Biol. Evol.* 2006. V. 23. P. 1107–1108.
- Zhang P., Friebe B., Gill B.S. Variation in the distribution of a genome-specific DNA sequences on chromosomes reveals evolutionary relations in the *Triticum* and *Aegilops* complex // *Plant Syst. Evol.* 2002. V. 235. P. 169–179.
- Zupunski V., Gubensek F., Kordis D. Evolutionary dynamics and evolutionary history in the *RTE* clade of non-LTR retrotransposons // *Mol. Biol. Evol.* 2001. V. 18. P. 1849–1863.

REPETITIVE DNA SEQUENCES IN THE GENOMES OF PLANTS

A.B. Shcherban

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

Summary

The main classes of repetitive DNA sequences, including coding (rRNA genes) and non-coding sequences (tandem and dispersed repeats) are characterized. Emphasis is placed on their special role in the formation of the structural and functional organization of the genomes of higher plants and in the support of their higher genetic variation, as compared to animal genomes, at the levels of individual sequences and of the whole genome.

Key words: higher plants, repetitive DNA sequences, rRNA genes, tandem repeat, mobile element.

УДК 576.354.4:575.222.73

ИНТРОГРЕССИЯ ХРОМАТИНА РЖИ В ГЕНОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2014 г. О.Г. Силкова¹, Д.Б. Логинова¹, Ю.Н. Иванова (Кабаненко)¹,
Е.Б. Бондаревич², Л.А. Соловей², Т.И. Штык², Н.И. Дубовец²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: silkova@bionet.nsc.ru;

² Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: nadezhdadubovets@gmail.com

Поступила в редакцию 26 сентября 2014 г. Принята к публикации 20 октября 2014 г.

Интрогрессия чужеродного хроматина в геном мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. является наиболее эффективным способом обогащения генофонда этой культуры. Для повышения селекционно ценных свойств пшеницы в качестве источника признаков используется рожь *Secale cereale* L. Передача генетического материала ржи имеет свои особенности. Объединение геномов двух злаков в одном ядре приводит к дисбалансу в работе всех генетических систем. Формирование новых интрогрессивных форм начинается с восстановления фертильности амфигаплоидов, а затем сопровождается реорганизацией гибридного генома, во время которой достигается цитологическая и генетическая стабильность у диплоидных потомков. В данной работе собраны и проанализированы результаты, полученные при изучении двух этапов реорганизации пшенично-ржаного генома: 1) преодоление стерильности гибридов F₁ (цитогенетические механизмы образования нередуцированных гамет); 2) реорганизация субгеномов пшеницы при интрогрессии единичных хромосом ржи.

Ключевые слова: пшенично-ржаные гибриды, цитогенетика, FISH, иммуноокрашивание, C-окрашивание, реорганизация геномов, мейотическая реституция, модификация хромосом.

ВВЕДЕНИЕ

История интрогрессии генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы насчитывает более 100 лет. В 1891 г. немецким селекционером Rimpau было описано 12 растений, выращенных из завязавшихся зерновок на полученном им пшенично-ржаном гибриде, которые принято считать первыми тритикале (*× Triticosecale* Wittmack) (Rimpau, 1891). Спонтанные тритикале с высокой плодовитостью были обнаружены в конце 1920-х годов в Саратове в богатом материале пшенично-ржаных гибридов. Растения имели «промежуточные» признаки и описаны Г.К. Мейстером как новый ботанический вид «*Triticum Secalotriticum saratoviense* Meister» (Левитский, 1978а). Ци-

тологический анализ тритикале, созданных в России и Германии, показал, что соматический набор хромосом растений равен 56 (Мюнтцинг, 1963; Левитский, 1978б). Таким образом, геном новой культуры объединил геномы пшеницы и ржи AABBDDRR.

Тритикале оказались привлекательным объектом для селекционеров благодаря повышенному иммунитету к фитопатогенам, устойчивости к неблагоприятным факторам среды и более высоким продуктивным качествам. Однако новая культура была несовершенна из-за своей низкой озерненности и фенотипической неоднородности (Писарев, 1964). Были предприняты попытки в получении более перспективных форм, которыми оказались гексаплоидные тритикале, в результате чего достигнуты определенные

успехи. Первичные гексаплоидные тритикале с геномным составом AABBRR создавались путем скрещивания тетраплоидных видов пшениц (*T. turgidum* L., *T. durum*) с рожью *S. cereale* L. Однако они характеризовались низкой озерненностью, щуплостью зерен, поздними сроками созревания. Для улучшения этих агрономически важных признаков для зерновой культуры расширялся генофонд тритикале: в скрещивания вовлекались октоплоидные формы и сорта мягкой пшеницы. Вторичные гексаплоидные формы имели улучшенные агрономические характеристики и получили широкое использование в качестве новой сельскохозяйственной культуры. Именно этот тип плоидности имеют все созданные к настоящему времени коммерческие сорта, возделываемые в Польше, Беларуси, Германии, Франции, Австралии, Китае (Mergoum *et al.*, 2009). Геномный состав тритикале характеризуется D(A), D(B) и D(R) замещениями либо транслокациями, которые влияют на повышение качества хозяйственно ценных признаков (Дубовец и др., 1995; Леонова и др., 2005; Mergoum *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012).

Поиск причин пониженной плодовитости первичных октоплоидных и гексаплоидных тритикале и фенотипической неоднородности их популяций способствовал началу изучения цитогенетики пшенично-ржаных гибридов в разных странах (Хвостова и др., 1972; Weimarck, 1974; Шкутина, 1977; Shchapova *et al.*, 1984; Щапова, Кравцова, 1990). Цитологические исследования показали, что растения, имеющие отличия по фенотипу, чаще всего являются анеуплоидами. В популяциях тритикале с низкой озерненностью также обнаружены анеуплоиды с числом хромосом от 54 до 58, что могло быть вызвано мейотической нестабильностью. Ранее цитологические исследования, проводимые в Саратове в 1930-х годах, показали нарушения мейоза у всех имевшихся в то время константных тритикале (Левитский, 1978б). В лаборатории цитогенетики ИЦиГ СО АН СССР (1963–1975) был проведен детальный анализ мейоза у *Triticale* ($2n = 42$ и $2n = 56$) (Шкутина, 1977) и неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов ($2n = 56$) (Хвостова и др., 1972). У всех изученных форм была нарушена конъюгация хромосом. Униваленты являлись

результатом десинапсиса, что было выяснено при изучении диакинеза, во время которого происходило преждевременное исчезновение хиазм между бивалентами.

Таким образом, при введении генетического материала ржи в культурные сорта пшеницы путем добавления целых геномов к полному хромосомному набору не были получены ожидаемые результаты. Отсутствие генетической и цитологической стабильности у первичных октоплоидных и гексаплоидных амфидиплоидов и связанная с этим невозможность получить ожидаемые результаты от новой зерновой культуры вызвали развитие нового направления в хромосомной инженерии пшеницы. Был взят курс на получение форм пшеницы с небольшим количеством генетического материала ржи: пшенично-ржаных дополненных, замещенных, транслоцированных линий (Голубовская, 1971; Щапова, Кравцова, 1990; Першина, 2014). Эти работы внесли большой вклад в генетику пшеницы и в разработку единой номенклатуры хромосом в подтрибе *Triticeae* (Sears, 1952, 1954), однако линии не использовались непосредственно в селекции по тем же причинам, что и амфидиплоиды. Успех многочисленных сортов со спонтанно включенными транслокациями 1RS.1BL и 1RS.1AL (Lukaszewski, 1990; Villareal *et al.*, 1998; Mater *et al.*, 2004) не был повторен. Линии пшеницы с чужеродной интрогрессией в виде замещений и модификаций хромосом стали включать в селекционные программы в качестве промежуточных форм.

Ранее на основе большого количества данных, полученных в экспериментах Г.Д. Карпеченко было показано, что «для того, чтобы гамета была способной к участию воспроизведения потомства, или зигота была способна к развитию, они должны обладать не только определенной цитологической, но и генетической конституцией» (Карпеченко, 1971. С. 82). Эти выводы впоследствии получили подтверждение. С появлением новых методов и подходов в изучении геномов растений тритикале как эволюционно «молодая» культура, родительские формы которой имеются в доступном пользовании, является значимым объектом исследования эволюционных механизмов видообразования (Voylovkov, Tikhenko, 2002). Стали доступны знания о механизмах

реорганизации и стабилизации гибридных геномов (Дубовец и др., 2008; Ma, Gustafson, 2008). После объединения в одном ядре геномов пшеницы и ржи происходят генетические и эпигенетические изменения. Однако они идут интенсивнее и быстрее, чем у других аллополиплоидов, в основном это касается генома ржи, что, в первую очередь, приводит к элиминации последовательностей ДНК (Ma *et al.*, 2004; Ma, Gustafson, 2006). Существует немного информации о природе изменений генома, которые требуются для успешного видообразования посредством аллополиплоидии. В особенности это касается механизмов, с помощью которых несколько геномов добиваются гармоничного сосуществования в одном и том же ядре (генетическая диплоидизация), и механизмов, вызывающих быструю дифференциацию гомеологичных хромосом, при которой отсутствует возможность для спаривания в мейозе и рекомбинации (цитологическая диплоидизация). Механизмы генетической диплоидизации способны запускать генный сайленсинг в основном через метилирование ДНК, элиминацию удвоенных генов или активацию генов, которые обычно молчат на диплоидном уровне, а цитологическая диплоидизация может включать элиминацию последовательностей ДНК, которая, возможно, вовлечена в поиск гомологов и инициацию спаривания в мейозе (Feldman, Levy, 2005; Ma, Gustafson, 2005).

Несмотря на трудности в передаче хромосом ржи в геном пшеницы, большой потенциал генетической изменчивости этого вида остается востребованным. На сегодняшний день накоплен значительный опыт по созданию разнообразных по геномному составу интрогрессивных пшенично-ржаных форм, однако для получения новых ценных форм пшеницы с чужеродным хроматином необходимо продолжение исследований по изучению механизмов реорганизации гибридного генома. В настоящей работе представлены и проанализированы данные, касающиеся реорганизации гибридных геномов на первом и последнем этапах интрогрессии хромосом ржи в геном пшеницы: 1) восстановление фертильности гибридов первого поколения (анализ мейотических механизмов образования нередуцированных гамет)

и 2) реорганизация субгеномов пшеницы при интрогрессии единичных хромосом ржи.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИГАПЛОИДОВ: МЕЙОТИЧЕСКАЯ РЕСТИТУЦИЯ

Преодоление стерильности гибридов F_1 является главным барьером включения хромосом ржи в геном пшеницы на начальном этапе. Для безошибочного распределения хромосом в мейозе необходимо наличие пары гомологов, в то время как у гибридов первого поколения, геном которых образуется из нескольких гаплоидных геномов, мейоз проходит с многочисленными нарушениями, что и вызывает стерильность. Несмотря на это у амфигаплоидов (межродовой гибрид F_1 , $4x = 28$, геномная формула ABDR) иногда завязываются зерна при самоопылении. Жизнеспособность гаметам обеспечивает однократное деление унивалентных хромосом на сестринские хроматиды в первом или втором делении мейоза (Силкова и др., 2011). Такие гаметы обеспечивают частичную фертильность и образование полиплоидного организма, амфидиплоида ($2x = 56$, AABBDDRR). Процесс, который приводит к формированию нередуцированных гамет, называется мейотической реституцией. Этот феномен вызвал интерес исследователей к изучению механизмов мейоза, приводящих к нередукции числа хромосом в гаметах.

РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ПОВЕДЕНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЦИТАХ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИГАПЛОИДОВ

Ранее проведенные исследования выявили аномалии мейоза, связанные с мейотической реституцией у амфигаплоидов в подтрибе Triticeae. Они вызывали блокирование либо первого, либо второго мейотического деления (Силкова и др., 2011). В первом случае в M1 сестринские кинетохоры ориентируются биплярно, но когезия между сестринскими центромерами сохраняется до AII (Cai *et al.*, 2010), это является причиной нерасхождения хромосом в AI и образования диад в конце мейоза. Такой

тип поведения хромосом был назван реституцией в первом делении (first-division restitution, FDR) (Xu, Joppa, 1995), затем единственным делением мейоза (single division meiosis, SDM) (Matsuoka, Nasuda, 2004) и недавно описан как нередукционное мейотическое деление (unreductional meiotic cell division, UMCD) (Cai *et al.*, 2010). Во втором случае сестринские хроматиды унивалентных хромосом расходятся в AI, второе деление блокируется, диады образуются как конечный продукт мейоза (Aase, 1930; Maan, Sasakuma, 1977; Щапова и др., 1987; Силкова и др., 2003; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Olesczuk, Lukaszewski, 2014).

Однако с 1968 г. сохраняется приоритет за одним цитологическим механизмом мейотической реституции – FDR, SDM, UMCD (Wagenaar, 1968; Islam, Shepherd, 1980; Xu, Joppa, 1995; Matsuoka, Nasuda, 2004; Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). Поведение хромосом описывается как «аномальная пролонгация метафазы I», в течение которой униваленты, первоначально разбросанные по клетке, постепенно меняя ориентацию с униполярной на биполярную, собираются на экваторе. Затем первое деление блокируется, а второе протекает нормально, в завершение его образуются диады. Предполагается, что причиной блокирования первого деления является коллапс веретена деления (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). При использовании в качестве маркера антител pHSer10H3 (фосфорилирование гистона H3 на остатках Ser10), которые имеют различную локализацию на хромосомах в первом и втором делениях мейоза, было показано, что расхождение унивалентных хроматид происходит именно в AII (Matsuoka *et al.*, 2013). Таким образом, до сих пор преобладает мнение о невозможности образования реституционных ядер после эквационного деления унивалентных в AI, так как после биполярной ориентации хромосом происходит коллапс сформированного веретена, следовательно, деление и расхождение сестринских хроматид возможны только во втором делении мейоза.

Образование гамет с соматическим числом хромосом у межвидовых и межродовых гибридов в трибе Triticeae – не случайный процесс, он контролируется действием и/или взаимодействием генов родительских видов (Wagenaar,

1968; Щапова и др., 1987; Xu, Joppa, 1995; Силкова и др., 2003; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). С целью определения хромосомного контроля FDR были получены гибриды в результате скрещивания 14 линий тетраплоидной пшеницы сорта Langdon, в геноме которых пара хромосом D-генома замещала гомеологи A или B геномов, с рожью сорта Gazelle и *Ae. squarrosa* L. (Xu, Joppa, 2000). На основании полученных результатов было показано, что хромосома 4A T. durum сорта Langdon, вероятно, несет ген, регулирующий высокую частоту образования FDR, а хромосомы 3A и 6A могут нести гены, контролирующие прохождение второго деления после FDR у гибридов, полученных от скрещивания с рожью. Показано также, что у гибрида линии 1D(1A) с *Ae. squarrosa* L. в первом делении мейоза наблюдалось эквационное деление хромосом с высокой частотой.

У отдаленных гибридов показана высокая вариабельность в поведении хромосом. Выявлены различия по характеристикам микроспорогенеза между растениями (Islam, Shepherd, 1980; Xu, Joppa, 1995, 2000; Силкова и др., 2003), а также индивидуальными колосьями одного растения, и пыльникам в пределах одного колоса (Силкова и др., 2003). В связи с этим многочисленность разнообразных аномалий вызывает трудности в понимании регуляции мейоза и выявлении закономерностей в поведении хромосом у амфигаплоидов.

Результаты работы по изучению мейоза у амфигаплоидов, полученных путем скрещивания с рожью мягкой пшеницы и пшенично-ржаных замещенных линий 1R(1A), 1Rv(1A), 2R(2D)₁, 2R(2D)₂, 2R(2D)₃, 5R(5D), 5R(5A), 6R(6A) (Щапова, Кравцова, 1990; Силкова и др., 2006; Силкова и др., 2007), показали, что объединение четырех гаплоидных геномов ABDR приводит к двум типам мейотического цикла (Silkova *et al.*, 2011) – это двухступенчатое деление, подобное мейозу, и одноступенчатое, с блокированием первого или второго делений (рис. 1). В результате последнего типа деления образуются функциональные нередуцированные гаметы. Эти данные выявили зависимость паттерна мейотического цикла от типа расхождения унивалентных хромосом. Следствием случайного распределения хромосом к полюсам (пар сестринских хроматид, соединенных в районе

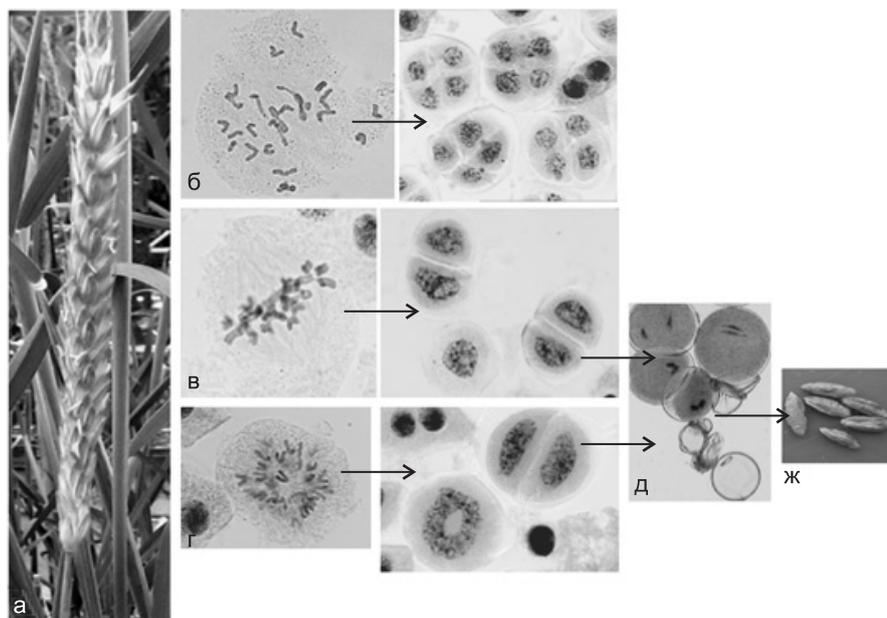


Рис. 1. Типы деления хромосом в мейоцитах пшенично-ржаных гибридов с полигаплоидным геномом ABDR. а – колос гибрида F_1 ; б – редуционный тип деления; в – эквационный тип деления; г – блокирование первого деления; д – фертильная пыльца; ж – гибридные зерна.

центромеры, редуционный тип расхождения) являются прохождением второго деления и образование стерильной пыльцы (рис. 1, б).

Разделение унивалентных хромосом на сестринские хроматиды и распределение последних к полюсам в первом делении мейоза (эквационный тип расхождения) (рис. 1, в) блокируют второе деление, и образуются диады (нередуцированные микроспоры), которые формируют фертильную пыльцу (рис. 1, д). Блокирование первого деления с характерным радиальным расположением хромосом (рис. 1, г) завершается вторым делением, в результате чего также

образуются нередуцированные микроспоры. Вследствие этого у частично фертильных гибридов на стадии телофазы II преобладают диады (рис. 1, в, г).

Расхождение хромосом в мейоцитах, фенотипически схожих с «пролонгирующей метафазой I», классифицировано как самостоятельный тип деления – эквационно-редуционный (рис. 2). Такой тип поведения хромосом завершился вторым делением мейоза с многочисленными нарушениями.

Выявленные паттерны мейоза у амфигаплоидов ABDR генетически регулируются. Заме-

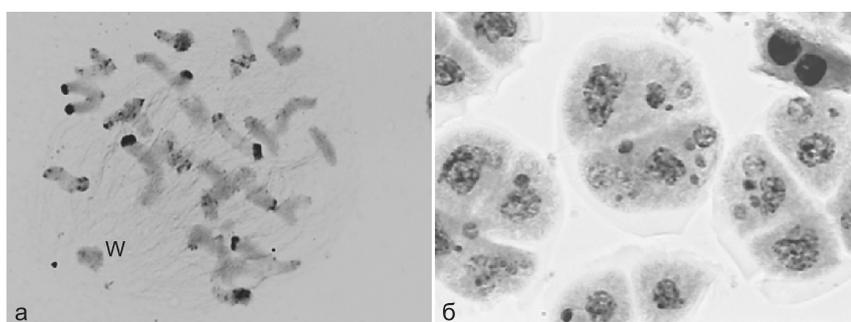


Рис. 2. Эквационно+редуционный тип деления хромосом.

а – метафаза I (С-бэндинг); б – микроспоры с микродрамами (ацетокармин).

щение 2R/2D контролирует деление, подобное мейозу, а замещения 5R/5D, 6R/6A и 1Rv/1A – одноступенчатое деление и образование нередуцированных гамет (Silkova *et al.*, 2011).

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ХРОМОСОМ, ПОДОБНОГО МИТОЗУ, В МЕЙОЦИТАХ ГИБРИДОВ: СПАРИВАНИЕ ХРОМОСОМ И СТРУКТУРА ЦЕНТРОМЕРНОГО РАЙОНА

Спаривание хромосом в профазе мейоза является ключевым событием для их рекомбинации и последующего правильного расхождения. Возможность образования бивалентов в мейозе пшенично-ржаных гибридов F₁ исключается из-за отсутствия гомологов и супрессии спаривания между негомологами системой генов *Ph* (*pairing homoeologous*) (Sears, 1976), однако в некоторых случаях формируются гомеологичные и гетерологичные биваленты (Miller *et al.*, 1994; Benavente *et al.*, 1996).

Ранее исследователями отмечалось, что одной из особенностей регуляции мейоза,

подобного митозу (эквационный тип деления и расхождения хромосом в анафазе I, блокирование второго деления и формирование нередуцированных гамет), является почти полное отсутствие образования бивалентов (Maan, Sasakuma, 1977; Щапова и др., 1987; Ху, Jorpa, 1995, 2000). Нами изучен характер образования бивалентов в мейоцитах с различным поведением хромосом (Silkova *et al.*, 2013). Геномный состав гибридов F₁ (замещенные линии × рожь *S. cereale* L.) гарантирует присутствие пары ржаных гомологов в геноме каждого из гибридов и образование ими бивалента; в генотипе гибридного материала присутствовали локусы *Ph*. Разделение унивалентов по центромерам имело место в мейоцитах двух типов: с эквационным и эквационно+редукционным делением, а формирование бивалентов в мейоцитах одного и того же генотипа зависело от типа деления унивалентных хромосом (рис. 3).

В мейоцитах с делением по типу мейоза биваленты образовывались значительно чаще, в то время как в мейоцитах с делением по типу митоза биваленты были единичны или отсутствовали (рис. 3, а). Среди последних

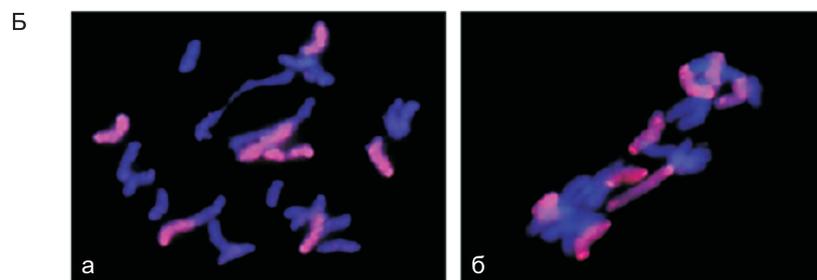
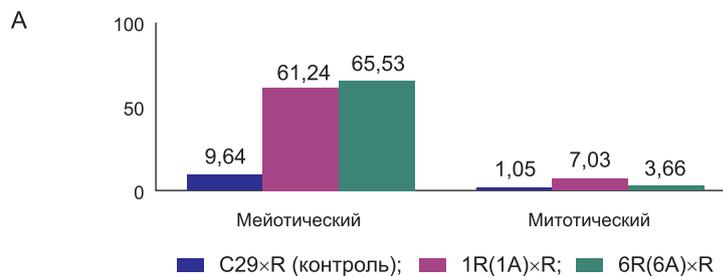


Рис. 3. Характер спаривания хромосом в мейозе амфигиплоидов.

А – процент клеток с бивалентами среди мейоцитов с мейотическим и митотическим паттернами мейоза у гибридов F₁ C29×R, 1Rv(1A)×R и 6R(6A)×R. Б – поведение хромосом в метафазе I в мейоцитах с делением по типу мейоза (а) и митоза (б): а – образование бивалентов хромосомами пшеницы и ржи (биваленты указаны стрелками); б – 8 унивалентных хромосом ржи, включая гомологи 1R1R. Геномная *in situ* гибридизация (хромосомы ржи окрашены красным).

обнаружено более 90 % мейоцитов без бивалентов. Гомологи ржи в этом случае также не формировали биваленты (рис. 3, Б, б).

Так как центромерный район играет ключевую роль в ориентации, делении и расхождении хромосом, нами была изучена структура центромеры в мейозе частично фертильных пшенично-ржаных амфигаплоидов ABDR ($4x = 28$) с использованием центромероспецифичных проб рAWRC1 и *Ae. tauschii* рAet 6-09 (Логонова, Силкова, 2014). Сравнительный анализ паттернов локализации проб в митозе, нормальном мейозе у пшеницы *T. aestivum* L. и ржи *S. cereale* L. и в мейозе амфигаплоидов выявил различия в структуре центромер у монополярно и биполярно ориентированных хромосом (рис. 4).

В первом делении мейоза гибридизационные сайты наблюдались в виде плотных точек на первичных перетяжках хромосом в диплотене и метафазе (рис. 4, А, а), а в митозе и втором делении мейоза сайты выглядели как натянутые бэнды с диффузной структурой, расположенные поперек центромерного района (рис. 4, А, б).

Эти данные были экстраполированы на характер локализации повтора рAet6-09 в мейозе пшенично-ржаных амфигаплоидов. Было выявлено три типа мейоцитов, отличающихся по характеру распределения сигналов гибридизации на центромерах (рис. 4, Б, В): 1) в М1 сайты гибридизации на всех хромосомах имели вид плотных точечных сигналов (рис. 4, Б, б). Такая организация центромер отражает монополярную ориентацию сестринских кинетохоров в мейоцитах с редукционным типом деления; 2) в М1 одни хромосомы имели точечные, а другие – растянутые диффузные сигналы гибридизации (рис. 4, Б, а). Мейоциты данного типа соответствовали мейоцитам с эквационно+редукционным типом деления; 3) почти все хромосомы, за исключением 1–3, располагаясь в эквационной плоскости, имели натянутые диффузные сигналы гибридизации в мейоцитах эквационного типа деления (рис. 4, В, а). Хромосомы в А1 делились на сестринские хроматиды, которые расходились к противоположным полюсам (рис. 4, В). Следовательно, паттерны локализации рAet6-09 предполагают структурные и функциональные особенности центромерных районов в мейозе пшенично-

ржаных амфигаплоидов, это отражает особую регуляцию поведения хромосом во время эквационного деления.

Похожие результаты получены при сравнительном анализе поведения хромосом в А1 мейоза пшенично-ржаных гибридов с использованием мутантов пшеницы Chinese spring по локусам *Ph1* и *Ph2* (Aragon-Alcaide *et al.*, 1997). Диффузные сигналы гибридизации центромероспецифичной пробы CCS1 обнаружены у хромосом с биполярной ориентацией и последующим делением их на хроматиды. Однако такие хромосомы присутствовали только в мейоцитах гибридов с высоким уровнем спаривания (отсутствие локуса *Ph1*). Полагается, что диффузные сигналы гибридизации CCS1 отражают особенности в структуре центромерного хроматина в генотипах с отсутствием *Ph1*. Наши данные не подтверждают эти выводы. Влияние на частоту формирования бивалентов оказывал тип расхождения хромосом при наличии *Ph1*, так же, как и на характер локализации сигналов гибридизации пробы рAet6-09 (плотные точечные либо диффузные натянутые). Следовательно, формирование структуры центромерного района – это сложно регулируемый процесс, особенно в мейозе амфигаплоидов, на который не может влиять только локус *Ph1*.

Таким образом, нами получены дополнительные доказательства того, что в археспориальных клетках пыльника амфигаплоидов возможна модификация регуляции клеточного цикла при запуске или во время мейотического деления, в котором мы наблюдали характерные для митоза признаки: отсутствие бивалентов и особую структуру центромерного района.

ФОРМИРОВАНИЕ ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ В МЕЙОЦИТАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ РЕСТИТУЦИИ

В настоящее время нет окончательно сформированного представления об образовании веретена деления в мейозе, когда образуются нередуцированные микроспоры. Биполярное веретено в мейоцитах с эквационным делением унивалентных хромосом в анафазе I описано, однако авторы полагают, что такое веретено нефункционально, впоследствии в

MI-AI претерпевает коллапс, в результате чего блокируется первое деление мейоза (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). Причины этого не найдены. В нашем эксперименте в мейоцитах

с делением, подобным митозу, образовывалось дивергентное веретено, а унивалентные хромосомы располагались на экваторе, ориентируясь биполярно (рис. 5, а).

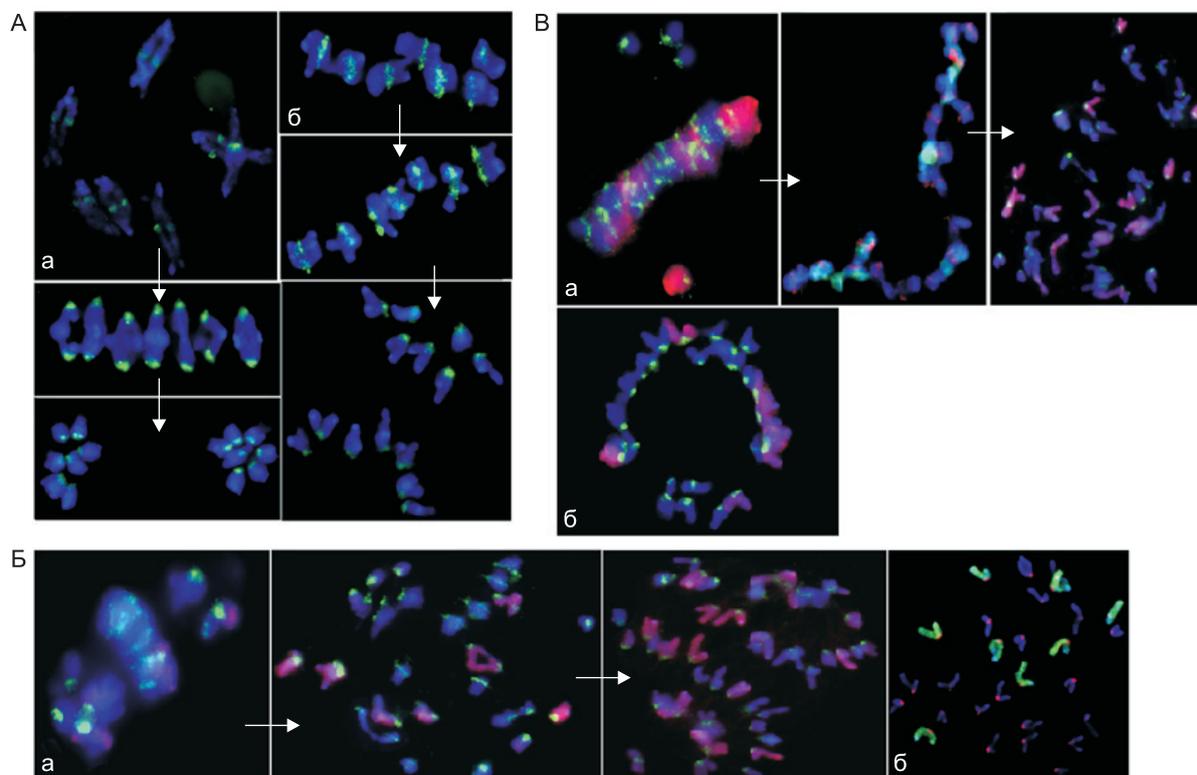


Рис. 4. Локализация центромероспецифичной пробы pAet6-09.

А – мейоз ржи, норма: а – первое деление; б – второе деление; Б – мейоз у стерильных амфигиплоидов: а – эквационно+редукционный тип деления; б – редукционный тип деления; В – мейоз у частично фертильных амфигиплоидов: а – эквационный тип деления; б – блокирование первого деления. Центромеры окрашены зеленым, хромосомы ржи – красным. Б, б – хромосомы ржи окрашены зеленым, центромеры – красным.

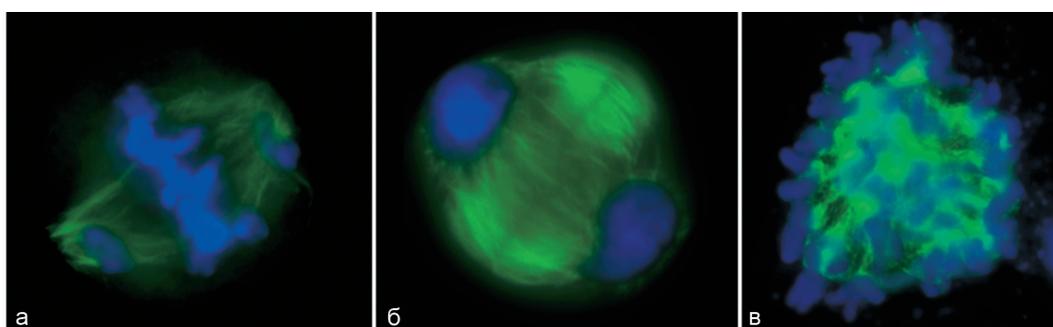


Рис. 5. Образование веретена деления в микроспорогенезе с мейотической реституцией.

а – биполярное дивергентное веретено в MI, хромосомы расположены на экваторе; б – образование фрагмопласта в телофазе I; равные группы хромосом у полюсов; в – монополярное веретено в MI, хромосомы ориентированы центромерами к одному полюсу. Иммуноокрашивание, синим окрашены хромосомы, зеленым – веретено.

Первое деление проходило без аномалий, веретено перемещало к полюсам сестринские хроматиды, в результате чего образовывались равные по величине телофазные группы (рис. 5, б). У частично фертильных гибридов присутствовали также мейоциты с радиальным расположением хромосом (рис. 1, г), что блокировало первое деление. Иммуноокрашивание на α -тубулин показало, что в таких случаях микротрубочки формируют монополярное веретено с полюсом в центре группы хромосом (моноастральное веретено) (рис. 5, в). Точечные сигналы гибридизации центромероспецифичного повтора рAet6-09 на хромосомах, расположенных таким образом (рис. 4, В, б), дают дополнительное доказательство их монополярной ориентации. Однако общепризнано, что монополярные веретена не характерны для растений, а такие картины возможны из-за раздавливания мейоцита по направлению от полюсов к экватору клетки. Существует и мнение, что вследствие коллапса биполярного веретена таким образом блокируется первое деление (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013).

Расположение хромосом по кругу, подобное таковому у пшенично-ржаных гибридов, описано у мутантов дрозофилы *mgr*, *polo*, *aurora*. Показано, что такое поведение хромосом возможно благодаря образованию именно монополярного веретена (Gonzalez *et al.*, 1998).

Таким образом, мы предполагаем, что экстремальные условия гибридного полигаплоидного генома вскрывают возможность для прохождения различных способов деления клетки, апробированных на разных этапах эволюции. Так, в процессе эволюции растительных организмов могут быть отобраны и закреплены механизмы одноступенчатого деления в мейозе межродовых гибридов, обеспечивающие им выживание.

ИНТРОГРЕССИЯ ХРОМОСОМЫ 1R: ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ СУБГЕНОМОВ ПШЕНИЦЫ

Источником хроматина ржи в селекции на устойчивость являются пшенично-ржаные замещенные линии и линии с транслоцированными хромосомами. К настоящему времени широкое распространение сохраняется за сортами мягкой пшеницы, несущими пшенично-ржаную

транслокацию 1RS.1BL и в меньшей степени – транслокацию 1RS.1AL и пшенично-ржаное замещение 1R(1B) (Landjeva *et al.*, 2006; Shlegel, 2010; Yediay *et al.*, 2010; Трубачеева и др., 2011). Большая часть исследований по использованию чужеродной изменчивости посвящена поиску новых источников хромосомы 1R (Ren *et al.*, 2009) и получению форм пшеницы с небольшими сегментами этой хромосомы во избежание передачи нежелательных признаков. В технологии фрагментации хромосомы ржи нашли применение гаметоцидные гены (Tsuchida *et al.*, 2008).

Во время трансмиссии хромосом ржи в геном пшеницы происходит их модификация (Badaeva *et al.*, 1986; Alkhimova *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2010). Однако информация об изменении структуры хромосом субгеномов интрогрессивной пшеницы очень ограничена (Bolsheva *et al.*, 1986; Силкова и др., 2006; Fu *et al.*, 2013).

В ходе кариотипирования потомства F₂ комбинации скрещивания пшенично-ржаной замещенной линии 1Rv(1A) с сортом Саратовская 29 были выявлены различные aberrации хромосом пшеницы и ржи. Кроме телоцентрической хромосомы 1RS, у двух растений был обнаружен второй продукт поперечного разрыва унивалентной хромосомы 1R – телоцентрик 1RL (рис. 6, а). Кариотип одного растения содержал телоцентрическую хромосому 1DL (рис. 6, в). Модификации такого типа возникли из-за поперечного деления в районе центромеры (misdivision) унивалентных хромосом ржи в мейозе гибридов F₁ (Силкова и др., 2014).

В проанализированном потомстве отмечались также aberrации хромосом пшеницы в виде делеций крупных фрагментов одного из плеч (рис. 6, г). Появление хромосомных aberrаций подобного типа, по-видимому, связано с присутствием чужеродного хроматина ржи, вызывающего у пшенично-ржаных гибридов различные нарушения мейотического цикла. В частности, образование описанных делеций может быть результатом незавершенности процесса спаривания гомеологов, который останавливается на этапе образования контактов в результате двуцепочечных разрывов. При этом репарации разрывов не происходит, что приводит к отделению терминального фраг-

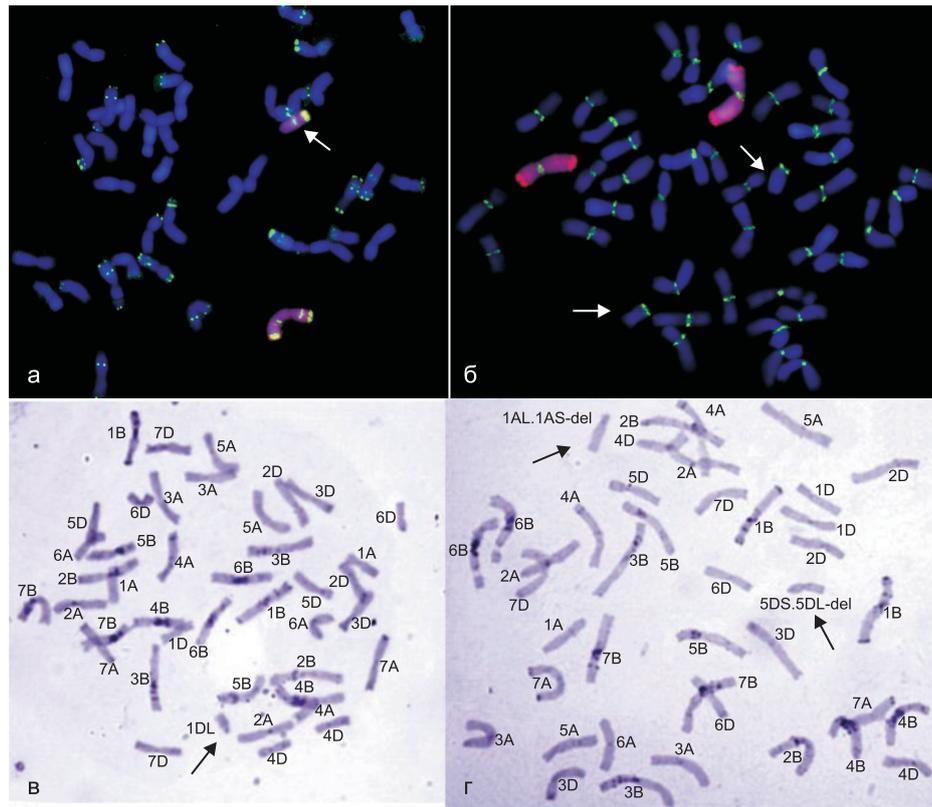


Рис. 6. Кариотипы растений F_2 двойного моносомика 1R-1A.

а – телоцентрик длинного плеча хромосомы 1R (1RL); б – два телоцентрика хромосом пшеницы; в – телоцентрик длинного плеча хромосомы 1D (1DL); г – две модифицированные хромосомы пшеницы 1A и 5D (делеции терминальных районов плеч). а, б – FISH и GISH (а, б – красным окрашены хромосомы ржи, зеленым – pSc 119.1 (а); центромероспецифичный повтор pAet06-09 (б)); в, г – С-окрашивание. Модификации хромосом указаны стрелками.

мента хромосомы (Bai *et al.*, 1999). Возможно, механизмы разрывов хромосом аналогичны действию гаметоцидных генов в митозе пылевых зерен (Nasuda *et al.*, 1998).

Особо следует отметить тот факт, что интрогрессия хромосомы 1R вызвала у отдельных растений моносомию по хромосомам 3D, 4A, 6A, а у двух растений – трисомию по хромосоме 7D. Возможной причиной элиминации хромосом может быть асинописис. Однако линия 1Rv(1A) цитологически стабильна (Силкова и др., 2007), что свидетельствует о компенсационной способности хромосомы ржи, а в мейозе димоносомиков 1Rv-1A среднее число унивалентов на клетку не превышало значений 2,01–2,05 (Силкова и др., 2014). В целом из 28 идентифицированных кариотипов 12 содержали aberrantные хромосомы либо были нестабильны по хромосомному составу.

Разрывы и элиминация хромосом пшеницы

также были обнаружены у пшенично-ржаных моносомно дополненных линий (Fu *et al.*, 2013). В кариотипах самоопыленного потомства линии с хромосомой 7R присутствовали три хромосомы 4A и aberrantная 2D, с хромосомой 6R – aberrantная 3D, а хромосомы 1A и 4B элиминировали.

Таким образом, присутствие лишь одной хромосомы ржи в геноме пшеницы вызывает различные структурные изменения в кариотипе.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта VI.53.1.5, гранта РФФИ (13-04-00679), интеграционного проекта СО РАН № 2 и Б12СО-018.

ЛИТЕРАТУРА

Голубовская И.Н. Цитогенетика отдаленных гибридов пшеницы и перспективы их использования в селекции // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов / Под ред.

- П.М. Жуковского, В.В. Хвостовой. М.: Наука, 1971. С. 243–286.
- Дубовец Н.И., Дымкова Г.В., Соловей Л.А. и др. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1394–1399.
- Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А. и др. Рекомбинантный геном злаков – закономерности формирования и роль в эволюции полиплоидных видов // Генетика. 2008. Т. 44. № 1. С. 54–61.
- Карпеченко Г.Д. Избранные труды. М.: Наука, 1971. С. 303.
- Левитский Г.А. К истории плодовых промежуточных константных пшенично-ржаных гибридов // Цитогенетика растений / Ред. Н.П. Дубинин. М.: Наука, 1978а. С. 251–253.
- Левитский Г.А. Цитология пшенично-ржаных амфидиплоидов // Цитогенетика растений / Ред. Н.П. Дубинин. М.: Наука, 1978б. С. 224–250.
- Леонова И.Н., Добровольская О.Б., Каминская Л.Н. и др. Молекулярный анализ линий тритикале, содержащих различные системы VRN-генов, с помощью молекулярных маркеров и гибридизации *in situ* // Генетика. 2005. Т. 41. № 9. С. 1014–1020.
- Логинова Д.Б., Силкова О.Г. Митотическое поведение центромер в мейозе как механизм восстановления фертильности у пшенично-ржаных амфигаплоидов // Генетика. 2014. Т. 50. № 8. С. 930–939.
- Мюнтцинг А. Генетические исследования. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. 488 с.
- Першина Л.А. Хромосомная инженерия растений – направление биотехнологии // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014. Т. 18. № 1. С. 139–146.
- Писарев В.Е. Селекция зерновых культур. М.: Колос, 1964. 317 с.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И. и др. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 793–802.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И. и др. Получение пшенично-ржаных замещенных линий на основе озимых сортов ржи с идентификацией кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. 2007. Т. 43. № 8. С. 1149–1152.
- Силкова О.Г., Кабаненко Ю.Н., Логинова Д.Б. Влияние пшенично-ржаного замещения на элиминацию хромосом: анализ поведения унивалентов в мейозе пшеницы с диплономосомией и тетраомосомией // Генетика. 2014. Т. 50. № 3. С. 282–290.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Кравцова Л.А. Механизмы мейотической реституции и их генетическая регуляция у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 2003. Т. 38. № 11. С. 1514–1523.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 437–448.
- 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. № 1. С. 18–24.
- Хвостова В.В., Голубовская И.Н., Шкутина Ф.М. Цитогенетика аллополиплоидов в подтрибе Triticeinae на примере Triticale и 56-хромосомных ППГ (неполных амфидиплоидов) // Полиплоидия и селекция / Под ред. Н.В. Турбина. Минск, 1972. С. 95–105.
- Шкутина Ф.М. Цитогенетика и селекция тритикале // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука, 1977.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. 164 с.
- Щапова А.И., Потапова Т.А., Кравцова Л.А. Генетическая обусловленность нерасхождения хромосом в мейозе пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 1987. Т. 23. № 3. С. 473–481.
- Aase H.C. Cytology of Triticum, Secale, and Aegilops hybrids with reference to phylogeny // Res. Stud. State Coll. Wash. 1930. V. 2. P. 5–60.
- Alkhimova A.G., Heslop-Harrison J.S., Shchapova A.I., Vershinin A.V. Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines // Chromosome Res. 1999. V. 7. P. 205–212.
- Aragón-Alcaide L., Reader S., Miller T., Moore G. Centromeric behaviour in wheat with high and low homeologous chromosomal pairing // Chromosoma. 1997. V. 106. P. 327–333.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Bolsheva N.L., Zelenin A.V. Chromosome alterations in the karyotype of triticales in comparison with the parental forms 1. Heterochromatic regions of R genome chromosomes // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 72. P. 518–523.
- Bai X., Peirson B.N., Dong F. *et al.* Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in Arabidopsis // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 417–430.
- Benavente E., Fernandez-Calvin B., Orellana J. Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH // Chromosoma. 1996. V. 105. P. 92–96.
- Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticales to their elimination in wheat-rye addition lines // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 489–497.
- Bolsheva N.L., Badaeva E.D., Badaev N.S., Zelenin A.V. Chromosome alterations in the karyotype of triticales in comparison with the parental forms 2. Heterochromatin of the wheat chromosomes // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 73. P. 66–71.
- Cai X., Xu S.S., Zhu X. Mechanism of haploidy-dependent meiotic cell division of polyploid wheat // Chromosoma. 2010. V. 119. P. 275–285.
- Feldman M., Levy A.A. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 109. P. 250–258.
- Fu S., Yang M., Fei Y. *et al.* Alterations and abnormal mitosis of wheat chromosomes induced by wheat-rye monosomic addition lines // PLoS ONE. 2013. V. 8. No. 7. e70483. doi:10.1371/journal.pone.0070483
- Gonzalez G., Sunkel C.E., Glover D.M. Interactions between *mgr*, *asp*, and *polo*: *asp* function modulated by *polo* and needed to maintain the poles of monopolar and bipolar spindles // Chromosoma. 1998. V. 107. P. 452–460.

- Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Meiotic restitution in wheat-barley hybrids // *Chromosoma*. 1980. V. 79. P. 363–372.
- Landjeva S., Korzun V., Tsanev V. *et al.* Distribution of wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria // *Plant Breed.* 2006. V. 125. P. 102–104.
- Lukaszewski A.J. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheats // *Crop Sci.* 1990. V. 30. P. 1151–1153.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidisation // *Cytogenet. Genome. Res.* 2005. V. 109. P. 236–249.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Timing and rate of genome variation in triticale following allopolyploidization // *Genome*. 2006. V. 49. P. 950–958.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in triticale // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. P. 825–832.
- Ma X.F., Fang P., Gustafson J.P. Polyploidization-induced genome variation in triticale // *Genome*. 2004. V. 47. P. 839–848.
- Maan S.S., Sasakuma T. Fertility of amphihaploids in Triticinae // *J. Hered.* 1977. V. 57. P. 76–83.
- Mater Y., Baenziger S., Gill K. *et al.* Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL // *Genome*. 2004. V. 47. P. 292–298.
- Matsuoka Y., Nasuda S. Durum wheat as candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F₁ hybrid with *Aegilops tauschii* Coss. // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1710–1717.
- Matsuoka Y., Nasuda S., Ashida Y. *et al.* Genetic basis for spontaneous hybrid genome doubling during allopolyploid speciation of common wheat shown by natural variation analyses of the paternal species // *PLoS ONE*. 2013. 8(8): e68310. doi:10.1371/journal.pone.0068310
- Mergoum M., Singh P.K., Pena R.J. *et al.* Triticale: A «New» Crop with Old Challenges // *Cereals*. 2009. DOI: 10.1007/978-0-387-72297-9 / Ed. M.J. Carena. Springer Science + Business Media, LLC.
- Miller T.E., Reader S.M., Purdie K.A., King I.P. Determination of the frequency of wheat-rye chromosome pairing in wheat × rye hybrids with and without chromosome 5B // *Theor. Appl. Genet.* 1994. V. 89. P. 255–258.
- Nasuda S., Friebe B., Gill B.S. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 1115–1124.
- Oleszczuk S., Lukaszewski A.J. The origin of unusual chromosome constitutions among newly formed allopolyploids // *AJB*. 2014. V. 101. P. 318–326.
- Rimpau W. Kreuzungsprodukte landwirtschaftlicher Kulturpflanzen // *Landwirtsch. Jahrb.* 1891. V. 20. No. 4. P. 335–371.
- Ren T.H., Yang Z.J., Yan B.J. *et al.* Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat // *Euphytica*. 2009. V. 169. P. 207–213.
- Sears E.R. Genetic control of chromosome pairing in common wheat // *Annu. Rev. Genet.* 1976. V. 10. P. 31–51.
- Sears E.R. Homoeologous chromosomes in *Triticum aestivum* (abstr.) // *Genetics*. 1952. V. 37. P. 624.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat // *Res. Bull. Mis. Agric. Exptl. Stat.* 1954. V. 572. P. 1–8.
- Shchapova A.I., Potapova T.A., Kravtsova L.A., Numerova O.M. Karyotype stabilization in intergeneric hybrids of the subtribe Triticinae // *Theor. Appl. Genet.* 1984. V. 68. P. 289–296.
- Shlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2010. V05-08, 1–14. <http://www.desicca.de/Wheat-rye-introgression>.
- Silkova O.G., Adonina I.G., Krivosheina E.A. *et al.* Chromosome pairing in meiosis of partially fertile wheat/rye (ABDR) hybrids // *Plant Reprod.* 2013. V. 26. P. 33–41.
- Silkova O.G., Shchapova A.I., Shumny V.K. Patterns of meiosis in ABDR amphihaploids depend on the specific type of univalent chromosome division // *Euphytica*. 2011. V. 178. P. 415–426.
- Tsuchida M., Fukushima T., Nasuda S. *et al.* Dissection of rye chromosome 1R in common wheat // *Genes Genet. Syst.* 2008. V. 83. P. 43–53.
- Villareal R.L., Banuelos O., Mujeeb-Kazi A., Rajaram S. Agronomic performance of chromosome 1B and T1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82 // *Euphytica*. 1998. V. 103. P. 195–202.
- Voylovkov A.V., Tikhenko N.D. Triticale as a model for study of genomic interaction and genome evolution in allopolyploids plants // *Proc. of the 5th Intern. Triticale Symp. Poland*. 2002. V. 1. P. 63–70.
- Wagenaar E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. I. Influence of genotype on polyploid seedset in a *Triticum crassum* × *Triticum turgidum* hybrid // *Can. J. Genet. Cytol.* 1968. V. 10. P. 836–843.
- Weimarck A. Elimination of wheat and rye chromosomes in a strain of octoploid triticale as revealed by Giemsa banding technique // *Hereditas*. 1974. V. 77. P. 281–286.
- Xu S.J., Joppa L.R. Mechanisms and inheritance of first division restitution in hybrids of wheat, rye, and *Aegilops squarrosa* // *Genome*. 1995. V. 38. P. 607–615.
- Xu S.J., Joppa L.R. First division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa* // *Plant Breed.* 2000. V. 119. P. 233–241.
- Yediyar F.E., Baloch F.S., Kilian B., Ozkan H. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2010. V. 57. P. 119–129.
- Zhang L., Chen Q., Yuan Z. *et al.* Production of aneuahaploid and euploid sporocytes by meiotic restitution in fertile hybrids between durum wheat Langdon chromosome substitution lines and *Aegilops tauschii* // *J. Genet. Genom.* 2008. V. 35. P. 617–623.
- Zhang L., Yen Y., Zheng Y., Liu D. Meiotic restriction in emmer wheat is controlled by one or more nuclear genes that continue to function in derived line // *Sex. Plant Reprod.* 2007. V. 20. P. 159–166.
- Zhou J., Zhang H., Yang Z. *et al.* Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation triticale ZH-1 with multiple resistances to diseases // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2012. V. 59. P. 1161–1166.

RYE CHROMATIN INTROGRESSION IN THE BREAD WHEAT GENOME: CYTOGENETIC ASPECTS

O.G. Silkova¹, D.B. Loginova¹, Yu.N. Ivanova (Kabanenko)¹,
E.B. Bondarevich², L.A. Solovei², T.I. Shtyk², N.I. Dubovets²

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

²Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: nadezhdadubovets@gmail.com

Summary

Alien chromatin introgression into the genome of common wheat *Triticum aestivum* L. is the most efficient way to enrich the gene pool of this crop. To improve the breeding value of wheat accessions, rye *Secale cereale* L. is used as a donor of characters. Transfer of rye genetic material has certain specific features. The combination of the two cereal genomes in a single nucleus results in imbalance in all genetic systems. Fertility restoration in amphihaploids is the first step in the formation of introgression accessions. It is followed by the hybrid genome reorganization, which leads to cytological and genetic stability in the diploid progeny. In this paper, we present and analyze results that were obtained in the study of the two steps of wheat-rye hybrid genome reorganization: (1) breaching of F₁ hybrid sterility (cytogenetic mechanisms of unreduced gamete formation) and (2) reorganization of wheat subgenomes during the introgression of single rye chromosomes.

Key words: wheat-rye hybrids, cytogenetics, FISH, immunostaining, C banding, genome reorganization, meiotic restitution, chromosome modification.

УДК 575.1:633.111

ВЛИЯНИЕ ЧУЖЕРОДНЫХ ИНТРОГРЕССИЙ В ГЕНОМЕ ПШЕНИЦЫ НА ЕЕ УСТОЙЧИВОСТЬ К ОСМОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

© 2014 г. Р.С. Юдина¹, И.Н. Леонова¹, Е.А. Салина^{1,2}, Е.К. Хлесткина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: khlest@bionet.nsc.ru;

² ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт
растениеводства и селекции Россельхозакадемии, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 10 сентября 2014 г. Принята к публикации 24 сентября 2014 г.

Одним из основных факторов внешней среды, лимитирующих рост и урожайность растений, является засуха. В настоящее время с целью улучшения комплексной устойчивости мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) широко применяется создание новых форм пшеницы с использованием интрогрессии генов от других видов злаков.

Цель настоящей работы состояла в установлении влияния чужеродного генетического материала (от *Aegilops speltoides*, *Ae. tauschii* и *T. timopheevii*) на устойчивость проростков пшеницы к осмотическому стрессу. Косвенная оценка засухоустойчивости с помощью создания искусственного дефицита влаги в лабораторных условиях позволила выявить различную степень влияния чужеродного генетического материала. В частности, показано, что транслокация T6BS·6BL-6SL от *Ae. speltoides* в геноме мягкой пшеницы положительно влияла на засухоустойчивость родительской линии Родина-1, а интрогрессия от *T. timopheevii* в хромосоме 2A наоборот снижала устойчивость исходного сорта Саратовская 29. На примере транслокации T5BS·5BL-5SL установлено, что один и тот же чужеродный фрагмент, интрогрессированный в разные исходные сорта пшеницы, может по-разному влиять на устойчивость пшеницы к осмотическому стрессу в зависимости от степени засухоустойчивости исходного сорта.

Ключевые слова: *Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Triticum aestivum*, *Triticum timopheevii*, засухоустойчивость, мягкая пшеница, осмотический стресс, чужеродные интрогрессии.

ВВЕДЕНИЕ

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является важнейшей продовольственной культурой. Несмотря на большие успехи в ее селекции, актуальной проблемой остается создание сортов, которые наряду с высокой потенциальной урожайностью будут иметь гены, эффективно защищающие их от неблагоприятных абиотических и биотических факторов внешней среды. Генетического разнообразия самой мягкой пшеницы недостаточно для решения этой проблемы (Feldman, Sears, 1981), поэтому наиболее актуальной задачей генетиков и селекционеров

является создание новых форм пшеницы с использованием интрогрессии генетического материала от дикорастущих видов, обладающих комплексной устойчивостью к различным неблагоприятным факторам внешней среды (Bohnert *et al.*, 1995). Известно, что кроме целевых генных локусов фрагменты чужеродного генома могут содержать дополнительный генетический материал, оказывающий негативное влияние на хозяйственно ценные признаки. Поэтому при создании сортов и селекционных линий пшеницы на основе отдаленной гибридизации естественным остается вопрос о степени влияния чужеродных замещений и

транслокаций на различные хозяйственно ценные признаки.

Одним из основных факторов внешней среды, лимитирующих рост и урожайность растений, является засуха. Для гарантированного снижения потерь продукции сельского хозяйства в засушливые годы необходимо иметь устойчивые к дефициту влаги сорта. Проблема получения засухоустойчивых сортов актуальна во многих странах мира для большинства культурных видов растений (Bartels, Sunkar, 1995; Chaves *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Ashraf, 2010; Fleury *et al.*, 2010; Mir *et al.*, 2012; Budak *et al.*, 2013).

Необходимым условием эффективной селекции является оценка засухоустойчивости, что, в первую очередь, зависит от правильной оценки степени устойчивости создаваемого селекционного материала. Прямая оценка засухоустойчивости в поле при всей ее объективности требует многолетних наблюдений. Для ускорения селекционного процесса в последнее время применяют косвенную оценку засухоустойчивости с помощью лабораторных физиологических методов. Методы ранней диагностики на семенах и проростках позволяют проводить оценку круглый год и анализировать большое количество селекционного материала (Удовенко, 1988; Bálint *et al.*, 2008; Baloch *et al.*, 2012).

Настоящее исследование проведено на линиях яровой мягкой пшеницы, содержащих фрагменты отдельных хромосом или целые хромосомы *Aegilops speltoides*, *Ae. tauschii* и *T. timopheevii*, с использованием нейтрального осмотика (полиэтиленгликоля) для создания искусственного дефицита влаги. Цель исследования состояла в установлении степени влияния чужеродного генетического материала на устойчивость проростков пшеницы к осмотическому стрессу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальным материалом служили яровые сорта/линии мягкой пшеницы: Новосибирская 29, Родина-1, Чайниз Спринг и Саратовская 29 и линии, созданные на их основе (табл.).

Искусственный водный дефицит создавался с использованием нейтрального осмотика – по-

лиэтиленгликоля (ПЭГ 6000) в соответствии с модифицированной методикой Bálint с соавт. (2008). Семена помещали в обработанные ультрафиолетом чашки Петри на увлажненную дистиллированной водой фильтровальную бумагу, выдерживали 24 ч при 4 °С в темноте для синхронизации прорастания, затем 24 ч при 20 °С и 12-часовом режиме освещения. Проросшие семена переносили в чашки Петри, содержащие 15 %-й раствор ПЭГ 6000¹ или дистиллированную воду, и выдерживали 72 ч при 20 °С и 12-часовом режиме освещения, затем на седьмой день после прорастания проводили измерения длины листа, массы листа (вместе с колеоптиле), длины самого длинного корня и массы корней каждого растения. Для каждого сорта/линии эксперимент проводился на 15 %-м ПЭГ 6000 и на дистиллированной воде в трех повторностях. По каждому сорту и каждой линии проанализировано по 96 растений. Индекс устойчивости каждого сорта/линии рассчитывали отдельно по каждому из четырех оцениваемых параметров по формуле: отношение величины параметра при выращивании в 15 %-м ПЭГ к соответствующей величине при выращивании того же самого сорта/линии на дистиллированной воде. Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического теста Манна–Уитни (U-test). Различия значимы при $U = 0$ ($p \leq 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Родительские сорта пшеницы, используемые в работе, имеют различную степень устойчивости к осмотическому стрессу. Параметры сорта Новосибирская 29 снижались на 15 %-м ПЭГ по сравнению с контрольным экспериментом в среднем в два раза (средний индекс устойчивости равен 51 %; рис. 1), что указывает на низкую устойчивость данного сорта к осмотическому стрессу. Наиболее устойчивым из изученных сортов оказался сорт Саратовская 29. Для него средний индекс устойчивости составил 91 % (рис. 1). Для всех параметров, кроме массы

¹ Согласно литературным данным, 15 %-й раствор ПЭГ 6000 в дистиллированной воде создает осмотическое давление 0,23 МПа (Money, 1989). В экспериментах на пшенице данная концентрация была ранее подобрана опытным путем как оптимальная для изучения реакции проростков на засуху (Baloch *et al.*, 2012).

Таблица

Характеристика растительного материала, используемого в работе

Краткое обозначение	Полное наименование	Характеристика чужеродного генетического материала	Литературные ссылки
N29 N29- <i>Ae. speltooides</i> 5SL	Сорт <i>T. aestivum</i> Новосибирская 29 Интрогрессивная линия Новосибирская 29 – <i>Ae. speltooides</i> 21-4/933-1-5SL	– Транслокация T5BS·5BL-5SL (донор <i>Ae. speltooides</i> k-389)	– Патент RU 2484621
Rod.	<i>T. aestivum</i> Родина-1 (линия сорта Родина, отличающаяся отсутствием транслокации T1RS·1BL, характерной для сорта Родина)	–	Адонина и др., 2012
Rod.- <i>Ae. speltooides</i> 5SL	Интрогрессивная линия Родина-1 – <i>Ae. speltooides</i> 16-9-5SL	Транслокация T5BS·5BL-5SL (донор <i>Ae. speltooides</i> k-389)	Адонина и др., 2012
Rod.- <i>Ae. speltooides</i> 6SL	Интрогрессивная линия Родина-1 – <i>Ae. speltooides</i> 17-7-6SL	Транслокация T6BS·6BL-6SL (донор <i>Ae. speltooides</i> k-389)	Адонина и др., 2012
CS	Сорт <i>T. aestivum</i> Чайниз Спринг	–	–
CS- <i>Ae. tauschii</i> 2D	Замещенная линия Чайниз Спринг (<i>Ae. tauschii</i> 2D)	Замещение хромосомы 2D <i>T. aestivum</i> на хромосому 2D <i>Ae. tauschii</i>	McFadden, Sears, 1947
CS- <i>Ae. tauschii</i> 4D	Замещенная линия Чайниз Спринг (<i>Ae. tauschii</i> 4D)	Замещение хромосомы 4D <i>T. aestivum</i> на хромосому 4D <i>Ae. tauschii</i>	McFadden, Sears, 1947
S29	Сорт <i>T. aestivum</i> Саратовская 29	–	–
S29- <i>T. timopheevii</i> 2A	Интрогрессивная линия Саратовская 29 – <i>T. timopheevii</i> 832-2A-BC3	Интрогрессия от <i>T. timopheevii</i> ssp. <i>viliculosum</i> в хромосоме 2A, фланкированная маркерами <i>Xgwm1036</i> и <i>Xgwm0372</i>	Timonova <i>et al.</i> , 2013
S29- <i>T. timopheevii</i> 5B	Интрогрессивная линия Саратовская 29 – <i>T. timopheevii</i> 832-5B-BC3	Интрогрессия от <i>T. timopheevii</i> ssp. <i>viliculosum</i> в хромосоме 5B, фланкированная маркерами <i>Xgwm1109</i> и <i>Xgwm0846</i>	Timonova <i>et al.</i> , 2013

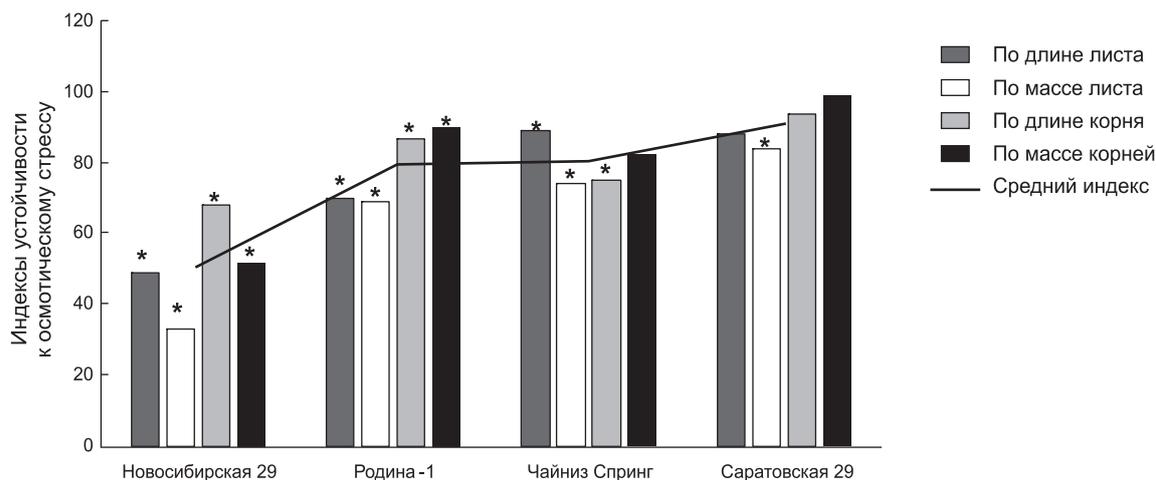


Рис. 1. Индексы устойчивости к осмотическому стрессу у исходных сортов/линий пшеницы.

* Значимые отличия показателей при проращивании в 15 %-м ПЭГ 6000 от показателей в контрольном эксперименте, согласно тесту Манна–Уитни ($p \leq 0,05$).

листа, снижение показателей в условиях осмотического стресса по сравнению с контролем недостоверно. В литературе данный сорт описывается, как имеющий высокую устойчивость к засухе (Osipova *et al.*, 2013), что согласуется с полученными нами результатами.

Чайниз Спринг и Родина-1 проявили промежуточную устойчивость к осмотическому стрессу. Средние индексы устойчивости составили для них 80 и 79 % соответственно (рис. 1). Выявленная устойчивость сорта Чайниз Спринг к осмотическому стрессу согласуется с литературными данными, основанными на полевых тестах засухоустойчивости данного сорта (Simon-Sarkadi, Galiba, 1996).

Эффективным источником генов, повышающих устойчивость культивируемых сортов к различным видам стресса, являются дикорастущие виды растений. В качестве доноров генетического материала для интрогрессии в гексаплоидный геном мягкой пшеницы (BBAADD) используют, в первую очередь, эволюционно наиболее близкие виды злаков, к которым относятся тетраплоидные виды пшеницы, в частности *T. timopheevii* (GGAA), и диплоидные виды эгилопсов: донор D-генома пшеницы – *Ae. tauschii* (DD) и донор B- и G-геномов – *Ae. speltoides* (SS) (Schneider *et al.*, 2008; Todorovska *et al.*, 2009; McIntosh *et al.*, 2013).

Гибриды мягкой пшеницы, полученные с участием *Ae. speltoides*, чаще имеют транс-

локации в хромосомах В-генома пшеницы. Молекулярными и цитологическими методами показано, что линии N29–*Ae. speltoides* 5SL и Rod.–*Ae. speltoides* 5SL несут транслокации T5BS·5BL-5SL *Ae. speltoides* равной протяженности, при этом других интрогрессий от *Ae. speltoides* в геноме этих линий не обнаружено (Salina *et al.*, 2013). Несмотря на то что при создании линий с транслокацией *Ae. speltoides* T5BS·5BL-5SL использовался один и тот же источник, видно, что линии мягкой пшеницы, несущие эту транслокацию, по-разному реагируют на тестирование. Присутствие транслокации T5BS·5BL-5SL в геноме сорта Новосибирская 29 приводило к повышению устойчивости, а наличие ее в геноме линии Родина-1 отрицательно влияло на устойчивость к осмотическому стрессу (рис. 2). Видно, что индексы, рассчитанные по длине и массе листа, значительно выше у N29–*Ae. speltoides* 5SL по сравнению с исходным сортом (рис. 2). Длина самого длинного корня у данной линии несколько снижена, но за счет утолщения корней происходит значимое увеличение их массы. Таким образом, транслокация T5BS·BL-5SL положительно влияет на устойчивость сорта Новосибирская 29 к осмотическому стрессу, чего не наблюдается в случае идентичной транслокации у линии Родина-1. Несмотря на то что индекс, рассчитанный по длине листа, несколько выше у

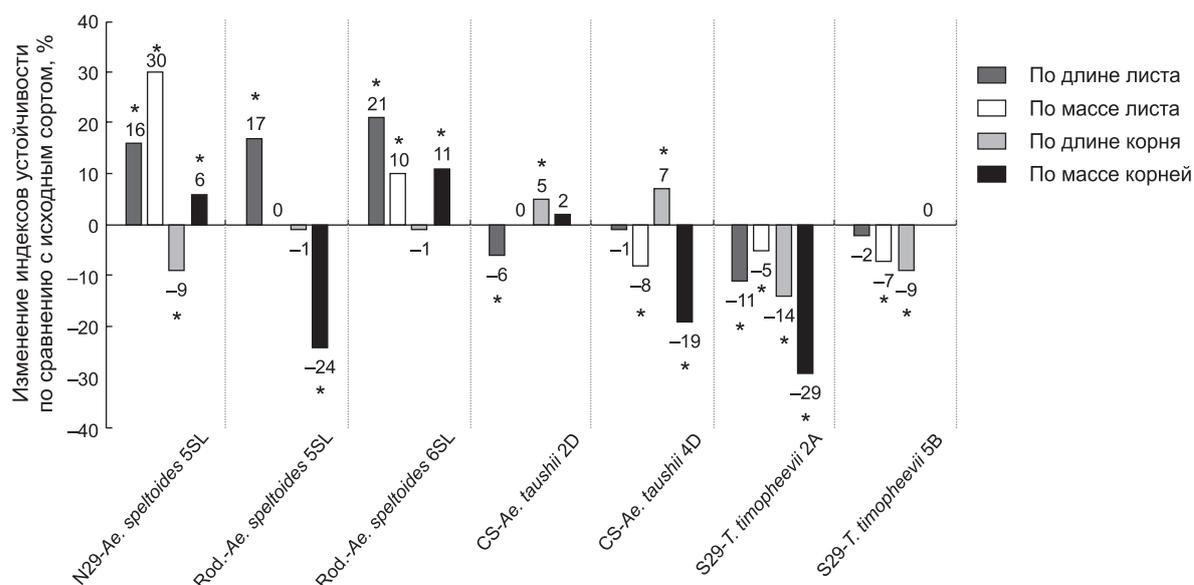


Рис. 2. Изменение индексов устойчивости к осмотическому стрессу у интрогрессивных линий по сравнению с исходными сортами/линиями.

* Значимые отличия согласно тесту Манна–Уитни ($p \leq 0,05$).

Rod-*Ae. speltoides* 5SL, чем у родительского сорта, транслокация T5BS·5BL-5SL не влияет на массу листа, а также длину корня, а масса корней существенно снижается. Так как донор транслокации и ее размер совпадают в обоих случаях, можно предположить, что донорский фрагмент от *Ae. speltoides* 5SL содержит ген, контролирующий устойчивость к осмотическому стрессу, однако участок хромосомы 5BL Родина-1, замещенный транслокацией, содержит локус, который вносит больший вклад в устойчивость. Еще одним объяснением различий между линиями N29-*Ae. speltoides* 5SL и Rod-*Ae. speltoides* 5SL может быть взаимодействие между генетическим материалом вида-донора и генами родительских сортов-реципиентов. Влияние генотипической среды сорта-реципиента на проявление генных локусов, перенесенных в геном мягкой пшеницы от диких и культурных сородичей, специально не изучалось, но ряд данных, полученных при изучении устойчивых к патогенам гибридных форм, свидетельствует о различном уровне экспрессии фактора резистентности при интродукции генов устойчивости в разные сорта (Singh *et al.*, 1990; Бадаева и др., 2000).

Линия мягкой пшеницы, полученная на основе линии Родина-1, несущая другую транс-

локацию от *Ae. speltoides* (T6BS·6BL-6SL), более устойчива к осмотическому стрессу по сравнению с исходным сортом (рис. 2, линия Rod-*Ae. speltoides* 6SL).

Образцы *Ae. tauschii*, дикорастущего донора D-генома мягкой пшеницы, нередко используются в настоящее время в селекции в качестве источника полезных генов для повышения устойчивости и урожайности пшеницы (Ogbonnaya *et al.*, 2013). S.V. Osipova с соавт. (2011) продемонстрировали роль хромосом 1D, 3D, 5D и 6D *Ae. tauschii* в повышении засухоустойчивости пшеницы, а 7D – наоборот, в повышении чувствительности к засухе. Роль хромосом 2D и 4D оставалась неясной. В настоящей работе образец *Ae. tauschii*, отличный от описываемого в статье Osipova с соавт. (2011), показал нейтральность хромосомы 2D и небольшое негативное воздействие хромосомы 4D на устойчивость недельных проростков пшеницы к осмотическому стрессу (рис. 2). Необходимо иметь в виду, что сорт-реципиент (Чайниз Спринг) является засухоустойчивым (Simon-Sarkadi, Galiba, 1996), и потому снижение показателей устойчивости замещенной линии CS-*Ae. tauschii* 4D может указывать, например, на наличие гена, контролирующего устойчивость к засухе, в хромосоме 4D самого сорта-реципиента.

Сорт Саратовская 29 отличается высокой засухоустойчивостью, улучшение его устойчивости к засухе за счет интрогрессии чужеродного материала не является столь актуальной задачей. Однако поскольку в геном данного сорта вводится чужеродный генетический материал с целью улучшения устойчивости данного сорта к грибным болезням (Leonova *et al.*, 2011), важно знать, насколько нейтральны эти интрогрессии по отношению к другим важным признакам, в том числе и к засухоустойчивости. Оценка на стадии проростков показала незначительное негативное влияние на устойчивость к осмотическому стрессу в результате интрогрессии генетического материала *T. timopheevii* в хромосому 5В сорта Саратовская 29 (рис. 2). Гораздо более существенное негативное влияние оказало введение фрагмента генома *T. timopheevii* в хромосому 2А сорта Саратовская 29 (рис. 2). Возможно, в процессе создания линии S29–*T. timopheevii* 2А за счет рекомбинации был элиминирован аллель, контролирующий засухоустойчивость сорта Саратовская 29. При подтверждении данной тенденции в полевых условиях может быть рекомендовано дальнейшее беккроссирование линии S29–*T. timopheevii* 2А, чтобы добиться рекомбинации между локусами, контролирующими устойчивость к ржавчине и чувствительность к засухе.

В настоящее время проводится изучение влияния на засухоустойчивость пшеницы генетического материала не только ее ближайших сородичей, но и более отдаленных видов злаков. Например, Farshadfar с соавт. (2013) при изучении пшенично-ржаных дополненных линий Чайниз Спринг/Империял установили устойчивое положительное влияние хромосом ржи 2R, 4R и 6R. В целом результаты, полученные в настоящей работе, и литературные данные указывают на то, что интрогрессия определенных фрагментов чужеродных геномов в геном пшеницы является перспективным методом улучшения ее засухоустойчивости.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа частично поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (12_04_33027_мол_а_вед) и Программой РАН «Динамика и сохранение генофондов» № 30.39.

Авторы благодарят Ольгу Викторовну Захарову за техническую помощь в экспериментальной работе.

ЛИТЕРАТУРА

- Адонина И.Г., Сусолкина Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltoides* Tausch и их оценка на устойчивость к листовой ржавчине // Генетика. 2012. Т. 48. № 4. С. 488–494.
- Бадаева Е.Д., Прокофьева З.Д., Билинская Е.Н. и др. Цитогенетический анализ устойчивых к бурой ржавчине и мучнистой росе гибридов, полученных от скрещивания мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L., AABBDD) с пшеницами группы Timopheevii (A'A'GG) // Генетика. 2000. Т. 36. С. 1663–1673.
- Патент RU 2484621. Способ создания линий мягкой пшеницы, устойчивых к бурой ржавчине / Салина Е.А., Леонова И.Н., Петраш Н.В., Адонина И.Г., Щербань А.Б. Опубл. 20.06.2013.
- Удовенко Г.В. Диагностика устойчивости растений к стрессовым воздействиям. Методическое руководство. Л.: ВИР, 1988. 226 с.
- Ashraf M. Inducing drought tolerance in plants: Recent advances // Biotechnol. Adv. 2010. V. 28. P. 169–183.
- Bálint A.F., Szira F., Börner A., Galiba G. Segregation- and association based mapping of loci influencing osmotic tolerance in barley // Acta Biol. Szegediensis. 2008. V. 52. P. 101–102.
- Baloch M.J., Dunwell J., Khakwani A.A., Dennet M., Jatoi W.A., Channa S.A. Assessment of wheat cultivars for drought tolerance via osmotic stress imposed at early seedling growth stages // J. Agric. Res. 2012. V. 50. P. 299–310.
- Bartels D., Sunkar R. Drought and salt tolerance in plants // Crit. Rev. Plant Sci. 2005. V. 24. P. 23–58.
- Bohnert H.J., Nelson D.E., Jensen R.G. Adaptations to environmental stresses // Plant Cell. 1995. V. 7. P. 1099–1111.
- Budak H., Kantar M., Yucebilgili Kurtoglu K. Drought tolerance in modern and wild wheat // Sci. World J. 2013. V. 2013. Article number 548246.
- Chaves M.M., Maroco J.P., Pereira J.S. Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant // Funct. Plant Biol. 2003. V. 30. P. 239–264.
- Farshadfar E., Mohammadi R., Farshadfar M., Dabiri S. Relationships and repeatability of drought tolerance indices in wheat-rye disomic addition lines // Aust. J. Crop Sci. 2013. V. 7. P. 130–138.
- Feldman M., Sears E.R. The wild gene resources of wheat // Sci. Am. 1981. 244. P. 102–112.
- Fleury D., Jefferies S., Kuchel H., Langridge P. Genetic and genomic tools to improve drought tolerance in wheat // J. Exp. Bot. 2010. V. 61. P. 3211–3222.
- Leonova I.N., Budashkina E.B., Kalinina N.P., Röder M.S., Börner A., Salina E.A. *Triticum aestivum*-*Triticum timopheevii* introgression lines as a source of pathogen resistance genes // Czech J. Genet. Plant Breed. 2011. V. 47. P. S49–S55.
- McFadden E.S., Sears E.R. The genome approach in radical wheat breeding // J. Am. Soc. Agron. 1947. V. 39. P. 1011–1026.

- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat, Yokohama, Japan, 2013. 197 p.
- Mir R.R., Zaman-Allah M., Sreenivasulu N., Trethowan R., Varshney R.K. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops // *Theor. Appl. Genet.* 2012. V. 125. P. 625–645.
- Money N.P. Osmotic pressure of aqueous polyethylene glycols // *Plant Physiol.* 1989. V. 91. P. 766–769.
- Ogbonnaya F.C., Abdalla O., Mujeeb-Kazi A., Kazi A.G., Xu S.S., Gosman N., Lagudah E.S., Bonnett D., Sorrells M.E., Tsujimoto H. Synthetic hexaploids: Harnessing species of the primary gene pool for wheat improvement // *Plant Breed. Rev.* 2013. V. 37. P. 35–122.
- Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Davydov V.A., Pshenichnikova T.A., Börner A. Tolerance of prolonged drought among a set of bread wheat chromosome substitution lines // *Cereal Res. Commun.* 2011. V. 39. P. 343–351.
- Osipova S.V., Permyakov A.V., Permyakova M.D., Pshenichnikova T.A., Genaev M.A., Börner A. The antioxidant enzymes activity in leaves of inter-varietal substitution lines of wheat (*Triticum aestivum* L.) with different tolerance to soil water deficit // *Acta Physiol. Plant.* 2013. V. 35. P. 2455–2465.
- Salina E.A., Petrash N.V., Timonova E.M., Adonina I.G. Markers-assisted identification of a new leaf rust resistance gene from *Aegilops speltoides* // *Abstr. of the 12th Intern. Wheat Genet. Symp. Japan, September 8–14, 2013.* P. 170.
- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilization of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat // *Euphytica.* 2008. V. 163. P. 1–19.
- Simon-Sarkadi L., Galiba G. Reflection of environmental stresses on the amino acid composition of wheat // *Perjodica Polytechnica Ser. Chem. Eng.* 1996. V. 40. P. 79–86.
- Singh H., Johnson R., Seth D. Genes for race-specific resistance to yellow rust (*Puccinia striiformis*) in Indian wheat cultivars // *Plant Pathol.* 1990 V. 39. P. 424–433.
- Timonova E.M., Leonova I.N., Röder M.S., Salina E. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome // *Mol. Breed.* 2013. V. 31. P. 123–136.
- Todorovska E., Christov N., Slavov S., Christova P., Vassilev D. Biotic stress resistance in wheat – breeding and genomic selection implications // *Biotechnol. Biotech. Eq.* 2009. V. 23. P. 1417–1426.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance // *Planta.* 2003. V. 218. P. 1–14.

EFFECT OF ALIEN GENOMIC INTROGRESSIONS ON THE OSMOTIC TOLERANCE OF WHEAT

R.S. Yudina¹, I.N. Leonova¹, E.A. Salina^{1,2}, E.K. Khlestkina¹

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

² Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Krasnoobsk, Novosibirsk oblast, Russia

Summary

Drought is one of the major environmental factors that limit crop growth and yield. Development of new wheat genotypes carrying introgressions from other cereal species is widely applied to improve the complex stability of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The aim of this study was estimation of the effect of foreign genetic material (derived from *Aegilops speltoides*, *Ae. tauschii* and *T. timopheevii*) on osmotic stress tolerance in wheat seedlings. Indirect evaluation of drought resistance by creating artificial shortage of moisture under laboratory conditions identified different degrees of the influence of foreign genetic material. In particular, it was shown that the presence of the T6BS·6BL-6SL translocation from the *Ae. speltoides* genome in bread wheat might increase its drought resistance, whereas the presence of a *T. timopheevii* introgression in chromosome 2A, on the contrary, reduced the resistance of wheat to osmotic stress. By the example of translocation T5BS·5BL-5SL, it was found that the same foreign fragment introgressed into different wheat genotypes could exert different effects on resistance to osmotic stress depending on the drought tolerance degree of the initial wheat genotype.

Key words: *Aegilops speltoides*, *Aegilops tauschii*, *Triticum aestivum*, *Triticum timopheevii*, drought tolerance, bread wheat, osmotic stress, alien introgressions.

УДК 631 527.41:631.11: 633.14

СПОСОБНОСТЬ К АНДРОГЕНЕЗУ ЭУПЛАЗМАТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ И АЛЛОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛИНИЙ (*H. vulgare*)-*T. aestivum* С ТРАНСЛОКАЦИЯМИ 1RS.1BL И 7DL-7Ai И ПОЛУЧЕНИЕ ДИГАПЛОИДНЫХ ЛИНИЙ

© 2014 г. Т.С. Осадчая¹, Л.А. Першина^{1,2}, Н.В. Трубачева¹,
И.А. Белан³, Л.П. Россеева³, Э.П. Девяткина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск,
Россия, e-mail: pershina@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, кафедра цитологии и генетики;

³ Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства
Россельхозакадемии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г. Принята к публикации 10 октября 2014 г.

Изучена способность к андрогенезу в культуре пыльников эуплазматических линий мягкой пшеницы и аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai. У эуплазматических линий, имеющих обе эти транслокации, способность к образованию андрогенных структур и регенерации проростков подавлена. Аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, как носители двух транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, так и аллоплазматические линии с транслокацией 1RS.1BL, характеризуются повышенной способностью к образованию андрогенных структур, включая полиэмбриоиды, и к регенерации проростков по сравнению с эуплазматическими линиями. Обсуждается индуцирующее взаимное влияние цитоплазмы ячменя и хромосомы ржи 1RS на андрогенетическую способность линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai. От андрогенных растений со спонтанным удвоенным числом хромосом и восстановленной фертильностью сформированы дигаплоидные линии. Для использования в селекции выделены наиболее перспективные по проявлению хозяйственно ценных признаков и устойчивости к грибным патогенам линии-носители транслокаций.

Ключевые слова: культура пыльников, андрогенез, аллоплазматические линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, транслокации 1RS.1BL, 7DL-7Ai.

ВВЕДЕНИЕ

Линии гаплоидов с удвоенным числом хромосом широко используются в фундаментальных исследованиях (Chu *et al.*, 2009) и селекции растений, поскольку такие линии являются гомозиготными и в работе с ними сокращается время отбора генотипов с нужными признаками и ускоряется селекционный процесс (Germana, 2011). Дигаплоидные (ДГ) линии используют в работах по интрогрессивной гибридизации при создании генотипов культурных растений

с устойчивостью к абиотическим (Humphreys *et al.*, 2007) и биотическим (Zhang *et al.*, 2001; Joshi, Nayak, 2010) факторам, а также как способ фиксации в одном генотипе сочетания серии целевых генов, перенесенных от разных родителей (пирамидирование генов), например, для закрепления гетерозиса (Maluszynski *et al.*, 2001).

Для получения ДГ-линий у пшеницы и ее гибридов наиболее часто используют гибридизацию с гаплопродюсерами (Ishii *et al.*, 2010), культуру изолированных микроспор (Shariatpanahi

et al., 2006) и пыльников (Barnabas *et al.*, 2001). Эффективность методов культивирования пыльников и микроспор оценивается по частоте получения жизнеспособных зеленых растений, на основе которых можно сформировать необходимые для дальнейшей работы ДГ-линии (Oleszczuk *et al.*, 2011).

Несмотря на возможность оптимизации всего комплекса методов, реакция пыльников на условия культивирования определяется влиянием генотипа растений (Konieczny *et al.*, 2003). Это обусловлено тем, что каждый из основных этапов андрогенеза (образование эмбриоидов; индукция эмбриоидов к регенерации проростков; развитие зеленых проростков и проростков-альбиносов) находится под независимым генетическим контролем со стороны ядерного генома (Agache *et al.*, 1989; Krzewska *et al.*, 2012) и цитоплазмы (Sági, Barnabás, 1989; Hernandez *et al.*, 2001). Отдельные хромосомы пшеницы (Toyr *et al.*, 2001) и интрогрессированные в ее геном чужеродные хромосомы (Добровольская и др., 2001, 2003) и их сегменты (Henry, Buysen, 1985; Agache *et al.*, 1989; Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Schlegel *et al.*, 2000) могут в зависимости от генотипической среды оказывать существенное влияние на реакцию пыльников при культивировании.

В данной работе была поставлена задача – изучить способность к андрогенезу в культуре пыльников эуплазматических линий мягкой пшеницы и аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и получить дигаплоидные линии – носители этих транслокаций.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходный материал

В работу включены эуплазматические линии (Л-27, Л-31, Л-35), носители пшенично-ржаной (1RS.1BL) и пшенично-пырейной (7DL-7Ai) транслокаций, аллоплазматические рекомбинантные линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ($2n = 42$) с одной 1RS.1BL транслокацией (*H.v*-40, *H.v*-61, *H.v*-70) и двумя транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7Ai (*H.v*-40 × Л-27, *H.v*-61 × Л-31, *H.v*-70 × Л-35). Эуплазматические линии (Л-27, Л-31, Л-35) ранее выделены из сорта яровой мяг-

кой пшеницы Омская 37, сочетающего транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и идентифицированы на наличие пшенично-чужеродных транслокаций в наших предыдущих работах (Трубачеева и др., 2011; Белан и др., 2012). Аллоплазматические рекомбинантные линии мягкой пшеницы (*H. vulgare*)-*T. aestivum* ($2n = 42$) (*H.v*-40 × Л-27, *H.v*-61 × Л-31, *H.v*-70 × Л-35) выделены из популяции F₂ трех соответствующих гибридных комбинаций, где отцовскими линиями служили эуплазматические линии Л-27, Л-31, Л-35. В качестве материнских генотипов при получении гибридов были взяты линии, сформированные на основе отдельных растений ранее созданной и используемой в селекционном процессе аллоплазматической рекомбинантной формы Л-311/00-22 (Belan *et al.*, 2012), в родословной которой по материнской линии присутствует культурный ячмень *H. vulgare* (*H.v*). Форма Л-311/00-22 является носителем транслокации 1RS.1BL (Першина и др., 2013). (По предварительным результатам, пшенично-ржаные транслокации у всех изучаемых линий имеют общее происхождение.)

Культивирование пыльников

Все генотипы растений, включенные в эксперименты по культивированию пыльников, выращивали в гидропонной теплице в один и тот же вегетационный период. Условия предобработки пыльников, их вычленение, составы культуральных сред и условия культивирования были оптимизированы ранее для генотипов пшеницы, носителей пшенично-чужеродных транслокаций (Першина и др., 2013). Пыльники культивировали на среде ПП (Chuang *et al.*, 1978) с добавлением 0,75 мг/л 2,4-Д, сахарозы и мальтозы (по 45 г/л), агара Vacto Difco (8 г/л) при $t = 29$ °С без освещения. Эмбриоподобные структуры диаметром около 1 мм культивировали на среде Гамборга (B5) (Gamborg, Eveleigh, 1968) без фитогормонов при $t = 24$ °С и при непрерывном освещении. Проростки на стадии трех листьев пересаживали в вегетационные сосуды.

Изучение андрогенеза

Особенности андрогенеза оценивали по частоте продуктивных пыльников (образовавших

эмбриоподобные структуры (ЭС)); частоте ЭС к 100 пыльникам; частоте ЭС с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых); частоте всех проростков к общему числу ЭС; доле всех проростков к числу ЭС с регенерацией проростков; числу единичных зеленых проростков и кластеров зеленых проростков; варьированию числа зеленых проростков на один кластер; частоте зеленых проростков к общему числу ЭС; частоте зеленых проростков к общему числу проростков. Число отдельных проростков и их кластеров учитывали при пересадке регенерантов в вегетационные сосуды. Во время уборки оценивали число растений на кластер и растений, завязавших семена. Данные обработаны с помощью программы Statistica v.7.0.61.0.

ПЦР-анализ

Для подтверждения присутствия транслокации 1RS.1BL у аллоплазматических линий *H.v.-40* × Л-27, *H.v.-61* × Л-31, *H.v.-70* × Л-35 и полученных на их основе дигиплоидных линий использован SCAR-маркер *iag95*, сцепленный с генами *Lr26*, *Sr31*, локализованными на коротком плече хромосомы 1R ржи (Mago *et al.*, 2002). (Структура праймеров: F: CTCTGTGGATAGTTACTTGATCGA; R: CCTAGAACATGCATGGCTGTTACA.) Для идентификации пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai использован SCAR-маркер *scm265*, сцепленный с геном *Lr19*, локализованным на хромосоме 7AgL пырея *Ag. elongatum* (Host.) Beauv (Gupta *et al.*, 2006). (Структура праймеров: F: GGCGGATAAGCAGAGCAGAG; R: GGCGGATAAGTGGGTATGG.) Для подтверждения принадлежности изученных линий к аллоплазматическим генотипам (*H. vulgare*)-*T. aestivum* наличие цитоплазмы ячменя *H. vulgare* L. детектировали с помощью ПЦР-ПДРФ анализа маркера хлоропластной ДНК *ucf5* по ранее описанной методике (Першина и др., 2014).

Отбор и изучение дигиплоидных линий

Дигиплоидные линии формировали на основе каждого андрогенного растения, завязавшего семена, и размножали в гидропонной теплице.

Выделяли цитогенетически стабильные линии. Препараты для цитологического анализа готовили по стандартной методике с окрашиванием хромосом по Фельгену. Часть дигиплоидных линий изучали при выращивании на полях ГНУ СибНИИСХ (южная лесостепь) в 2014 г. Посев, выращивание, анализ хозяйственно ценных признаков и устойчивости к грибным патогенам выполнены по рекомендациям В.А. Зыкина с соавт. (2004). Стандартом при изучении дигиплоидных линий являлся сорт яровой мягкой пшеницы Омская 38 (носитель транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При культивировании пыльников всех генотипов на индукционной среде из них развивались эмбриоподобные структуры (одиночные эмбриоиды и полиэмбриоиды) и каллусы. При культивировании на регенерационной среде, как правило, каллусы и часть эмбриоподобных структур оставались без изменения. У некоторых ЭС развивались корни, а у части ЭС развивались одиночные проростки или кластеры проростков.

Способность линий к андрогенезу

У эуплазматических линий Л-27, Л-31, Л-35, носителей пшенично-ржаной 1RS.1BL и пшенично-пырейной 7DL-7Ai транслокаций, способность к андрогенезу в культуре пыльников на всех его этапах подавлена (табл. 1, 2). Каждая из этих линий характеризуется низкими значениями частоты продуктивных пыльников (пыльников с эмбриоподобными структурами), частоты образования эмбриоподобных структур к 100 культивированным пыльникам, частоты эмбриоподобных структур с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых), частоты регенерации всех проростков и зеленых проростков к общему числу эмбриоподобных структур.

Линии (*H. vulgare*)-*T. aestivum* *H.v.-40* × Л-27, *H.v.-61* × Л-31, *H.v.-70* × Л-35, носители транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, характеризуются более высокой способностью как к образованию эмбриоподобных структур, так и к регенерации из эмбриоидов проростков, в том числе зеленых, по сравнению с эуплазматическими линиями

Таблица 1

Результаты культивирования пыльников аллоплазматических и эуплазматических линий мягкой пшеницы с транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7A_i на среде P-II

Линии	Число культивированных пыльников	Число и частота продуктивных пыльников, %	Общее число ЭС и их частота к 100 культивированным пыльникам, %	Число и частота ЭС с регенерацией всех проростков, %	# Общее число проростков и их частота к общему числу ЭС, %
Аллоплазматические 1RS.1BL					
Н.в.-40	472	126 26,7***	739 156***	332 44,9***	657 88,9***
Н.в.-61	270	46 17,0/**/ ***/	257 95,1***	87 33,8***	267 103,8***
Н.в.-70	387	73 18,8***	288 74,4***	56 19,4	229 79,5***
Эуплазматические 1RS.1BL+7DL-7A _i					
Л-27	378	25 6,6	31 8,2	3 9,6	8 25,8
Л-31	360	31 8,6	64 17,7	8 12,5	21 32,8
Л-35	313	23 7,3	50 15,9	7 14,0	14 28,0
Аллоплазматические 1RS.1BL+7DL-7A _i					
Н.в.-40 × Л-27	354	74 20,9(*)***	215 60,7(***)***	98 45,5***	203 94,4(**)***
Н.в.-61 × Л-31	276	42 15,2***	103 37,3(***)***	45 43,6***	314 304,8(***)***
Н.в.-70 × Л-35	292	57 19,5***	188 64,3(**)***	77 40,9(***)***	187 99,4(***)***

Примечание. ЭС – эмбриоподобные структуры; # альбиносы и зеленые проростки. Разница по сравнению с линиями Л-27, Л-31 и Л-35 достоверна при *** $p < 0,001$, по сравнению с линией Л-31 при ***/ $p < 0,01$, с линиями Л-27 и Л-35 при ***/ $p < 0,01$; по сравнению с линиями Н.в.-40, Н.в.-61, Н.в.-70 достоверна при (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ и (***) $p < 0,001$.

Л-27, Л-31, Л-35 с транслокациями 1RS.1BL+7DL-7A_i.

Источниками цитоплазмы аллоплазматических рекомбинантных линий Н.в.-40 × Л-27, Н.в.-61 × Л-31, Н.в.-70 × Л-35 с транслокациями 1RS.1BL+7DL-7A_i были соответствующие аллоплазматические рекомбинантные линии Н.в.-40, Н.в.-61, Н.в.-70 – носители транслокации 1RS.1BL. Сравнение значений показателей андрогенеза у каждой из аллоплазматических рекомбинантных линий Н.в.-40 × Л-27, Н.в.-61 × Л-31, Н.в.-70 × Л-35, несущих две транслокации,

1RS.1BL и 7DL-7A_i, с их материнскими линиями Н.в.-40, Н.в.-61 и Н.в.-70, носителями одной транслокации 1RS.1BL, выявило следующие особенности.

Значения таких показателей, как частота продуктивных пыльников и частота эмбриоподобных структур к 100 пыльникам, у аллоплазматических рекомбинантных линий с двумя транслокациями, 1RS.1BL+7DL-7A_i, были ниже или на уровне значений этих показателей андрогенеза у аллоплазматических рекомбинантных линий, несущих только пшенично-ржаную

Таблица 2

Развитие зеленых проростков и кластеров зеленых проростков из эмбриоподобных структур аллоплазматических и эуплазматической линий мягкой пшеницы с транслокациями 1RS.1BL и 1RS.1BL+7DL-7Ai на регенерационной среде

Линии	Соотношение всех проростков к числу ЭС с регенерацией проростков	Число единичных зел. пр./число кластеров зел. пр. и варьирование зел. пр. в кластере	Зеленые проростки			Число и частота фертильных растений, %
			Всего	Частота к общему числу ЭС, % [#]	Частота к общему числу проростков, % [#]	
Аллоплазматические 1RS.1BL						
<i>H.v.</i> -40	1,97	9/14 2–28	161	21,7***	24,5/***/	64 39,7
<i>H.v.</i> -61	3,06	5/6 2–2	136	52,9***	50,9/***/	22 16,1
<i>H.v.</i> -70	4,08	2/6 3–15	87	30,2***	37,9/***/	20 22,9
Эуплазматические 1RS.1BL+7DL-7Ai						
Л-27	2,66	0/0	0	0	0	0
Л-31	2,62	2/0	2	3,1	9,5	0
Л-35	2,0	0/1	6	12,0	42,8	4 66,6
Аллоплазматические 1RS.1BL+7DL-7Ai						
<i>H.v.</i> -40 × Л-27	2,07	0/7 5–26	97	45,1(***)***	47,7(***)/***/	42 43,3
<i>H.v.</i> -61 × Л-31	6,97	1/14 3–30	213	206,7(***)***	67,8(***)/***/	32 15,0
<i>H.v.</i> -70 × Л-35	2,42	2/6 8–33	105	55,8(***)***	56,1(***)	21 20,0

Примечание. # Число ЭС и общее число проростков (альбиносы + зеленые) представлены в табл. 1.

Разница по сравнению с линиями Л-27, Л-31, Л-35 достоверна при *** $p < 0,001$; по сравнению с линиями Л-27 и Л-31 при *** $p < 0,001$; по сравнению с линиями *H.v.*-40, *H.v.*-61, *H.v.*-70 при *** $p < 0,001$.

транслокацию 1RS.1BL (табл. 1). Что касается таких показателей андрогенеза, как частота эмбриоподобных структур к 100 пыльникам; частота эмбриоподобных структур с регенерацией всех проростков (альбиносов и зеленых); частота всех регенерировавших проростков к общему числу эмбриоподобных структур (табл. 1), а также частота зеленых проростков к общему числу эмбриоподобных структур (табл. 2), то у аллоплазматических рекомбинантных линий *H.v.*-40 × Л-27, *H.v.*-61 × Л-31, *H.v.*-70 × Л-35, носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, они достоверно выше, чем у их материнских

аллоплазматических рекомбинантных линий с транслокацией 1RS.1BL.

Особенности регенерации проростков

При культивировании эмбриоподобных структур (отдельных эмбриоидов и полиэмбриоидов) на регенерационной среде не все из них проявили способность к регенерации проростков. Однако, как следует из данных, представленных в табл. 2, у всех генотипов в среднем из одной эмбриоподобной структуры развитие получало более одного проростка (табл. 2). Так,

минимальная величина соотношения числа проростков к числу эмбриоподобных структур, проявивших способность к регенерации, составила 1,97 (линия *H.v.-40*), а максимальная – 6,97 (линия *H.v.-61* × *Л-31*).

На примере изучения развития зеленых проростков выявлено, что у всех аллоплазматических рекомбинантных линий *H.v.-40* × *Л-27*, *H.v.-61* × *Л-31*, *H.v.-70* × *Л-35*, носителей двух транслокаций, 1RS.1BL и 7DL-7Ai, и линий *H.v.-40*, *H.v.-61*, *H.v.-70*, носителей одной транслокации 1RS.1BL, преимущественно развивались не единичные проростки, а кластеры проростков (табл. 2). Источниками кластеров проростков являются полиэмбриониды (андрогенные полиэмбрионы). Минимальное число проростков в кластерах ряда линий составляло два, а максимальное, выявленное у линии *H.v.-61*, – 42 проростка. Среди эуплоидных линий, носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, только у линии *Л-35* наблюдали развитие одного кластера зеленых проростков.

Преимущественное развитие более одного проростка из одной эмбриоподобной структуры объясняет тот факт, что для некоторых показателей андрогенеза их значения составили более 100 %. Так, частота всех регенерировавших проростков к числу эмбриоподобных структур у линии *H.v.-61* × *Л-31* и линии *H.v.-61* составила соответственно 304,7 и 103,8 % (табл. 1).

Формирование и изучение дигаплоидных линий

Среди андрогенных растений, достигших колосения, были выявлены стерильные растения, растения, завязавшие единичные зерна, и растения с полным восстановлением фертильности. По частоте андрогенных растений, проявивших частичную или полную фертильность, нет достоверных различий между аллоплазматическими рекомбинантными линиями, носителями одной транслокации 1RS.1BL и носителями двух транслокаций, 1RS.1BL и 7DL-7Ai (табл. 2). Источниками дигаплоидных линий стало каждое растение, завязавшее семена. На данном этапе в работу по формированию дигаплоидных линий были включены только 42-хромосомные цитогенетически стабильные растения, сформированные на основе андрогенных растений

с полным восстановлением фертильности. На основании ПЦР-анализа выделяли растения, носители генов *Lr26* и *Lr19*. В селекционные испытания было включено 12 сформированных дигаплоидных линий.

По результатам первого года испытаний для дальнейшего селекционного процесса отобрано четыре линии, носители транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai (табл. 3).

Эти линии характеризуют высокая полевая устойчивость к полеганию (высший балл – 5), урожайность на уровне стандарта или превышающая его и устойчивость к бурой ржавчине. Данные по устойчивости к стеблевой ржавчине не приведены, поскольку в год испытания ее распространения не наблюдали. Генотипы с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL характеризуются повышенной урожайностью, но не устойчивы к бурой ржавчине.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как следует из результатов, полученных в настоящей работе, между аллоплазматическими рекомбинантными линиями (*H. vulgare*)-*T. aestivum* и эуплазматическими линиями мягкой пшеницы, носителями двух транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai, сильно выражены различия по проявлению признаков андрогенеза в культуре пыльников. У эуплазматических линий в отличие от аллоплазматических рекомбинантных линий образование эмбриоподобных структур и развитие проростков сильно подавлены. Это согласуется с ранее полученными данными (Першина и др., 2013) о низкой способности к андрогенезу у сорта пшеницы Омская 38 и его сестринского сорта Омская 37, – источника эуплазматических линий *Л-27*, *Л-31*, *Л-35*, использованных в настоящей работе. При этом низкая способность к андрогенезу у этих сортов не зависела от условий выращивания растений (Наши неопубл. данные).

Показано, что у генотипов мягкой пшеницы с пшенично-пырейной транслокацией 7DL-7Ai образование андрогенных эмбрионидов и регенерация зеленых проростков подавлены (Sibikeeva, Sibikeev, 1996; Сибикеева и др., 2004). Для генотипов мягкой пшеницы с пшенично-ржаной транслокацией 1RS.1BL, напротив, во многих случаях проявляется

Таблица 3

Результаты отбора перспективных дигаплоидных линий

Обозначение ДГ-линии	Урожайность, т/га	Вегетационный период, сут	Высота растений, см	Устойчивость к полеганию, балл	Поражаемость патогенами к концу вегетации, %		Наличие генов, определяющих устойчивость к бурой ржавчине
					МР	БР	
Стандарт Омская 38	3,0	100	105	5	70	5	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ35-1	3,01	98	95	5	40	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ35-2	3,43	97	95	5	40	15	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ(<i>H.v.</i> -40 × Л-27)-1	3,77	98	95	5	50	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ(<i>H.v.</i> -40 × Л-27)-2	2,91	104	95	5	40	0	<i>Lr26+Lr19</i>
ДГ (<i>H.v.</i> -40)-2	3,86	97	100	5	40	60	<i>Lr26</i>
ДГ (<i>H.v.</i> -40)-3	4,45	98	110	5	30	70	<i>Lr26</i>

Примечание. МР – мучнистая роса, БР – бурая ржавчина.

повышенная способность к образованию эмбриоидов и развитию проростков (Henry *et al.*, 1985; Schlegel *et al.*, 2000), в том числе зеленых проростков (Schlegel *et al.*, 2000).

Из этого следует, что у изученных в наших работах эуплазматических линий Л-27, Л-31, Л-35 и сортов пшеницы Омская 37, Омская 38, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, в проявлении признаков андрогенеза доминирует негативное влияние пшенично-пырейной транслокации 7DL-7Ai.

Однако, как следует из результатов настоящей работы, изменение генотипической среды, в которой функционируют эти транслокации, приводит к изменению реакции пыльников к условиям культивирования: у аллоплазматических рекомбинантных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* – носителей транслокаций 1RS.1BL и 7DL-7Ai – негативное влияние пшенично-пырейной транслокации подавлено. Об аналогичном эффекте изменения генотипической среды на супрессирующее влияние транслокации 7DL-7Ai на андрогенез известно и из другого примера: у генотипов пшеницы, у которых помимо транслокации 7DL-7Ai функционируют гены (*Pro1+Pro2*) (определяющие высокое содержание белка в зерне), увеличивается частота образования андрогенных эмбриоидов и регенерации зеленых проростков (Сибикеева и др., 2004).

В предыдущих наших работах показано, что аллоплазматические рекомбинантные линии

(*H. vulgare*)-*T. aestivum* при разных условиях культивирования пыльников проявляют повышенную способность к андрогенезу (Першина и др., 1999; 2013). У всех аллоплазматических линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, изученных в настоящей работе, основным источником регенерировавших проростков являются полиэмбриоиды (андрогенные полиэмбрионы). Образование андрогенных полиэмбрионов отмечали и в культуре пыльников мягкой пшеницы (Сельдимирова и др., 2009) и тритикале (Oleszczuk *et al.*, 2014).

По нашим данным (Першина и др., 2005, 2007), в условиях *in vivo* проявление полиэмбрионии является одним из фенотипических признаков, обусловленных взаимодействием цитоплазмы ячменя *H. vulgare* и хромосомы ржи 1R. Это согласуется с данными об аналогичном контроле проявления полиэмбрионии и в другой системе взаимодействия между цитоплазмой и хромосомой ржи: у аллоплазматической линии мягкой пшеницы Salmon – носителя цитоплазмы *Aegilops kotschy* Boiss. и хромосомы ржи 1RS – происходит развитие близнецов (Tsunewaki, 1996).

По-видимому, у аллоплазматических рекомбинантных линий (*H.v.*-40 × Л-27, *H.v.*-61 × Л-31, *H.v.*-70 × Л-35), несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai, определяющим фактором повышенной способности к андрогенезу в культуре пыльников является взаимное влияние цитоплазмы ячменя и хромосомы ржи 1RS.

Интерес к генотипам мягкой пшеницы, в том числе и дигаплоидным линиям, в геноме которых присутствуют две транслокации – пшенично-ржаная 1RS.1BL и пшенично-пырейная 7DL-7Ai – обусловлен тем, что они являются носителями генов, определяющих устойчивость к грибным патогенам. На хромосоме 1RS локализован кластер сцепленных генов *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (Singh *et al.*, 1990), а на сегменте хромосомы пырея в транслокации 7DL-7Ai – кластер генов *Lr19/Sr25* (Liu *et al.*, 2010). И если каждый из генов, *Lr26* и *Lr19*, ответственных за устойчивость к бурой ржавчине, к настоящему времени практически утратил эффективность, то их комбинация обеспечивает высокую устойчивость к популяциям листовой ржавчины (Сюков, Зубов, 2008).

Это подтверждают и результаты, полученные в настоящей работе. Из данных, приведенных в табл. 3, видно, что при выращивании в поле дигаплоидные линии, носители комбинации генов *Lr26+Lr19*, устойчивы к популяциям бурой ржавчины, а дигаплоидные линии, носители только гена *Lr26*, – неустойчивы. Более того, ген *Sr25* является одним из немногих генов, который определяет устойчивость пшеницы к патогенам стеблевой ржавчины, в том числе и появившейся в последние годы агрессивной расе Ug99 + Sr24 (ТТКСТ) (Jin *et al.*, 2007). Сорта яровой мягкой пшеницы селекции СибНИИСХ с транслокациями 1RS.1BL и 7DL-7Ai, т. е. сочетающие гены *Sr31* и *Sr25*, также устойчивы к этой расе стеблевой ржавчины (Белан и др., 2012). Это, по-видимому, обусловлено доминирующим влиянием гена *Sr25*, поскольку сорта с транслокацией 1RS.1BL, длительное время защищенные от стеблевой ржавчины функционированием гена *Sr31*, поражаются агрессивной расой стеблевой ржавчины Ug99 (Pretorius *et al.*, 2000).

Получение в настоящей работе дигаплоидных линий, сформированных на основе растений, регенерировавших из разных типов эмбриоподобных структур и проявивших неодинаковый уровень фертильности, предполагает как возможность отбора новых линий для селекционных испытаний, так и необходимость их дальнейшего изучения для выяснения возможных проявлений гаметоклональной изменчивости, индуцированной условиями *in vitro* в культуре пыльников.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа; современное состояние и проблемы развития» № 30.36 и РФФИ (проект № 14-04-00674).

ЛИТЕРАТУРА

- Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М., Бадаева Е.Д., Зеленский Ю.И., Блохина Н.П., Шепелев С.С., Першина Л.А. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7Ai // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 178–186.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Влияние хромосом ржи на особенности андрогенеза у пшенично-ржаных замещенных линий *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29/*Secale cereale* L., сорта Онохойская и тритикале // Генетика. 2001. Т. 37. № 5. С. 624–630.
- Добровольская О.Б., Першина Л.А., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Сравнение эффекта хромосом ржи 1R и 5R на особенности андрогенеза при культивировании пыльников пшенично-ржаных замещенных линий в зависимости от происхождения линий // Генетика. 2003. Т. 39. № 3. С. 570–574.
- 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. рекомендации. СО РАСХН, СибНИИСХ, ФГОУ ВПО БГАУ, УФА, 2004. 39 с.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Нумерова О.М., Шумный В.К. Эффективность получения гаплоидных растений в культуре пыльников и при отдаленных скрещиваниях злаков // Физиология и биохимия культурных растений. 1999. Т. 31. № 3. С. 196–202.
- Першина Л.А., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Раковцева Т.С., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Особенности скрещиваемости, проявления гаплоидии и полиэмбрионии в гибридных комбинациях между культурным ячменем *H. vulgare* L. ($2n = 14$) и пшенично-ржаными замещенными линиями *Triticum aestivum* L. сорта Саратовская 29/*Secale cereale* L. сорта Онохойская // Генетика. 2005. Т. 40. № 6. С. 784–792.
- Першина Л.А., Осадчая Т.С., Бадаева Е.Д., Белан И.А., Россеева Л.П. Изучение особенностей андрогенеза в культуре пыльников сортов и перспективной формы яровой мягкой пшеницы западносибирской селекции, различающихся наличием или отсутствием пшенично-чужеродной транслокации // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 1. С. 40–49.
- Першина Л.А., Раковцева Т.С., Белова Л.И., Девяткина Э.П., Силкова О.Г., Кравцова Л.А., Щапова А.И. Влияние хромосом ржи *Secale cereale* L. 1R и 3R на проявление полиэмбрионии в гибридных комбинациях между аллоплазматическими рекомбинантными линиями (*Hordeum* L.)-*Triticum* и пшенично-ржаными замещенными линиями *Triticum aestivum* L./*Secale*

- cereale* L. // Генетика. 2007. Т. 43. № 7. С. 955–962.
- Першина Л.А., Трубочеева Н.В., Синявская М.Г., Девяткина Э.П., Кравцова Л.А. Ядерно-цитоплазматическая совместимость и изучение состояния районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у аллоплазматических рекомбинантных и интрогрессивных линий (*H. vulgare*)-*T. aestivum* // Генетика. 2014. Т. № 10. С. 196–202.
- Сельдиминова О.А. Формирование полиэмбрионов в культуре *in vitro* пыльников пшеницы // Физиология и биохимия культурных растений. 2009. Т. 41. № 6. С. 531–538.
- Сибикеева Ю.Е., Сибикеев С.Н., Крупнов В.А. Влияние *Lr19*-транслокации на андрогенез *in vitro* и наследование устойчивости к листовой ржавчине в популяциях DH_3 -линий и F_2 гибридов мягкой пшеницы // Генетика. 2004. Т. 40. № 9. С. 1224–1228.
- Сюков В.В., Зубов Д.Е. Генетическая коллекция мягкой пшеницы по устойчивости к бурой листовой ржавчине // Методические рекомендации. Самара: СамНЦ РАН, 2008. 24 с.
- Трубочеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А., Осадчая Т.С., Кравцова Л.А., Колмаков Ю.В., Блохина Н.П., Першина Л.А. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 18–24.
- Agache S., Bacheller B., Buysse J., Henry Y., Snape J. Genetic control of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 77. P. 7–11.
- Barnabas B., Szakacs É., Karsai I., Bedő Z. *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamental to practical application // Euphytica. 2001. V. 119. P. 211–216.
- Belan I.A., Rosseva L.P., Rosseev V.M., Morgounov A.I., Zelenskiy Y.I., Gulyaeva E.I., Baranova O.A., Badaeva E.D., Pershina L.A. Using of alien genetic material in spring bread wheat breeding in Western Siberia // Eur. Cereals Genet. Co-operative Newslett. 2012. P. 113–115.
- Chu C.-G., Friesen T.L., Xu S.S., Faris J.D., Kolmer J.A. Identification of novel QTL for seedling and adult resistance in a wheat doubled haploid population // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 263–269.
- Chuang C.C., Ouyang J.W., Chia H., Chou S.M., Ching C.K. A set of potato media for wheat anther culture // Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Peking: Sci. Press., 1978. P. 51–56.
- Gamborg O.L., Eveleigh D.E. Culture methods and detection of glucanases in suspension cultures of wheat and barley // Can. J. Biochem. 1968. V. 46. P. 417–421.
- Germana M.A. Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 839–857.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.V., Haque Q.M. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 113. P. 1027–1036.
- Henry Y., Buysse J. Effect of the 1B/1R translocation on anther-culture ability in wheat // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. P. 307–310.
- Hernandez P., Barcelo P., Martin A., Cabrera A. The effect of *Hordeum chilense* and *Triticum* cytoplasm on anther culture response of tritirdeum // Plant Cell Rep. 2001. V. 20. P. 542–546.
- Humphreys M.W., Gasior D., Lesniewska-Bocianowska A., Zwierzykowski Z., Rapacz M. Androgenesis as a means of dissecting complex genetic and physiological controls: selecting useful gene combinations for breeding freezing tolerant grasses // Euphytica. 2007. V. 158. P. 337–345.
- Ishii T., Ueda T., Tanaka H. Chromosome elimination by wide hybridization between Triticeae or oat plant and pearl millet: pearl millet chromosome dynamics in hybrid embryo cell // Chromosome Res. 2010. V. 18. P. 821–831.
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W., Wanyera R., Kinyua M., Njau P., Pretorius Z.A. 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.
- Joshi R.K., Nayak S. Gene pyramiding – a broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crop // Biotechnol. and Mol. Biol. Rev. 2010. V. 5. P. 51–60.
- Konieczny R., Czaplicki A.Z., Golczyk H., Przywara L. Two pathways of plant regeneration in wheat anther culture // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2003. V. 73. P. 177–187.
- Krzewska M., Czyczyło-Mysza I., Dubas E., Golebiowska-Pikania G., Golemić E., Stojalowski S., Chrupek M., Zur I. Quantitative trait loci associated with androgenic responsiveness in triticale (*× Triticosecale* Wittm.) anther culture // Plant Cell Rep. 2012. V. 31. P. 2099–2108.
- Liu S., Yu L.-X., Singh R.P., Jin Y., Sorrells 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.
- Mago R., Spielmeier W., Lawrence J., Lagudah S., Ellis G., Pryor A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 104. P. 1317–1324.
- Maluszynski M., Szarejko I., Barriga P., Balcerzyk A. Heterosis in crop mutant crosses and production of high yielding lines using doubled haploid systems // Euphytica. 2001. V. 120. P. 387–398.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Lukaszewski A.J. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (*× Triticosecale* Wittmack) // Plant Cell Rep. 2011. V. 30. P. 575–586.
- Oleszczuk S., Tyrka M., Zimny J. The origin of clones among androgenic regenerants of hexaploid triticale // Euphytica. 2014. V. 198. P. 325–336.
- 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.
- Sági L., Barnabás B. Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. P. 867–872.
- Schlegel R., Belchev I., Kostov K., Atanasova M. Inheritance of high anther culture response in hexaploid wheat,

- Triticum aestivum* L. var. 'Svilena' // Bulg. J. Agric. Sci. 2000. No. 6. P. 261–270.
- Shariatpanahi M.E., Belogradova K., Hessamvaziri L., Heberle-Bors E., Touraev A. Efficient embryogenesis and regeneration in freshly isolated and cultured wheat (*Triticum aestivum* L.) microspores without stress pretreatment // Plant Cell Rep. 2006. V. 25. No. 12. P. 1294–1299.
- Sibikeeva Yu.E., Sibikeev S.N. Genetic analysis of anther culture response in wheat carrying alien translocations // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 782–785.
- Singh N.K., Shepherd K.W., McIntosh R.A. Linkage mapping of genes for resistance to leaf, stem and stripe rust and ω -secalins on the short arm of rye chromosome 1R // Theor. Appl. Genet. 1990. V. 80. P. 609–616.
- Torp A.M., Hansen A.L., Andersen S.B. Chromosomal regions associated with green plants regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture // Euphytica. 2001. V. 119. P. 377–387.
- Tsunewaki K. Plasmon analysis as the counterpart of genome analysis // Methods of Genome Analysis in Plant / Ed. P.P. Jauhar. Boca Raton, N.Y.: a.o. CRC Press, 1996. P. 271–299.
- Zhang X.Q., Wang X.P., Ross K., Hu H., Gustafson J.P. Rapid introduction of disease resistance from rye into common wheat by anther culture of a 6x triticales \times nulli-tetrasomic wheat // Plant Breeding. 2001. V. 120. P. 39–42.

**ANDROGENESIS ABILITY IN COMMON WHEAT EUPLASMIC LINES
AND ALLOPLASMIC RECOMBINANT LINES (*H. VULGARE*)-*T. AESTIVUM*
POSSESSING 1RS.1BL AND 7DL-7Ai TRANSLOCATIONS
AND PRODUCTION OF DOUBLE HAPLOID LINES**

**T.S. Osadchaya¹, L.A. Pershina^{1,2}, N.V. Trubacheeva¹,
I.A. Belan³, L.P. Rosseeva³, E.P. Devyatkina¹**

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

² Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia,
Cytology and Genetics Department;

³ Siberian Agricultural Research Institute Siberian Branch of the Russian Academy
of Agricultural Sciences, Omsk, Russia

Summary

Androgenesis ability was studied in anther cultures of euplasmic lines of common wheat and alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations. The ability to produce androgenic structures and plantlet regeneration are suppressed in lines carrying both translocations. Alloplasmic recombinant lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations, as well as alloplasmic lines with 1RS.1BL translocation, are characterized by increased ability to create androgenic structures, including polyembryos, and plantlet regeneration as compared to euplasmic lines. The inducing reciprocal influence of barley cytoplasm and rye chromosome 1RS on the androgenesis ability of lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum* with 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations is discussed. Double haploid lines were developed from androgenic plants with spontaneously doubled chromosome numbers and restored fertility. Of the lines carrying the translocations, the most promising with regard to the manifestation of commercially valuable traits and resistance to diseases were selected in order to utilize them in breeding programs.

Key words: anther culture, androgenesis, alloplasmic lines (*H. vulgare*)-*T. aestivum*, 1RS.1BL and 7DL-7Ai translocations.

УДК 575.222.73+575.853'316.7

СПАРИВАНИЕ ГОМЕОЛОГИЧНЫХ ХРОМОСОМ У ОТДАЛЕННЫХ АЛЛОГАПЛОИДНЫХ ГИБРИДОВ РОДА *SOLANUM*

© 2014 г. Т.А. Гавриленко^{1,2}, Г.И. Пендинен¹, В.-М. Рокка³,
О.Ю. Антонова¹, Р. Тиме⁴

¹ Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия,
e-mail: tatjana9972@yandex.ru;

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

³ MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

Изучено спаривание хромосом в мейозе уникальных аллогаплоидных гибридов, полученных с использованием методов клеточной и хромосомной инженерии. Использованы две комбинации гибридов: 1) между дигаплоидом культурного картофеля *Solanum tuberosum* (AA-геном, $2n = 2x = 24$) и дикорастущим видом *S. etuberosum* (EE, $2n = 2x = 24$); 2) между культурным томатом *S. lycopersicum* (LL, $2n = 2x = 24$) и *S. etuberosum* (EE, $2n = 2x = 24$). Хромосомоспецифичные ВАС-клоны картофеля и пробы дифференциально меченой тотальной ДНК родительских видов позволили идентифицировать конъюгирующие хромосомы и их геномную принадлежность. У аллогаплоидов *S. tuberosum* с *S. etuberosum* геномного состава АЕ обнаружено до 7 межгеномных бивалентов на клетку; хиазмы формируются в дистальном районе длинного плеча каждой хромосомы набора; хиазмы в коротком плече имеют хромосомы 3, 6, 11 и 12. Для андрогенных регенерантов соматических гибридов *S. lycopersicum* с *S. etuberosum* характерен в основном унивалентный мейоз; редкие биваленты (от 0 до 2 на клетку) образованы гомеологами хромосом 4 и 6. Обсуждаются перспективы предложенного подхода, основанного на использовании методов соматической гибридизации и *in vitro* андрогенеза, для изучения спаривания гомеологичных хромосом и разработки стратегии интрогрессивной гибридизации отдаленных видов растений.

Ключевые слова: *Solanum*, картофель, томат, *Etuberosum*, отдаленная гибридизация, спаривание гомеологичных хромосом, FISH, GISH.

ВВЕДЕНИЕ

Межвидовая гибридизация остается одним из основных экспериментальных подходов для расширения генетического разнообразия важнейших представителей рода *Solanum*: культурного картофеля *Solanum tuberosum* (геномная формула AAAA, $2n = 4x = 48$) и культурного томата *S. lycopersicum* (LL, $2n = 2x = 24$), характеризующихся невысокой внутривидовой генетической вариабельностью (Ross, 1986; Bai, Lindhout, 2007). Всего 10 % видов секции *Petota*, объединяющей более 200 дикорастущих видов

картофеля, были вовлечены в селекционный процесс с использованием традиционных методов гибридизации (Gavrilenko, 2011). Кроме того, барьеры несовместимости ограничили гибридизацию как культурного картофеля, так и томатов (секция *Lycopersicon*) с дикорастущими неклубненосными видами секции *Etuberosum* рода *Solanum* (EE, $2n = 2x = 24$), являющихся источником устойчивости к важнейшим вирусным заболеваниям и их переносчикам (Valkonen *et al.*, 1992а, б), мокрым гнилям (McGrath *et al.*, 2002), низким положительным температурам (Hawkes, 1994).

Традиционные исследования по межвидовой гибридизации включают скрещивания исходных родительских видов и в случае стерильности отдаленных гибридов – их диплоидизацию с целью получения фертильных амфидиплоидов и создания интрогрессивных форм в поколениях беккроссов. Анализ мейоза исходных гибридов и амфидиплоидов позволяет исследовать особенности взаимодействия геномов родительских видов и прогнозировать возможность переноса посредством гомеологичной рекомбинации генов дикорастущих видов, повышающих адаптивность культурных растений.

Среди различных причин, влияющих на конъюгацию хромосом в мейозе межвидовых гибридов, большое значение имеет структурная дивергенция гомеологичных хромосом. Виды секций *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* рода *Solanum* имеют сходные кариотипы; базовый тип хромосомного набора представлен 12 хромосомами, большинство из которых сложно однозначно идентифицировать на уровне световой микроскопии из-за небольших размеров и сходной морфологии. В исследованиях по сравнительному генетическому картированию установлен высокий уровень коллинеарности ДНК маркеров на гомеологичных хромосомах представителей этих секций, за исключением относительно небольшого числа участков, вовлеченных в хромосомные перестройки. Большая часть исследований относится к изучению коллинеарности маркеров на хромосомах А и L геномов картофеля и томата, которые отличаются по пяти перицентрическим инверсиям (Tankley *et al.*, 1992; Doganlar *et al.*, 2002). Информация о гомологии геномов А–Е и L–Е ограничена одной работой (Perez *et al.*, 1999), выполненной с использованием небольшого числа ПДРФ маркеров, в которой были выявлены участки хромосом, консервативные для видов *S. tuberosum*, *S. etuberosum*, *S. lycopersicum*, и перестройки, различающие гомеологичные хромосомы. В последние годы для идентификации индивидуальных хромосом и изучения структурной организации гомеологичных хромосом представителей рода *Solanum* успешно применяются методы молекулярной цитогенетики (Gavrilenko, 2011). В исследованиях по сравнительному картированию ВАС-клонов, содержащих хромосомоспецифичные последовательности

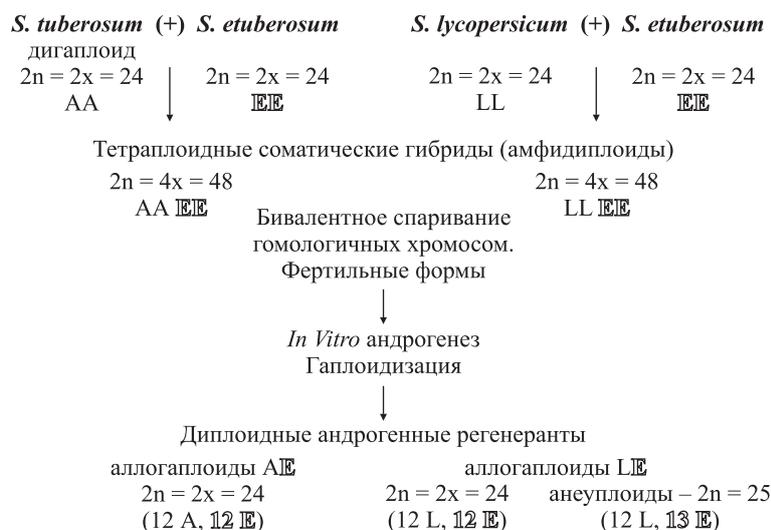
картофеля и томата, на пахитенных хромосомах *S. tuberosum*, *S. etuberosum*, *S. lycopersicum* продемонстрирован высокий уровень эволюционного консерватизма кариотипов этих видов. В этих работах показано, что наиболее частыми событиями в кариотипической эволюции представителей секций *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* являются парацентрические инверсии (Iovene *et al.*, 2008; Lou *et al.*, 2010; Szinay *et al.*, 2012). Важно отметить, что информация об изменениях структурной организации гомеологичных хромосом А, Е и L геномов пока еще неполная, исследованы хромосома 6 и отдельные участки гомеологичных хромосом 5, 9, 10, 11, 12.

Возможности интрогрессивной гибридизации значительно расширились благодаря развитию методов клеточной и хромосомной инженерии. Так, слияние соматических клеток позволяет в один этап синтезировать амфидиплоидные формы филогенетически отдаленных видов растений. В разных лабораториях получены соматические гибриды между нескрещиваемыми видами рода *Solanum*, в том числе относящимися к секциям *Petota*, *Etuberosum*, *Lycopersicon* (Gavrilenko *et al.*, 1992, 2001, 2003; Helgeson *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1999; Novy *et al.*, 2002). В большинстве комбинаций отобраны фертильные тетраплоидные соматические гибриды (геномный состав ААЕЕ, LLEE), которые были успешно вовлечены в возвратные скрещивания. Однако потенциал межгеномной рекомбинации у синтезированных соматических гибридов оценить достаточно сложно, поскольку для них характерен регулярный бивалентный мейоз – спаривание происходит между гомологами (Dong *et al.*, 1999; Gavrilenko *et al.*, 2001, 2012).

С целью изучения возможности гомеологичной конъюгации хромосом А–Е и L–Е геномов, а также для оценки перспектив интрогрессивной гибридизации видов секций *Petota*, *Etuberosum* и *Lycopersicon* нами разработана оригинальная схема, направленная на получение аллогамных гибридов, имеющих гаплоидные наборы хромосом родительских видов (рис. 1).

Схема включает гаплоидизацию соматических гибридов (амфидиплоидов) с использованием андрогенеза *in vitro* и изучение потенциала межгеномной рекомбинации у полученных

Слияние протопластов соматических клеток



Изучение спаривания гомеологичных хромосом

Стратегия интрогрессивной гибридизации:

- | | |
|--|---|
| ↓
1. Возвратные скрещивания.
Изучение интрогрессии у гибридов
BC_2-BC_3 AAAA(EE') с учетом данных
по распределению хиазм у аллоглоидов.
2. Поиск аллоглоидов, формирующих
нередуцированные (FDR) гаметы.
3. Возможность слияния протопластов,
изолированных из пыльцы аллоглоидов,
с протопластами сортов картофеля | ↓
Индуцирование
межгеномных
хромосомных перестроек
у фертильных
соматических гибридов
(амфидиплоидов) |
|--|---|

Рис. 1. Схема получения аллоглоидов (андрогенных регенерантов) между нескрещиваемыми видами рода *Solanum* и стратегия интрогрессивной гибридизации.

андрогенных регенерантов. В данной работе представлены результаты изучения гомеологичного спаривания хромосом аллоглоидов различного геномного состава, выполненного на основе ВАС-FISH и GISH.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На основе метода слияния протопластов ранее были получены межвидовые тетраплоидные соматические гибриды в двух комбинациях: 1) между дигаплоидом возделываемого картофеля *S. tuberosum* (AA, $2n = 2x = 24$) Т67 и диким не клубненосным видом секции *Etuberosum* – *S. etuberosum* (EE, $2n = 2x = 24$), образец k-9141 (Gavrilenko *et al.*, 2003) и 2) между культурным томатом *S. lycopersicum* (LL, $2n = 2x = 24$)

сорт Tamina и *S. etuberosum* (EE, $2n = 2x = 24$), образец k-9141 (Gavrilenko *et al.*, 1992, 2001) (рис. 1). Эти гибриды характеризуются строгой – бивалентной гомологичной конъюгацией хромосом. Таким образом, синтезированные гибриды содержат два диплоидных набора хромосом родительских видов, являясь амфидиплоидами с геномным составом: AAEE ($2n = 4x = 48$) в комбинации *S. tuberosum* с *S. etuberosum* и LLEE ($2n = 4x = 48$) в комбинации *S. lycopersicum* с *S. etuberosum*.

Андрогенные регенеранты были получены при культивировании пыльников тетраплоидных соматических гибридов (амфидиплоидов) с использованием модифицированного метода *in vitro* андрогенеза (Rokka *et al.*, 2000). Для отбора регенерантов, содержащих предположительно

полные гаплоидные наборы хромосом родительских видов, был использован GISH (рис. 1). В настоящем исследовании участвовали андрогенные регенеранты: (1) анеуплоидный генотип 15.5.b.1.1.1 ($2n = 25$, 12 хромосом L генома и 13 хромосом E генома) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (Gavrilenko *et al.*, 2001) и (2) диплоидные ($2n = 24$) генотипы E15 и E18 комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*, геномный и хромосомный составы которых определены в данной работе. Названия видов и секций даны в соответствии с последними таксономическими ревизиями изучаемых секций рода *Solanum* (Contreras, Spooner, 1999; Peralta *et al.*, 2008).

Флюоресцентная *in situ* гибридизация (FISH). Бутоны помещали в фиксатор 3 : 1 (96 %-й этанол : ледяная уксусная кислота), фиксации хранили в морозильнике ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$). Пыльники мацерировали в растворе ферментов (4 %-я целлулаза и 1 %-я пектиназа) при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 95 мин. Отмацерированные ткани суспензировали на предметном стекле в капле 45 %-й уксусной кислоты, осторожно раздавливали, затем препарат замораживали в морозильнике ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$), снимали покровное стекло, высушивали при комнатной температуре. Препараты обрабатывали раствором пепсина в концентрации 0,1 мг/мл в течение 45 мин при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

FISH проводили согласно общепринятым методикам (Leitch *et al.*, 1994) с небольшими модификациями (Pendinen *et al.*, 2008) с использованием хромосомспецифичных ВАС-клонов картофеля (Iovene *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009), меченных биотином или дигоксигенином методом nick-трансляции. Каждая смесь для гибридизации включала дифференциально меченые (DIG-УТР и Biotin-УТР) ДНК двух ВАС-клонов. Перед нанесением на препарат смесь для гибридизации инкубировали 8 мин при $85\text{ }^{\circ}\text{C}$. После нанесения на препарат 20 μl денатурированной смеси стекла 5 мин инкубировали при $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Препараты помещали на ночь (16–20 ч) в термостат для гибридизации при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. После гибридизации и отмывки препаратов меченную дигоксигенином ДНК детектировали анти-DIG-родамин-конъюгатом, меченую биотином ДНК – авидин-FITC-конъюгатом. Затем препараты промывали три раза в буфере $4\times\text{SSC}$ при $42\text{ }^{\circ}\text{C}$, контрастировали 4,6-диа-

мино-2-фенилиндолом (DAPI) и заключали в Vectashield antifade (Vector Laboratories).

На препаратах изучали тип и частоту ассоциаций меченых хромосом на стадии диакинеза–метафазы I, а также отмечали участие разных плеч хромосом в образовании бивалентов.

После FISH на тех же препаратах проводили репробинг с использованием дифференциально меченой тотальной ДНК родительских видов. GISH проводили согласно общепринятым методикам (Leitch *et al.*, 1994) с небольшими модификациями (Pendinen *et al.*, 2008), используя в пробе для гибридизации дифференциально меченые ДНК родительских видов в соотношении 1 : 1. Тотальную ДНК *S. etuberosum* метили дигоксигенином, а ДНК *S. tuberosum* и *S. lycopersicum* – биотином (DIG- или Biotin-Nick Translation Mix, Roche). Меченую дигоксигенином ДНК детектировали анти-DIG-родамин- или анти-DIG-fluorescein-конъюгатом (Roche Diagnostics), а меченую биотином ДНК – стрептовидин-Cy3- (Dianova) или авидин-FITC-конъюгатом (Roche Diagnostics).

При сопоставлении FISH и GISH результатов, соответствующих одной и той же клетке, определяли геномную принадлежность меченых ВАС-клонами хромосом, образующих биваленты. Кроме того, при изучении GISH изображений считали среднюю частоту межгеномных бивалентов на клетку.

Микроскопия и анализ препаратов.

Препараты анализировали с использованием эпифлюоресцентного микроскопа Olympus BX60. Для создания и обработки изображений использованы совмещенная с микроскопом камера SenSys CCD (charge coupled device, Roper Scientific, Tucson, AZ) и программа IPLab Spectrum v3.1 software (Signal Analytics, Vienna, VA) для компьютера Macintosh.

SSR-, STS- и CAPS- маркеры. В работе был использован набор из 132 пар праймеров, специфичных к последовательностям индивидуальных локусов генома *A. S. tuberosum* с известной хромосомной локализацией. Маркеры были отобраны по литературным источникам, а также разработаны нами на основе информации о картированных монолокусных последовательностях генома картофеля (Milbourne *et al.*, 1998; Oberhagemann *et al.*, 1999; Feingold *et al.*, 2005; <http://www.gabipd.org/database/maps.shtml>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Доказательство аллогамного состояния андрогенных регенерантов соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*

Анализ геномного и хромосомного состава диплоидных ($2n = 24$) андрогенных регенерантов включал три подхода: 1) GISH митотических препаратов, выявивший у диплоидных регенерантов (E15 и E18) 12 хромосом А генома *S. tuberosum* и 12 хромосом Е генома *S. etuberosum*; 2) FISH, проведенный с набором хромосомоспецифичных ВАС клонов, маркирующих все хромосомы набора (табл. 1). Данные FISH мейотических хромосом показали, что гибридационный сигнал каждого ВАС-клона идентифицируется только на двух хромосомах андрогенных регенерантов. Эти результаты с учетом данных GISH доказывают, что отобранные диплоидные андрогенные регенеранты гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* содержат 12 пар гомеологичных хромосом, соответствующих гаплоидным наборам хромосом родительских видов ($2n = 2x = 24$, геномная формула АЕ); 3) параллельно проведен молекулярно-генетический анализ. Из 132 проанализированных пар хромосомоспецифичных праймеров большинство не образовывали ПЦР-продукты с ДНК дикого вида *S. etuberosum* или не выявляли различий между исходными родительскими формами. По результатам ПЦР анализа отобрано 35 пар праймеров, генерировавших у родительских видов полиморфные ПЦР-фрагменты либо непосредственно (1 STS и 20 SSR маркеров), либо после обработки соответствующими рестриктазами (14 CAPS маркеров) (табл. 2). У андрогенных регенерантов E15 и E18 соматических гибридов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* были выявлены диагностические фрагменты всех 35 маркерных локусов *S. etuberosum*.

Изучение спаривания хромосом аллогамноидов *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*

Согласно результатам GISH, аллогамноиды геномного состава АЕ характеризуются низким уровнем спаривания хромосом и формируют

от 0 до 7 бивалентов на клетку; мультиваленты отсутствуют. Результаты GISH показали, что фактически все биваленты представлены гомеологичными ассоциациями хромосом (за исключением случая выявления в единичной клетке одного бивалента картофеля). Число межгеномных бивалентов в среднем на клетку составляет 3,09 (у изученных генотипов E15 и E18 эти значения близки – 2,94 и 3,23, поэтому в дальнейшем приведены суммарные данные для аллогамноидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*).

Изучение спаривания индивидуальных хромосом аллогамноидов проведено при сопоставлении изображений, полученных в ВАС-FISH анализе, с изображениями тех же мейоцитов после GISH. Было показано, что у аллогамноидов геномного состава АЕ все хромосомы набора могут участвовать в формировании межгеномных бивалентов. Чаще всего спариваются гомеологичные хромосомы 4, 5 и 6 (в случае хромосом 11 и 12 выводы делать сложно из-за относительно небольшого числа изученных мейоцитов) (табл. 1; рис. 2, а–г). Хиазмы локализованы в основном в длинных плечах хромосом; локализация хиазм в коротких плечах отмечена для хромосом 3, 6, 10 и 12 (табл. 1). Практически все биваленты являются открытыми, с хиазмами в дистальных участках хромосом; кольцевой бивалент в единичном случае сформирован гомеологами хромосомы 10 (табл. 1).

Отдельно следует остановиться на данных конъюгации гомеологов хромосомы 3, формирующих межгеномный бивалент (рис. 2, д; табл. 1). У аллогамноидов геномного состава АЕ в биваленте, образованном гомеологами хромосомы 3, гибридационные сигналы RH079E02 (3L) и RH078O14 (3S) видны и в длинном, и в коротком плечах хромосомы 3 картофеля *S. tuberosum*, тогда как в другой меченой хромосоме бивалента оба эти маркера лежат в дистальном районе одного и того же плеча (рис. 2, д). Анализ локализации маркеров хромосомы 3 – RH079E02 (3L) и RH078O14 (3S) у дикого вида *S. etuberosum* подтвердил, что оба эти маркера локализованы в дистальной части одного и того же плеча, при этом маркер короткого плеча RH078O14 расположен дистальнее маркера длинного плеча RH079E02 (рис. 2, е).

Таблица 1

Частота спаривания гомеологичных хромосом у аллогаплоидов двух комбинаций:
S. tuberosum (+) *S. etuberosum* (AE) и *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (LE)

Хромосома	ВАС-клоны и их локализация в коротком (S) или длинном (L) плече хромосом картофеля	Число изученных МКП*	Число / % МКП с бивалентами, образованными меченой парой хромосом		
			всего	с хиазмой в L плече	с хиазмой в S плече
Аллогаплоиды комбинации <i>S. tuberosum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>					
1	RH083J12 (S) RH096H03 (L)	17	6/ 35,29 ± 11,59	6/ 35,29 ± 11,59	0
2	RH075N07 (L)	24	5/ 20,83 ± 8,29	5/ 20,83 ± 8,29	0
3	RH078O14 (S) RH079E02 (L)	45	15/ 33,33 ± 7,03	14/ 31,11 ± 6,90	1/ 2,22 ± 2,20
4	RH191L87 (L) RH162B09 (S)	45	19/ 42,22 ± 7,36	19/ 42,22 ± 7,36	0
5	RH044A21 (S) RH081B09 (L)	54	27/ 50,0 ± 6,62	27/ 50,0 ± 6,62	0
6	RH103A21 (L) RH 160K03 (S)	57	26/ 45,6 ± 6,59	25/ 43,9 ± 6,57	1/ 1,6 ± 1,66
7	RH186I02 (S) RH075O19 (L)	27	5/ 18,52 ± 7,48	5/ 18,52 ± 7,48	0
8	RH122E19 (L) RH122L16 (S)	32	7/ 21,88 ± 7,96	7/ 21,88 ± 7,96	0
9	RH135I22 (S) RH168F09 (L)	17	3/ 17,64 ± 9,24	3/ 17,64 ± 9,24	0
10	RH178K07 (S) RH184D02 (L)	31	6/ 27,27 ± 8,00 (1-ring)	2/ 9,09 ± 5,16	5/ 22,72 ± 7,53
11	RH204G21 (L) RH042C12 (S)	6	1/ 16,7 ± 15,23	1/ 16,7 ± 15,23	0
12	RH084C24 (S) RH106P06 (L)	7	2/ 28,5 ± 12,5	0	2/ 28,5 ± 12,5
Аллогаплоиды комбинации <i>S. lycopersicum</i> (+) <i>S. etuberosum</i>					
1	RH083J12 (S)	23	0	0	0
3	RH078O14 (S) RH079E02 (L)	13	0	0	0
4	RH162B09 (S)	23	2/ 8,7 ± 5,88	2/ 8,7 ± 5,88	0
5	RH044A21 (S)	44	0	0	0
6	RH103A21 (L) RH060H14 (L)	30	3/ 10,0 ± 5,48	3/ 10,0 ± 5,48	0
7	RH186I02 (S)	13	0	0	0
9	RH135I22 (S)	32	0	0	0

Примечание. * МКП – материнские клетки пыльцы. В подавляющем числе случаев ассоциации гомеологичных хромосом представлены открытыми (rod) бивалентами; в скобках указаны случаи формирования закрытых кольцевых бивалентов (ring).

Таблица 2

Список отобранных хромосомспецифичных маркеров, выявляющих полиморфизм родительских форм – дигаплоида культурного картофеля *S. tuberosum* Т67 и дикого вида *S. etuberosum*, образец к-9141

Хромосома	Название маркера	
	SSR-маркеры	CAPS- и STS-маркеры
1	STM1029; STM2020; STG0016	GP264/ TaqI
2	STM5114	–
3	Sti050	Chr 3-1/ HinfI; GP25/ TaqI; St4cl/ MboI
4	Sti026; Sti055	Chr 4-2/ AluI; GP83/ DdeI
5	Sti032	Chr 5-1/ HinfI
6	Sti045	GP76/ TaqI
7	Sti008; Sti025; Sti064	–
8	Sti027; Sti048; STM0024	GP170
9	Sti014; Sti057	GP97/HinfI; GP260/AluI; prp1/AluI
10	STG0025	GP218/ TaqI
11	Sti039	–
12	Sti054	GP122-718/ MseI; IPM4/ HaeIII

Анализ спаривания хромосом аллогамноидов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*

Такой же подход был применен к андрогенным регенерантам гибридов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum*, для которых характерен в основном унисвалентный мейоз. По данным GISH, у этих гибридов обнаружено от 0 до 2 межгеномных бивалентов при среднем числе 0,38 на клетку. Для гибридов этой комбинации результаты FISH удалось получить с ВАС-клонами семи хромосом, хиазмы были выявлены только в длинных плечах хромосом 4 и 6 (табл. 1; рис. 2, ж, з); во всех случаях хиазмы регистрировали в дистальных участках этих хромосом. Гомеологичные хромосомы 1, 3, 5, 7 и 9 не формировали биваленты; сигналы гибридизации соответству-

ющих хромосомспецифичных маркеров детектировали только в унисвалентах (рис. 2, ж).

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на то что геномы культурных видов картофеля и томата секвенированы, данные по сравнительному анализу структуры гомеологичных хромосом этих важнейших представителей рода *Solanum* еще немногочисленны. К настоящему времени опубликованы результаты по сравнительному FISH картированию на пахитенных хромосомах 5S, 6S, 6L, 9S, 10L, 11S, 12S *S. tuberosum* (А-геном), *S. etuberosum* (Е-геном) и *S. lycopersicum* (L-геном) хромосомспецифичных ВАС-клонов картофеля и томата (Lou *et al.*, 2010; Szinay *et al.*, 2012). Выявлены участки гомеологичных хромосом с одинаковым порядком расположения маркеров и районы, вовлеченные в хромосомные перестройки. Хорошо известно, что изменения структурной организации гомеологичных хромосом являются одной из причин нарушения межгеномной конъюгации у гибридов. Мы сопоставили полученные результаты изучения распределения хиазм на хромосомах аллогамноидов с литературными данными.

Согласно данным Szinay с соавт. (2012), молекулярно-цитогенетические маркеры располагаются в одинаковом порядке в коротких плечах гомеологичных хромосом 5, 6, 11, 12 *S. tuberosum* и *S. etuberosum*, эти участки А и Е геномов коллинеарны. По нашим данным, у аллогамноидов геномного состава АЕ хиазмы формируются в коротких плечах хромосом 6 и 12; случаев локализации хиазм в 5S и 11S не обнаружено; кроме того, у аллогамноидов хиазмы отмечены в участках 4S и 10S (табл. 1).

Lou с соавт. (2010) сообщили о перичентрической инверсии хромосомы 6, различающей А и Е геномы, и продемонстрировали коллинеарность дистальных участков обоих плеч хромосомы 6. Согласно нашим результатам, у аллогамноидов геномного состава АЕ хиазмы выявлены в дистальном районе длинного плеча и с более низкой частотой – в дистальном районе короткого плеча хромосомы 6 (табл. 1).

Szinay с соавт. (2012) описали крупную парацентрическую инверсию, захватывающую генетический материал всего короткого плеча

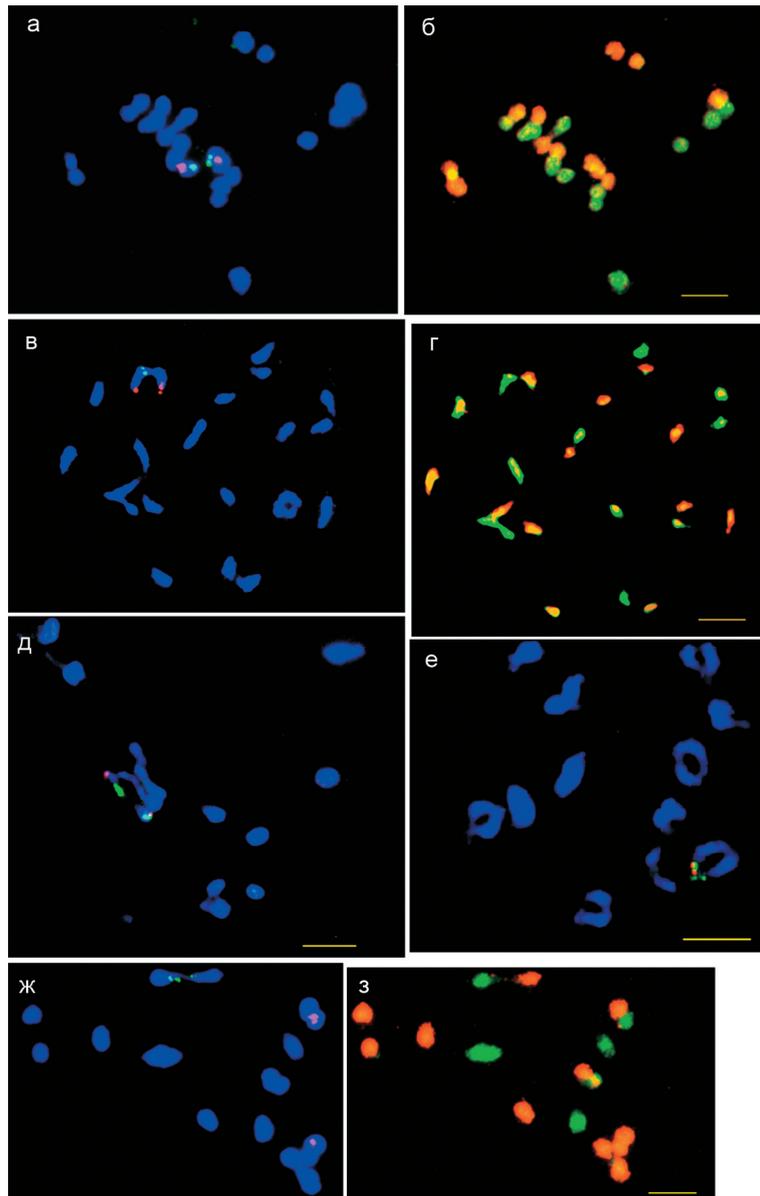


Рис. 2. FISH с хромосомспецифичными маркерами картофеля и GISH тех же мейоцитов аллоглоидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum* (геномный состав AE (а-д)) и анеуплоидного андрогенного регенеранта (геномный состав LE) комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* (ж, з).

а, б – маркеры хромосомы 5: RH044A21 (DIG-red, короткое плечо) и RH081B09 (BIO-green, длинное плечо) – хиазма в длинном плече (а), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-red) и *S. tuberosum* (BIO-green) – бивалент с маркерами хромосомы 5 образован гомеологами (б);

в, г – маркеры хромосомы 6: RH160A21 (DIG-red, длинное плечо) и RH160K03 (BIO-green, короткое плечо) – хиазма в коротком плече (в), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-red) и *S. tuberosum* (BIO-green) – бивалент с маркерами хромосомы 6 образован гомеологами (г);

д – маркеры хромосомы 3: RH078O14 (DIG-red, короткое плечо) и RH079E02 (BIO-green, длинное плечо) – хиазма с участием длинного плеча *S. tuberosum* и немаркированного плеча *S. etuberosum*;

е – диакинез у *S. etuberosum* – FISH с маркерами хромосомы 3: RH078O14 (DIG-red, короткое плечо) и RH079E02 (BIO-green, длинное плечо), оба маркера локализованы в одном плече;

ж, з – фрагмент клетки анеуплоидного андрогенного регенеранта 15.5b.1.1.1 ($2n = 25$) геномного состава LE: маркеры хромосомы 5: RH044A21 (DIG-red, короткое плечо) и хромосомы 6 – RH060H14 (BIO-green, длинное плечо) (ж), та же клетка после репробинга с дифференциально мечеными ДНК *S. etuberosum* (DIG-green-(FITS)) и *S. lycopersicum* (BIO-red-(Cy3)) (з). Идентифицирован открытый бивалент, образованный гомеологами хромосомы 6 с хиазмой в длинном плече; гомеологичные хромосомы 5 представлены унивалентами; закрытый бивалент образован гомологичными хромосомами *S. etuberosum*. Шкала – 5 μm.

хромосомы 7, а также множественные перестройки в коротком плече хромосомы 9. У аллогаплоидов геномного состава АЕ не обнаружено ни одной хиазмы в коротких плечах хромосом 7 и 9, что согласуется с литературными данными.

Еще одна парацентрическая инверсия, различающая геномы А и Е, обнаружена Szinaу с соавт. (2012) в длинном плече хромосомы 10. По нашим данным, в дистальном районе длинного плеча хромосомы 10 хиазмы формируются (табл. 1). В то же время Szinaу с соавт. (2012) не исключают, что инверсия в 10L может быть локализована в субтеломерном гетерохроматине.

Результаты изучения конъюгации у андрогенных регенерантов гибридов *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* также не противоречили литературным данным. Так, отсутствие хиазм в участках 5S, 6S, 7S и 9S у гибридов с геномным составом LE согласуется с данными Szinaу с соавт. (2012) о наличии в этих районах крупных парацентрических инверсий, различающих L и E геномы. К сожалению, для гибридов LE нам не удалось получить данные FISH с маркерами, специфичными к районам 11S и 12S, в которых Szinaу с соавт. (2012) также обнаружили крупные парацентрические инверсии.

Одинаковый порядок расположения молекулярно-цитогенетических маркеров на гомеологичных хромосомах L и E геномов сохраняется только в длинном плече хромосомы 10 и в дистальном районе длинного плеча хромосомы 6 (Lou *et al.*, 2010; Szinaу *et al.*, 2012). У гибридов геномного состава LE хиазмы выявлены в дистальном районе длинного плеча хромосомы 6, а для длинного плеча хромосомы 10 данные об образовании хиазм отсутствуют (табл. 1). Кроме того, мы обнаружили хиазмы в длинном плече хромосомы 4, но для этого участка еще нет литературных данных по сравнительному ВАС-FISH анализу.

Изучение конъюгации хромосом аллогаплоидов позволило получить новую информацию, дополняющую литературные данные. Согласно нашим результатам, терминальные хиазмы формируются в длинных плечах фактически всех хромосом набора, что указывает на коллинеарность соответствующих районов А и Е геномов. Ранее известные литературные данные по сравнительному ВАС-FISH картированию участков

длинных плеч гомеологичных хромосом А и Е геномов ограничены только районами 6L и 10L. Кроме того, мы обнаружили перестройку хромосомы 3, различающую А и Е геномы.

Помимо коллинеарности, спаривание гомеологичных хромосом в мейозе гибридов зависит от разных причин и прежде всего от действия генетических систем, контролирующих синапсис хромосом. Индукция гомеологичной рекомбинации может быть обусловлена мутациями генов, подобных *Ph1* мягкой пшеницы, переключающих гомологичный бивалентный синапсис на гомеологичный (Dvorak *et al.*, 2006; Griffiths *et al.*, 2006; Al-Kaff *et al.*, 2007) или допускающих негомологичный синапсис – мутации генов типа *sy10* ржи (Mikhailova *et al.*, 2006). Поскольку у амфидиплоидов геномного состава LLEE и AAEE спаривание происходит только между гомологичными хромосомами (Gavrilenco *et al.*, 2001, 2012), можно полагать, что у них также функционируют гены типа *Ph1*, хотя у представителей рода *Solanum* подобные генетические системы до настоящего времени не идентифицированы.

Полученная в данном исследовании информация важна для разработки стратегии дальнейших исследований по интрогрессивной гибридизации (рис. 1). Низкий уровень гомеологичного спаривания хромосом L и E геномов у андрогенных регенерантов комбинации *S. lycopersicum* (+) *S. etuberosum* указывает на необходимость использования индуцированного мутагенеза, например, радиационных воздействий, для интрогрессии в геном томата генетического материала *S. etuberosum*.

Иные подходы могут быть использованы для аллогаплоидов комбинации *S. tuberosum* (+) *S. etuberosum*, имеющих более высокий уровень гомеологичного спаривания (рис. 1; табл. 1). Так, в целях интрогрессии генов *S. etuberosum* в геном картофеля посредством гомеологичной рекомбинации реализуется традиционный подход с возвратными скрещиваниями фертильных соматических гибридов; получены гибриды потомства BC₂–BC₃ с геномным составом AAAA(E'), в том числе устойчивые к вирусам и их переносчикам (Dong *et al.*, 1999; Novy *et al.*, 2002; Gavrilenco *et al.*, 2003). Изучение процессов интрогрессии этих BC гибридов показало, что разрешающей способности GISH недоста-

точно для визуализации обменов, которые, судя по полученным в настоящей работе результатам, наиболее вероятны в терминальных участках гомеологических хромосом А и Е геномов. Поэтому для изучения процессов интрогрессии у ВС гибридов перспективно использование молекулярно-генетических методов. Сформированный в ходе данного исследования набор полиморфных хромосомоспецифических SSR, STS, CAPS-маркеров необходимо расширять, уделяя при отборе наибольшее внимание тем маркерам, которые локализованы в терминальных участках, имеющих наибольший потенциал для переноса посредством гомеологической рекомбинации.

Для использования рекомбинационного потенциала аллогамноидов с геномным составом АЕ в селекционно-генетических программах возможны и другие подходы (рис. 1). Например, перспективен поиск генотипов, формирующих нередуцированные FDR гаметы. Кроме того, возможно осуществление второго цикла соматической гибридизации культурного картофеля с протопластами, изолированными из пыльцы аллогамноидов. Методы получения протопластов из пыльцы разработаны для разных объектов (Fang *et al.*, 2006).

Обсуждая перспективы предложенного подхода, основанного на использовании соматической гибридизации и *in vitro* андрогенеза для планирования стратегии интрогрессивной гибридизации отдаленных видов растений, отметим, что методы преодоления нескрещиваемости, слияния протопластов и получения аллогамноидов хорошо разработаны для широкого круга объектов (Davey *et al.*, 2005). Однако успех интрогрессивной гибридизации во многом зависит от потенциала гомеологической рекомбинации. Поэтому информация о характере взаимодействия геномов родительских видов имеет первостепенное значение. Предложенная схема, включающая использование методов клеточной и хромосомной инженерии для получения амфидиплоидов и аллогамноидов, и последующее изучение у них спаривания гомеологических хромосом наиболее перспективны для отдаленных нескрещиваемых видов растений, для которых молекулярно-цитогенетические и молекулярно-генетические подходы слабо разработаны и информация об изменениях струк-

турной организации гомеологических хромосом пока не доступна.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Dr. M. Iovene, Prof. J. Jiang (University Wisconsin-Madison, USA) за предоставление меченых ДНК ВАС-клонов; ассистента К. Mäkelä (МТТ) – за индукцию диплоидных регенерантов. Авторы сердечно благодарят д.б.н. И.Н. Голубовскую за ценные критические замечания.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке фонда МНТЦ (проект № 3329) и двустороннего российско-германского сотрудничества (проект № 131).

ЛИТЕРАТУРА

- Al-Kaff N., Knight E., Bertin I., Foote T., Hart N., Griffiths S., Moore G. Detailed dissection of the chromosomal region containing the *Ph1* locus in wheat *Triticum aestivum*: with deletion mutants and expression profiling // *Annals Bot.* 2007. V. 101. P. 1–10.
- Bai Y., Lindhout P. Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? // *Annals Bot.* 2007. V. 100. P. 1085–1094.
- Contreras-M., Spooner D. Revision of *Solanum* section *Etuberosum* // *Solanaceae IV: advances in biology and utilization* / Eds M. Nee, D. Symon, P. Jessop. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K, 1999. P. 227–245.
- Davey M., Anthony P., Power J., Lowe C. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives // *Biotechnol. Adv.* 2005. V. 23. P. 131–171.
- Doganlar S., Frary A., Daunay M., Lester R., Tanksley S. A comparative genetic linkage map of eggplant (*Solanum melongena*) and its implications for genome evolution in the *Solanaceae* // *Genetics*. 2002. V. 161. P. 1697–1711.
- Dong F., Novy R., Helgeson J., Jiang J. Cytological characterization of potato – *Solanum tuberosum* somatic hybrids and their backcross progenies by genomic in situ hybridization // *Genome*. 1999. V. 42. No. 5. P. 987–992.
- Dvorak J., Deal K.R., Luo M.-C. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors // *Genetics*. 2006. V. 174. P. 17–27.
- Fang K., Zhang L., Lin J. A rapid, efficient method for the mass production of pollen protoplasts from *Pinus bungeana* and *Picea wilsonii* // *Flora*. 2006. V. 201. P. 74–80.
- Feingold S., Lloyd J., Norero N., Bonierbale M., Lorenzen J. Mapping and characterization of new EST-derived microsatellites for potato (*Solanum tuberosum* L.) // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 456–466.
- Gavrilenko T. Application of molecular cytogenetics in fundamental and applied research of potato (Review) // *Genetics, Genomics and Breeding of Potato* / Ed. J. Bradeen, C. Kole. Published by 'Science Publishers'. 1st edition. USA, 2011. Chapter 9. P. 184–206.

- Gavrilenko T., Barbakar N., Pavlov A. Somatic hybridization between *Lycopersicon esculentum* and non-tuberous *Solanum* species of the *Etuberosa* series // Plant Science. 1992. V. 86. P. 203–214.
- Gavrilenko T., Pendinen G., Rokka V.-M., Antonova O., Thieme R. Intergenomic chromosome pairing in the allo-diploid hybrids of *Solanum etuberosum* with tomato and potato: an assessment through GISH and BAC-FISH // The 11th Gatersleben Res. Conf. «Chromosome biology, Genome Evolution and Speciation». 2012. P. 115–116.
- Gavrilenko T., Thieme R., Heimbach U., Thieme T. Genomic *in situ* hybridisation analysis of fertile somatic hybrids of *Solanum etuberosum* (+) dihaploid *Solanum tuberosum* and their backcrossing progenies: relationships of genome dosage with tuber development and resistance to potato virus Y // Euphytica. 2003. V. 131. P. 323–332.
- Gavrilenko T., Thieme R., Rokka V.-M. Cytogenetic analysis of *Lycopersicon esculentum* (+) *Solanum etuberosum* somatic hybrids and their androgenic regenerants // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 103. P. 231–239.
- Griffiths S., Sharp R., Foote T.N., Bertin I., Wanous M., Reader S., Colas I., Moor G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat // Nature. 2006. V. 439. P. 749–752.
- Hawkes J. G. Origins of cultivated potatoes and species relationships // Potato Genetics. UK: CAB Intern., 1994. P. 3–42.
- Helgeson J., Hunt G., Haberlach G., Austin S. Sexual progeny of somatic hybrids between potato and *Solanum brevidens*: potential for use in breeding programs // Amer. J. Potato Res. 1993. V. 70. P. 437–452.
- Iovene M., Wielgus S., Simon P., Buell C., Jiang J. Chromatin structure and physical mapping of chromosome 6 of potato and comparative analyses with tomato // Genetics. 2008. V. 180. P. 1307–1317.
- Leitch A., Schwarzacher T., Jacson D., Leitch I. *In situ* Hybridization: a practical guide. Oxford, Microscopy Handbooks. 27. BIOS Sci. Publ., 1994. 118 p.
- Lou Q., Iovene M., Spooner D., Buell C., Jiang J. Evolution of chromosome 6 of *Solanum* species revealed by comparative fluorescence *in situ* hybridization mapping // Chromosoma. 2010. V. 119. P. 435–442.
- McGrath J., Williams C., Haberlach G., Wielgus S., Uchytel T., Helgeson J. Introgression and stabilization of Erwinia tuber soft rot resistance into potato after somatic hybridization of *Solanum tuberosum* and *S. brevidens* // Amer. J. Potato Res. 2002. V. 79. P. 19–24.
- Mikhailova E., Phillips D., Sosnikhina S., Lovtysus A., Jones R., Jenkins G. Molecular assembly of meiotic proteins Asy1 and Zyp1 and pairing promiscuity in rye (*Secale cereale* L.) and its synaptic mutant *sy10* // Genetics. 2006. V. 174. P. 1247–1258.
- Milbourne D., Meyer R., Collins A.J., Ramsay L., Gerbhardt C., Waugh R. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato // Mol. General Genet. 1998. V. 259. P. 233–245.
- Novy R., Nasruddin A., Ragsdale D., Radcliffe E. Genetic resistances to potato leafroll virus, potato virus Y and green peach aphid in progeny of *Solanum etuberosum* // Amer. J. Potato Res. 2002. V. 79. P. 9–18.
- Oberhagemann P., Chatot-Balandras C., Bonnel E., Schäfer-Pregl R., Wegener D., Palomino C., Salamini F., Gebhardt C. A genetic analysis of quantitative resistance to late blight in potato: Towards marker assisted selection // Mol. Breeding. 1999. V. 5. P. 399–415.
- Pendinen G., Gavrilenko T., Jiang J., Spooner D. Allopolyploid speciation of the tetraploid Mexican potato species revealed by genomic *in situ* hybridization // Genome. 2008. V. 51. P. 714–720.
- Peralta I., Spooner D., Knapp S. The taxonomy of tomatoes: A revision of wild tomatoes (*Solanum* section *Lycopersicon*) and their outgroup relatives in sections *Juglandifolium* and *Lycopersicoides* // Syst. Bot. Monogr. 2008. V. 84. P. 1–186.
- Perez F., Menendez A., Dehal P., Quiros C. Genomic structural differentiation in *Solanum*: comparative mapping of the A- and E-genomes // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 1183–1193.
- Rokka V.-M., Pietilä L., Gavrilenko T., Tauriainen A., Larkka J. Utilization of haploid lines in the genetic improvement of cultivated potato (*Solanum tuberosum* spp. *tuberosum*) // Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells / Ed. B. Bohanec. Bield, Slovenia, 2000. P. 105–110.
- Ross H. Potato Breeding – problems and perspectives. Berlin: Paul Parey, 1986. 132 p.
- Szinay D., Wijnker E., Berg van den R., Visser R., de Jong H., Bai Y. Chromosome evolution in *Solanum* traced by cross-species BAC-FISH // New Phytologist. 2012. V. 195. P. 688–698.
- Tang X., de Boer J., Eck van H., Bachem C., Visser R., Jong de H. Assignment of genetic linkage maps to diploid *Solanum tuberosum* pachytene chromosomes by BAC-FISH technology // Chromosome Res. 2009. V. 17. P. 899–915.
- Tanksley S., Ganai M., Prince J., Bonierbale M. *et al.* High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes // Genetics. 1992. V. 132. P. 1141–1160.
- Valkonen J., Brigneti G., Pehu E. Resistance to *Myzus persicae* (Suls.) in wild potatoes of the series *Etuberosa* // Acta Agr. Scand. 1992a. V. 42. P. 118–127.
- Valkonen J., Brigneti G., Salazar L., Pehu E., Gibson R. Interactions of the *Solanum* subsp. of the *Etuberosa* group and nine potato-infecting viruses and viroid // Ann. Appl. Biol. 1992b. V. 20. P. 301–313.

INTERGENOMIC CHROMOSOME PAIRING IN ALLOHAPLOID HYBRIDS OF GENUS *SOLANUM*

T.A. Gavrilenko^{1,2}, G.I. Pendinen¹, V.-M. Rokka³, O.Y. Antonova¹, R. Thieme⁴

¹ Vavilov Institute of Plant Industry, Saint-Petersburg, Russia,
e-mail: tatjana9972@yandex.ru;

² Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia;

³ MTT Agrifood Research Finland, Biotechnology and Food Research, Jokioinen, Finland;

⁴ Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

Summary

Intergenomic chromosome pairing was analyzed in unique allohaploid hybrids, which had been produced through a process of somatic hybridization followed by a haploidization procedure (*in vitro* androgenesis). Two hybrid combinations were studied: (1) between cultivated potato *S. tuberosum* (dihaploid, $2n = 2x = 24$, AA genome) and wild species *S. etuberosum* ($2n = 2x = 24$, EE genome), (2) between cultivated tomato *S. lycopersicum* (LL, $2n = 2x = 24$) and wild species *S. etuberosum* ($2n = 2x = 24$, EE). Genome and chromosome composition of allohaploids were identified through FISH with chromosome specific BAC clones and GISH. Up to 7 intergenomic bivalents per cell were observed in allohaploids between *S. tuberosum* and *S. etuberosum* (AE); the chiasmata were distributed in the distal regions of long arms of each chromosome and in the short arms of chromosomes 3, 6, 11, 12. Rare bivalents (from 0 to 2) were observed in allohaploids between *S. lycopersicum* and *S. etuberosum* (LE); the chiasmata were distributed in the long arms of chromosome 4 and 6. The perspectives of proposed approach are discussed for application of somatic hybridization and chromosome engineering to study the potential of homeologous pairing and the strategy of introgression.

Key words: *Solanum*, potato, tomato, *Etuberosum*, interspecific hybridization, homeologous chromosome pairing, FISH, GISH.

УДК 575.164

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕСТРОЕК ХРОМОСОМ 2-Й ГОМЕОЛОГИЧЕСКОЙ ГРУППЫ НА МОРФОЛОГИЮ КОЛОСА МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2014 г. О.Б. Добровольская¹, П. Мартинек², И.Г. Адонина¹,
Е.Д. Бадаева³, Ю.Л. Орлов^{1,4}, Е.А. Салина¹, Л.И. Лайкова¹

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

² Agrotest Fyto, Ltd., Kroměříž, Czech Republic;

³ ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия;

⁴ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия,
e-mail: oxanad@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 15 сентября 2014 г. Принята к публикации 9 октября 2014 г.

С помощью современных методов анализа кариотипов растений (С-окрашивание, FISH) охарактеризованы четыре генетически независимые линии мягкой пшеницы с измененной морфологией колоса, связанной с развитием дополнительных колосков в уступах колосового стержня (многоколосковостью). Обнаружено, что три линии несут перестройки хромосом 2-й гомеологической группы: замещение хромосомы 2D, терминальную и интерстициальную делеции. С помощью микросателлитного анализа было определено положение точек разрыва делеций на хромосомах 2D. Обнаружено, что положение делеций на генетических картах хромосом 2D совпадает с положением гена *MRS1*, мутация которого вызывает развитие множества колосков в уступе. Оценка фенотипов колоса многоколосковых делеционных линий и серии делеционных линий с делециями хромосом 2A, 2B 2D, полученных на основе сорта мягкой пшеницы Чайниз Спринг, показала, что делеции хромосом 2-й гомеологической группы могут приводить к изменению морфологии колоса мягкой пшеницы – образованию дополнительных колосков в уступах, изменению длины и плотности колоса.

Ключевые слова: *T. aestivum* L., делеционные линии, дифференциальное С-окрашивание, FISH, микросателлитные маркеры, морфогенез, многоколосковость.

ВВЕДЕНИЕ

Мягкая или хлебная пшеница (*Triticum aestivum* L., ВВААDD $2n = 42$) является одной из основных сельскохозяйственных культур, широко возделывается и потребляется на всех континентах земного шара. Эта зерновая культура обеспечивает до 20 % потребностей человека в калориях, является важным источником белков и витаминов (Shewry, 2009).

Особенности строения соцветия пшеницы определяют важные хозяйственные качества этой культуры, влияют на продуктивность. Соцветие пшеницы представляет собой колос.

Ось колоса состоит из члеников, на верхней части каждого из которых, в уступах колосового стержня, расположено по одному сидячему колоску. Колосок – уникальная структура, характерная только для злаков, представляет собой редуцированную ветвь, содержащую цветки (Malcomber *et al.*, 2006). Обоеполые цветки расположены на оси колоска и защищены цветковыми чешуями. Количество колосков в уступе колосового стержня является одной из ключевых таксономических характеристик трибы Triticeae (Sakuma *et al.*, 2011). У мягкой пшеницы развивается по одному колоску в уступе и появление дополнительных/сверх-

численных колосков наблюдается очень редко. Колосья пшеницы с дополнительными колосками в уступах, независимо от того, где и как они расположены, часто называют ветвистыми, а колосья стандартного типа с одним колоском в уступе – простыми. П. Мартинек и Ж. Беднар (Martinek, Bednar, 2001) предложили классифицировать колосья с нестандартным морфотипом, включая многоколосковые, с учетом особенностей расположения колосков. Например, многорядный колос, *MRS (multirow spike)*, характеризуется развитием кластера сидячих колосков (до 10) в одном уступе, у морфотипов *HS (horizontal spikelets)* и *VS (vertical spikelets)* развивается по два сидячих колоска, которые располагаются рядом по горизонтали (*HS*) или вертикали (*VS*) в одном уступе (Martinek, Bednar, 2001). Кроме того, дополнительные колоски могут формироваться на удлиненной оси колоска или на ветви (тип *GB, genuine branching*). Тип *GB* напоминает ветвистый колос тетраплоидной пшеницы *T. turgidum convar. compositum*. В отличие от гексаплоидной мягкой пшеницы, ветвистые формы тетраплоидной пшеницы тучной *T. turgidum* (AABB) широко распространены. В.Ф. Дорофеев описывает более 20 ветвистых разновидностей *T. turgidum*, ареал произрастания которых совпадает с ареалом *T. turgidum* с простым колосом (Дорофеев, Коровина, 1979). Ветвистые формы *T. turgidum* являются естественными мутантами. Ветвистые разновидности встречаются и у тетраплоидной твердой пшеницы *T. durum*, но редко (Дорофеев, Коровина, 1979). Формы с ветвистым колосом нередко появляются при скрещиваниях мягкой пшеницы с другими видами в результате воздействия мутагенами (Мельник, Пастухов, 1984).

Формирование в уступах дополнительных колосков генетически детерминировано (Pennell, Halloran, 1983; Klindworth *et al.*, 1990; Dobrovolskaya *et al.*, 2009). Степень проявления признака находится под влиянием окружающей среды (Sharman, 1944; Pennell, Halloran, 1983). К появлению дополнительных колосков в колосе может приводить анеуплоидия. Э. Сирс (E.R. Sears) описал явление редупликации колосков у нуллисомиков 2A и 2D мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (Sears, 1954). Показано, что у мягкой пшеницы в генетический контроль

признака вовлечены гены, локализованные в хромосомах 2DS (Лайкова и др., 2005; Dobrovolskaya *et al.*, 2009) и 2AS (Li *et al.*, 2011).

Целью настоящей работы является изучение геномного состава четырех генетически независимых линий пшеницы, представляющих разные морфотипы многоколосковости/ветвистости, с использованием современных методов кариотипирования и микросателлитного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в данной работе послужили линии мягкой пшеницы *T. aestivum* L. с дополнительными колосками в уступах колосового стержня независимого происхождения. Линия *Skle128* характеризуется развитием трех дополнительных колосков в большей части уступов колосового стержня. Линия получена на основе тибетской трехколосковой мягкой пшеницы (Tibetan triple-spikelet wheat, TTSW) *Triticum aestivum* L. conv. *tripletum* nom. nud., собранной в Тибете, Китай (Yang *et al.*, 2005), озимого типа развития. Линия *Sol64* имеет два колоска, расположенных рядом по горизонтали, что характерно для морфотипа *HS* или '*tetra-stichon sessile spikelets*' (syn.) Исходная форма была получена на основе скрещивания ветвистоколосой тетраплоидной пшеницы и мягкой пшеницы с простым колосом Др. Svetka Korić (Agriculture University of Zagreb, Zagreb, Croatia). Линия *Ruc204* – яровая мягкая пшеница с разветвленным колосом по типу *GB «turgidum»*, в уступе колосового стержня развиваются не только дополнительные колоски, но и ветви. Ветвистость проявляется только при выращивании в поле, в условиях гидропонной теплицы в уступах развиваются только дополнительные колоски. Страна происхождения исходной линии '47hh-C' – Китай, однако детали ее происхождения не известны. Линия *Ruc130* – озимая мягкая пшеница с разветвленным колосом по типу *GB «turgidum»*, в уступе колосового стержня развиваются дополнительные колоски и ветви. Происхождение не известно.

Линии с дополнительными колосками были получены Др. П. Мартинек (Petr Martinek, Agrotest Fyto, Ltd., Kromeriz, Czech Republic) при самоопылении исходных форм с последующим

отбором. Все линии стабильно наследуют признак как в полевых условиях, так и в условиях гидропонной теплицы, однако в полевых условиях проявление признака более выражено – получает развитие большее количество дополнительных колосков.

В работе использовали сорт мягкой пшеницы Чайниз Спринг (Chinese Spring, CS) и серию делеционных линий, полученных на основе этого сорта и несущих терминальные делеции хромосом 2-й гомеологической группы: 2DS-4, 2DS-5, 2DL-6, 2DL-7, 2DL-8, 2DL-9, 2AL-1, 2AL-2, 2AL-3, 2BS-1, 2BS-2, 2BS-3, 2BS-6, 2BS-7, 2BS-9, 2BS-11, 2BS-14, 2BL-1, 2BL-3, 2BL-5, 2BL-6, 2BL-7 (Endo, Gill, 1996). Используемые нами линии содержат единственную делецию и поддерживаются в гомозиготном состоянии; подробная информация о линиях доступна на сайте <http://www.k-state.edu/wgrc/Germplasm/Deletions/group2.html>. Растения выращивали в условиях гидропонной теплицы. Фенотип колоса оценивали на стадии колошения.

C-дифференциальное окрашивание проводили по ранее опубликованной методике (Badaeva *et al.*, 1994). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leitz Wetzlar. Для получения изображений использовали цифровую камеру CCD Leica DFC 280. Хромосомы классифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Gill *et al.*, 1991).

Флюоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с зондами на основе клонированных повторенных последовательностей ДНК проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina *et al.*, 2006). Зонды метили биотином или дигоксигенином с помощью ПЦР со специфичными праймерами или с помощью реакции ник-трансляции. Детекция биотинилированных зондов проводилась с помощью флюоресцеин авидина (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories). Сигнал гибридизации усиливался с применением флюоресцеин анти-авидина (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories). Дигоксигенин-меченые зонды выявляли с помощью антител к дигоксигенину, связанных с родамином (Anti-digoxigenin-rhodamine Fab fragments, Roche Applied Science). Препараты заключали в среду, замедляющую выцветание флюоресценции (Vectashield mounting medium,

Vector Laboratories), содержащую 0,5 мкг/мл DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol, Sigma) для окрашивания хромосом, и анализировали с помощью микроскопа «Ахioskop» 2 Plus (Zeiss). Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO).

Микросателлитный анализ выполнен по описанной ранее методике (Добровольская и др., 2009) с использованием маркеров хромосомы 2D, приведенных на рис. 1. Вся необходимая информация о маркерах, включая первичную структуру праймеров, доступна на сайте <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>. Наличие/отсутствие микросателлитного локуса оценивалось по наличию/отсутствию продукта амплификации с заранее известным молекулярным весом, в случае недоступности такой информации хромосомная локализация маркеров определялась с помощью нулли-тетрасомной линии N2DT2A сорта CS.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Кариотипирование хромосом линий So164, Skle128, Ruc204, выполненное с использованием метода C-дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* с пробками pSc119.2 и pAs1, показало, что изучаемые линии имеют 42-хромосомный набор, у всех трех линий были обнаружены хромосомные перестройки, затрагивающие хромосому 2D. У линии So164 обнаружено замещение пары хромосом 2D гомеологичной парой хромосом 2A (рис. 2), таким образом, линия So164 несет замещение N2DT2A. Линии Skle128 и Ruc204 имели 42-хромосомный набор, но короткое плечо хромосомы 2D этих линий было укорочено: у линии Skle128 отсутствовал терминальный бэнд, хромосома укорочена на ~ 50 %, а у линии Ruc204 терминальный бэнд присутствовал, но хромосома была укорочена на ~ 10 %, что указывает на наличие делеций короткого плеча хромосомы 2D. Для уточнения результатов кариотипирования и определения точек разрыва делеций был применен микросателлитный анализ с использованием маркеров, локализованных ранее на генетической карте хромосомы 2D (<http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/>). В результате проведенного анализа было обнаружено, что у линии Skle128

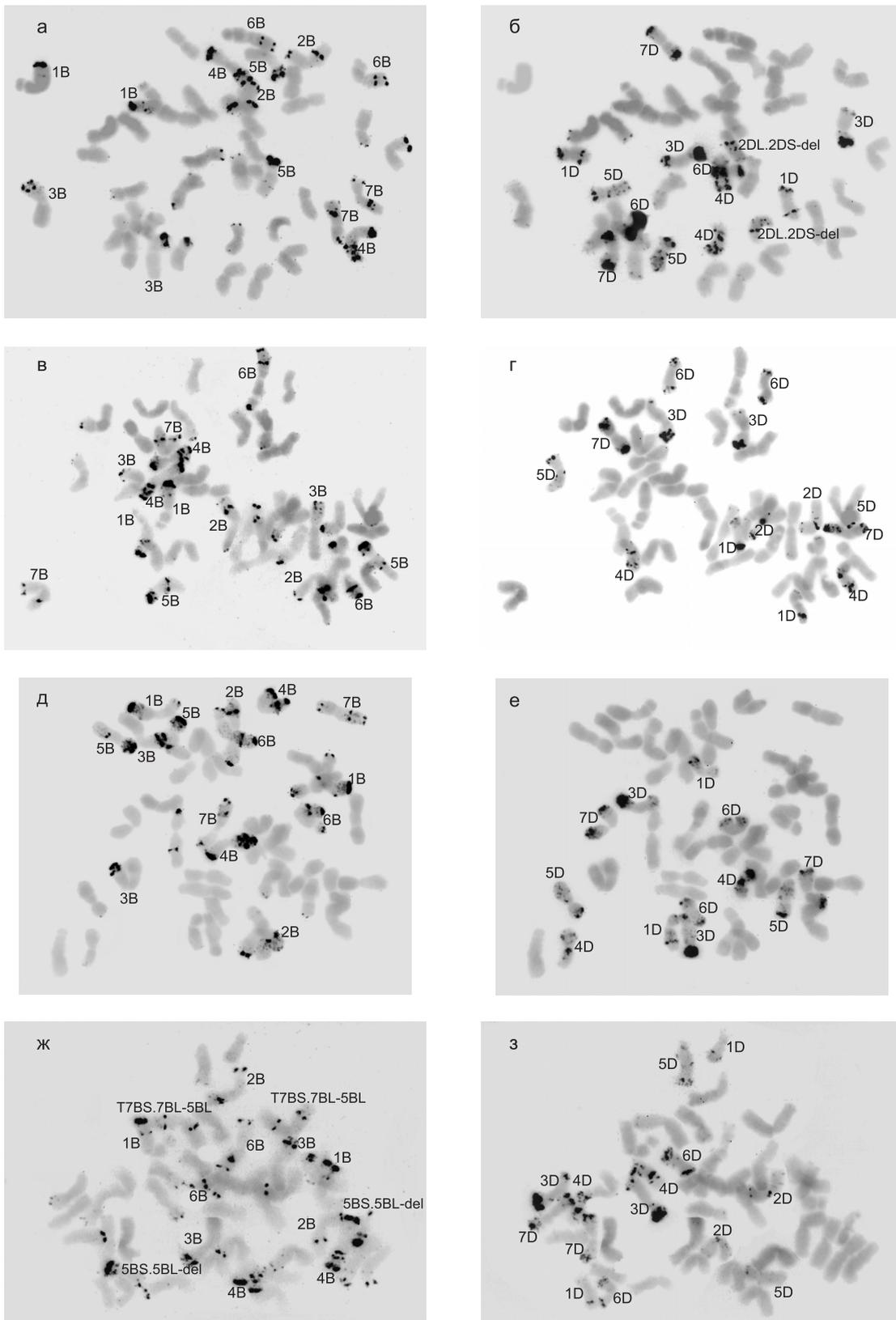


Рис. 2. FISH на метафазных хромосомах линий Skle128 (а, б), Ruc204 (в, г), So164 (д, е), Skle130 (ж, з) с зондами pSc119.2 (слева) и pAs1 (справа).

2014). Полученные нами данные согласуются с результатами ранних исследований (Swaminathan *et al.*, 1966; Košner, Foltýn, 1989), показавших наличие хромосомных перестроек (делеций) у линий пшеницы с дополнительными колосками. Использование нами современных методов кариотипирования в сочетании с микросателлитным анализом позволило установить, что делеции затрагивают короткое плечо хромосомы 2D. Важно отметить, что хромосома 2DS несет ген *MRS1*, мутации которого вызывают формирование множества колосков в уступах колосового стержня (Dobrovolskaya *et al.*, 2008, 2009). Ген *mrs1* локализуется на молекулярно-генетической карте с SSR-маркером *Xwmc453*, который попадает в область терминальной делеции хромосомы 2DS линии Skle128 и интерстициальной делеции 2DS линии Ruc204. Линия Skle128 и *mrs1*-мутанты имеют сходный фенотип колоса, различия связаны, во-первых, с количеством дополнительных колосков: у Skle128 в основном развивается по три колоска в уступе, а у *mrs1*-мутантов – множество колосков; во-вторых, с длиной колоса: Skle128 имеет укороченный колос длиной 5,5 см. Фенотипы линии Ruc204 и *mrs1*-мутантов также сходны. Мутантный фенотип генетически независимого многоколоскового мутанта MC1611 также детерминирован рецессивной мутацией гена, локализованного в хромосоме 2D (Лайкова и др., 2005; Добровольская и др., 2014). Таким образом, мутации гена (генов), локализованного в хромосоме 2DS, делеции области хромосомы 2DS, включая интерстициальную и терминальные делеции, и, наконец, отсутствие хромосомы 2D могут приводить к изменениям морфологии колоса, связанным с формированием дополнительных колосков в уступах.

Э. Сирс в середине 50-х годов прошлого столетия описал появление колосьев с «редупликацией колосков» у растений-нуллисомиков по хромосомам 2A и 2D мягкой пшеницы сорта Чайниз Спринг (CS) (Sears, 1954). Позднее было показано, что эффект нуллисомии может полностью компенсироваться увеличением числа гомеологичных хромосом, и колосья нуллитетрасомной линии Tetra-2A Nulli-2D сорта CS имеют нормальный фенотип, как у дисомного растения (Muramatsu, 2009). В основе компенсации нуллисомного эффекта гомеологичными

хромосомами лежит дупликация генов, и чем больше эффект компенсации, тем меньше дивергенция дублированных (гомеологичных) генов. Мы не обнаружили эффект компенсации у линии Skle128, наличие 4 хромосом 2A не компенсировало отсутствие пары хромосом 2D. Возможно, хромосомы 2A линии Skle128 также несут генетические изменения, и наличие этих хромосом не компенсирует отсутствие пары хромосом 2D, и (или) хромосома 2D несет ген(ы), мутации которого (включая null-мутации в следствие делеций) приводят к проявлению эффекта генов, расположенных в других хромосомах мягкой пшеницы. Известно, что короткое плечо хромосомы 2A тетраплоидных пшениц (AABB) несет ген, детерминирующий появление дополнительных колосков и ветвистости колоса (Haque *et al.*, 2012). Вероятно, этот ген распространен и у гексаплоидных пшениц, но его проявление возможно только в отсутствие 2D/делеции 2DS/мутаций гена *MRS1* (2DS).

По результатам наших исследований делеции короткого плеча 2DS и отсутствие хромосомы 2D могут приводить к изменению фенотипа колоса и развитию дополнительных колосков. У сорта CS отсутствие хромосомы 2D имело сходный, но гораздо менее выраженный, эффект и приводило к развитию дополнительного колоска в одном или нескольких уступах (Sears, 1954). Для того чтобы определить, оказывают ли влияние на морфологию колоса делеции короткого плеча хромосомы 2D и других хромосом 2-й гомеологической группы сорта CS, мы проанализировали фенотип колоса делеционных линий с терминальными делециями 2-й гомеологической группы хромосом. Колосья делеционных линий CS с крупными терминальными делециями 2DS-4 и 2DS-5 были укорочены до 4,8–5,5 см и имели полукомпактоидный скверхедный тип, в уступах развивалось по одному колоску (рис. 1). Интересно отметить, что изучаемая нами линия Skle-128 с крупной терминальной делецией 2DS также имеет укороченный колос. Известно, что компактоидный тип колоса у 28-хромосомных тетраформ мягкой пшеницы, у которых полностью отсутствует геном D, находится под контролем двух рецессивных взаимодействующих генов, но проявляется этот признак в отсутствие хромосом генома D. Так, колос сорта Thatcher имеет

стандартный тип, а колос его тетра-формы, tetraThatcher, – компактоидный тип (Гончаров, 2012). Автор предположил, что у гексаплоидной мягкой пшеницы имеется рецессивный ген(ы), детерминирующий(е) компактоидный тип колоса, но его(их) проявление супрессируется геном или генами генома D. Вероятно, у линии Skle128 и сорта CS также имеются рецессивные гены, обуславливающие компактоидный тип колоса, которые проявляются в отсутствие ~ 50 % терминальной области хромосомы 2DS. Влияние других делеций хромосом 2-й гомеологической группы на компактность колоса нами обнаружено не было. Колосья с «редупликацией колосков» у линий с терминальными делециями хромосомы 2D обнаружены не были. Фенотип линий с делециями короткого плеча хромосомы 2A, которые поддерживаются только в гетерозиготном состоянии (<http://www.k-state.edu/wgrc/Germplasm/Deletions/group2.html>), не оценивался. «Редупликация колосков» была обнаружена только у одной делеционной линии, 2BS-7, при этом двойные колоски развивались не во всех колосьях. Дополнительные колоски в уступах располагались над нормальным колоском, что соответствует описанию Э. Сирса (Sears, 1954). При изучении особенностей развития многоколосковой линии пшеницы MC1611 было обнаружено, что латеральные меристемы, дающие начало дополнительным колоскам, развиваются в плоскостях, перпендикулярных плоскости колоска дикого типа на месте цветковых меристем, и дополнительные колоски этой линии расположены в плоскости, характерной для цветков, т. е. перпендикулярно плоскости колоска дикого типа (Добровольская и др., 2014). Так же располагаются дополнительные колоски линий Skle128, Ruc204, So164 и Ruc130. Возможно, к развитию дополнительных колосков двух типов, характерных для 1) нуллисомных линий сорта CS (Sears, 1954), линии CS с делецией 2BS-7 и 2) линий MC1611, Skle128, Ruc204, So164, приводят разные изменения морфогенеза соцветия и эти изменения могут быть неодинаково генетически детерминированы. В целом следует отметить, что хромосомы 2-й гомеологической группы мягкой пшеницы несут множество генетических локусов, определяющих характеристики колоса, среди них: количество колосков в уступах колосового

стержня (Dobrovolskaya *et al.*, 2009), плотность и длина колоса (Sourdille *et al.*, 2000).

Дж. Мак Кей (Mac Key) показал, что большинство видимых мутаций у мягкой пшеницы вызвано хромосомными перестройками и/или анеуплоидией (Mac Key, 1968). Результаты экспериментов В.М. Мельника и Г.П. Пастухова по изучению цитогенетики морфологических мутаций у мягкой яровой пшеницы подтвердили выводы Мак Кея (Мельник, Пастухов, 1984). Наши исследования, выполненные на многоколосковых генетически независимых линиях мягкой пшеницы, показали, что замещение хромосомы 2D и делеции короткого плеча этой хромосомы могут влиять на морфологию колоса пшеницы, вызывая развитие дополнительных колосков в уступах колосового стержня и приводя к изменению длины и плотности колоса. Появление многоколосковых/ветвистых форм в потомстве от скрещивания мягкой пшеницы с другими видами злаков при отдаленной гибридизации в рамках селекционных программ может служить маркером перестроек хромосом 2-й гомеологической группы.

Работа выполнена в рамках проекта по фундаментальным научным исследованиям (тема № VI.53.1.5.) при поддержке гранта РФФИ (№ 12-04-00897-а). П. Мартинек благодарит за поддержку Министерство сельского хозяйства Чешской Республики (проект QJ1310055).

ЛИТЕРАТУРА

- Добровольская О.Б., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Попова О.М., Красников А.А., Лайкова Л.И. Изучение морфогенеза соцветия и выявление особенностей наследования признака «многоколосковость» у мутантной линии мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) // Онтогенез. 2014. Т. 45. № 6. С. 434–441.
- Добровольская О.Б., Сурдий П., Бернард М., Салина Е.А. Синтения хромосом генома А двух эволюционных линий пшеницы // Генетика. 2009. Т. 45. № 11. С. 1548–1555.
- Дорофеев В.Ф., Коровина О.Н. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеницы. Л.: Колос, 1979.
- Гончаров Н.П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей. Изд. 2-е испр. и доп. Новосибирск: Акад. изд-во «Гео», 2012. 523 с.
- Мельник В.М., Пастухов Г.П. Генетические исследования индуцированных мутантов яровой пшеницы. Химический мутагенез в повышении продуктивности сельскохозяйственных растений. М.: Наука, 1984. 270 с.

- Лайкова Л.И., Арбузова В.С., Попова О.М. и др. Изучение ветвистости колоса у мутантных линий мягкой пшеницы сорта Саратовская 29 // Актуальные задачи селекции и семеноводства сельскохозяйственных растений на современном этапе. Докл. и сообщения IX генетико-селекционной школы. 5–9 апреля 2004 г. Новосибирск, 2005. С. 388–393.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S. *et al.* Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae) // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. P. 117–145.
- Dobrovolskaya O., Martinek P., Röder M.S., Börner A. Microsatellite mapping of a mutant gene (*mrs*) for multirow spike in wheat (*T. aestivum*) // Proc. of Intern. Conf. «Conventional and molecular breeding of field and vegetable crops» 22–27 November 2008, Novi Sad, Serbia. P. 133–136.
- Dobrovolskaya O., Martinek P., Voylovkov A.V. *et al.* Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. P. 867–874.
- Endo T.R., Gill B.S. The deletion stocks of common wheat // J. Hered. 1996. V. 87. P. 295–307.
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) // Genome. 1991. V. 34. P. 830–839.
- Haque M. A., Martinek P., Kobayashi S. *et al.* Microsatellite mapping of genes for semi-dwarfism and branched spike in *Triticum durum* Desf. var. *ramosobscurum* Jakubz. «Vetvistokoloskaya» // Genet. Resour. Crop Evol. 2012. V. 59. P. 831–837.
- Klindworth D.L., Williams N.D., Joppa L.R. Inheritance of supernumerary spikelets in a tetraploid wheat cross // Genome. 1990. V. 33. P. 509–514.
- Košner J., Foltýn J. Chromozomální poměry pšenice obecné (*Triticum aestivum* L.) s větveným klasem // Sbor. ÚVTIZ, Genet. Šlecht. 1989. 25. No. 1. P. 11–17.
- Li J., Wang Q., Wei H., Hu X., Yang W. SSR Mapping for locus conferring on the triple-spikelet trait of the Tibetan triple-spikelet wheat (*Triticum aestivum* L. conv. *tripletum*) // Triticeae Genomics. Genet. 2011. V. 2. No. 1 P. 1–6.
- Mac Key J. Mutagenesis in vulgare wheat // Hereditas. 1968. V. 53. P. 505–517.
- Malcomber S.T., Preston J.C., Reinheimer R. *et al.* Developmental gene evolution and the origin of grass inflorescence diversity // Developmental Genetics of the Flower / Eds D.E. Soltis, P.S. Soltis, J. Leebens-Mack // Adv. Bot. Res. 2006. V. 44. P. 423–479.
- Martinek P., Bednar J. Changes of spike morphology (multirow spike – MRS, long glumes – LG) in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their importance for breeding // Proc. of Intern. Conf. «Genetic Collections, isogenic and alloplasmic lines». Novosibirsk, Russia, 2001. P. 192–194.
- Muramatsu M. A presumed genetic system determining the number of spikelets per rachis node in the tribe Triticeae // Breed. Sci. 2009. V. 59. P. 617–620.
- Pennell A.L., Halloran G.M. Inheritance of supernumerary spikelets in wheat // Euphytica. 1983. V. 32. P. 767–776.
- Sakuma S., Salomon B., Komatsuda T. The domestication syndrome genes responsible for the major changes in plant form in the Triticeae crops // Plant Cell Physiol. 2011. V. 52. P. 738–749.
- Salina E.A., Lim Y.K., 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. 2006. V. 49. P. 1023–1035.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat. Columbia, Mo., Univ. of Missouri Press, 1954. P. 3–58.
- Sharman B.C. Branched head in wheat and wheat hybrids // Nature. 1944. V. 153. P. 497–498.
- Shewry P.R. Wheat // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. No. 6. P. 1537–1553.
- Sourdille P., Tixier M.H., Charmet G. *et al.* Location of genes involved in ear compactness in wheat (*Triticum aestivum*) by means of molecular markers // Mol. Breed. 2000. No. 6. P. 247–255.
- Swaminathan M.S., Chopra V.L., Sastry G.R.K. Expression and stability of an induced mutation for ear branching in bread wheat // Curr. Sci. 1966. V. 35. P. 91–92.
- Yang W.-Y., Lu B.-R., Hu X.-R., Yu Y., Zhang Y. Inheritance of the triple-spikelet character in a Tibetan landrace of common wheat // Genet. Resour. Crop Evol. 2005. V. 52. P. 847–851.

EFFECT OF REARRANGEMENTS OF HOMOEOLOGOUS GROUP 2 CHROMOSOMES OF BREAD WHEAT ON SPIKE MORPHOLOGY

O.B. Dobrovol'skaya¹, P. Martinek², I.G. Adonina¹,
E.D. Badaeva³, Yu.L. Orlov^{1, 4}, E.A. Salina¹, L.I. Laikova¹

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

² Agrotest Fyto, Ltd, Kroměříž, Czech Republic;

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

⁴ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Four genetically independent bread wheat lines with altered spike morphology caused by development of supernumerary spikelets at rachis nodes were characterized by modern methods of karyotype analysis, C-banding and FISH. Three lines carried rearrangements of group 2 chromosomes: substitution of chromosome 2D and deletions of 2D, terminal and interstitial. The deletion breakpoints were defined by microsatellite analysis. The deletions were co-localized on the genetic map with the MRS1 gene, whose mutation caused the development of clusters of supernumerary spikelets at rachis nodes. Evaluations of spike phenotypes of the line with the supernumerary spikelet trait and Chinese Spring deletion lines carrying deletions of chromosomes 2A, 2B, and 2D demonstrated that deletion of a group 2 chromosome might alter spike morphology, resulting in development of supernumerary spikelets at rachis nodes and changes in spike length and density.

Key words: *T. aestivum* L., deletion lines, C-banding, FISH, microsatellite markers, morphogenesis, supernumerary spikelets.

УДК 577.11:633.11:632.4

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*T. AESTIVUM*/*T. TIMOPHEEVII*)

© 2014 г. И.Н. Леонова¹, О.А. Орловская²,
М.С. Родер³, М.А. Нестеров¹, Е.Б. Будашкина¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: leonova@bionet.nsc.ru;
² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь;
³ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany

Поступила в редакцию 11 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

Изучено генетическое разнообразие коллекции интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* по микросателлитным локусам и устойчивости к грибным болезням. Генотипирование гибридных линий и родительских сортов мягкой пшеницы с помощью 143 SSR маркеров выявило в их геноме 521 и 440 аллелей соответственно, в среднем по 3,24/2,73 аллеля на локус. Сравнение индивидуальных хромосом по индексам генетического разнообразия свидетельствует о том, что наиболее низким разнообразием микросателлитных локусов характеризуются хромосомы 4D и 5D ($H = 0,16-0,21$) как родительских сортов, так и гибридных линий, а наиболее высокий индекс ($0,62-0,68$) показан для хромосом 5B и 6A. Анализ полиморфизма микросателлитных локусов и индексов H трех геномов интрогрессивных линий показал, что хромосомы генома В имеют более высокие показатели по сравнению с геномами А и D ($B > A > D$), что, вероятно, является результатом наличия чужеродных интрогрессий в эти хромосомы. Сравнение результатов молекулярного и фитопатологических тестов позволяет заключить, что, несмотря на жесткий отбор по признаку устойчивости к бурой ржавчине в первых поколениях и большое число поколений самоопыления, генетическое разнообразие интрогрессивных линий по микросателлитным локусам сохраняется, это свидетельствует о стабильности чужеродного генетического материала, перенесенного в геном мягкой пшеницы.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, грибные болезни, интрогрессивные линии, мягкая пшеница *T. aestivum*, SSR маркеры, *T. timopheevii*.

ВВЕДЕНИЕ

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из основных продовольственных культур во всем мире. По площади посевов она занимает первое место среди других зерновых культур и является основным продуктом питания для трети населения земного шара (<http://faostat.fao.org>). Современные тенденции в селекции пшеницы, направленные на замену местных районированных сортов на унифицированные высокоурожайные сорта, привели к сужению генетического разнообразия пшеницы по генам иммунитета к болезням и вредителям

(van de Wouw *et al.*, 2009). Интрогрессивная гибридизация является одним из способов расширения разнообразия мягкой пшеницы по генам устойчивости к грибным болезням, при этом в последние годы внимание исследователей обращено на привлечение диких и культурных сородичей в качестве источников эффективных генов иммунитета. Получение стабильных интрогрессивных форм пшеницы путем межвидовой гибридизации предполагает использование различных методических приемов, таких, например, как беккроссирование и рекуррентный отбор, приводящих к накоплению в геноме ценных аллелей генов и локусов

количественных признаков (QTL), при этом в процессе отбора ключевым моментом создания новых селекционных форм является поддержание и сохранение генетического разнообразия. Однако в настоящее время данные о тенденциях изменения генетического разнообразия интрогрессивных линий пшеницы, полученных на основе межвидовых скрещиваний, практически отсутствуют.

Традиционно для оценки генетического разнообразия различных видов злаковых культур используются морфологические, или фенотипические, характеристики (Marić *et al.*, 2004; Barakat *et al.*, 2013). Для селекционных линий и сортов могут быть использованы коэффициенты, рассчитанные на основании данных родословных (Cox *et al.*, 1986; Dreisigacker *et al.*, 2005; Rauf *et al.*, 2012). Однако число морфологических признаков ограничено, оценка их трудоемка и проявление признаков зависит от условий окружающей среды и эпистатических взаимодействий генов. Что касается оценок, основанных на использовании родословных, то такая информация не всегда доступна, недостаточно детализирована и вследствие этого слабо коррелирует с оценками, полученными с использованием фенотипических и молекулярных данных (Graner *et al.*, 1995; Dreisigacker *et al.*, 2004).

Анализ генетического разнообразия, основанный на применении молекулярных маркеров, используется около трех десятилетий, при этом в последние годы основной акцент делается на ДНК-маркеры, которые обладают существенными преимуществами по сравнению с морфологическими и биохимическими маркерами вследствие высокого уровня полиморфизма, отсутствия влияния условий внешней среды и стадии развития организма. В настоящее время ДНК-маркеры общепризнаны как эффективный и надежный способ характеристики генетических ресурсов пшеницы (Landjeva *et al.*, 2007; Varshney *et al.*, 2007).

Для расширения генетического разнообразия по генам иммунитета к грибным болезням была создана коллекция интрогрессивных линий на основе скрещивания мягкой пшеницы с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* Zhuk. (Budashkina, Kalinina, 2001). Интрогрессивные линии были использованы для изучения

процессов формообразования, стабилизации гибридных форм и картирования QTL, определяющих устойчивость к бурой ржавчине *Puccinia triticina* Erikss. (Леонова и др., 2008; Гордеева и др., 2009). Целью данной работы была оценка генетического разнообразия и филогенетических взаимосвязей интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* с помощью микросателлитных маркеров, которые характеризуются кодоминантным типом наследования и хромосомной специфичностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы 34 интрогрессивные линии, полученные от скрещивания 5 сортов яровой мягкой пшеницы *T. aestivum*: Саратовская 29 (С29), Скала (Ск), Иртышанка 10 (Ирт 10), Целинная 20 (Ц20), Новосибирская 67 (Н67) с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* var. *viticulosum* (BC₁F₁₈₋₂₀, 2n = 42) (рис.).

Оценку устойчивости к грибным болезням проводили на стадии взрослых растений в условиях естественного инфекционного фона на экспериментальных полях Института цитологии и генетики СО РАН (ИЦиГ, Новосибирск) и Сибирского НИИ растениеводства и селекции Россельхозакадемии (СибНИИРС, Новосибирск). Степень восприимчивости растений к бурой ржавчине (патоген *Puccinia triticina*) оценивали по 5-балльной шкале иммунитета Майнса и Джексона на стадиях выхода растения в трубку и молочной спелости зерна (Mains, Jackson, 1926). Симптомы поражения мучнистой росой (патоген *Blumeria graminis*) оценивались по модифицированной шкале Прескотта и Саери от 0 до 9 баллов (Захаренко и др., 2000).

Выделение ДНК, микросателлитный анализ, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и электрофорез фрагментов ПЦР проводили согласно ранее описанной процедуре (Леонова и др., 2005). Для генотипирования были использованы микросателлитные маркеры *Xgwm*, *Xgdm*, картированные в геномах *T. aestivum* и *T. timopheevii* (Salina *et al.*, 2006; Ganal, Röder, 2007).

Величину генетического разнообразия оценивали по индексу Н, рассчитанному для каждого микросателлитного локуса по формуле Нэя:

$$H = 1 - \sum x_{ik}^2$$

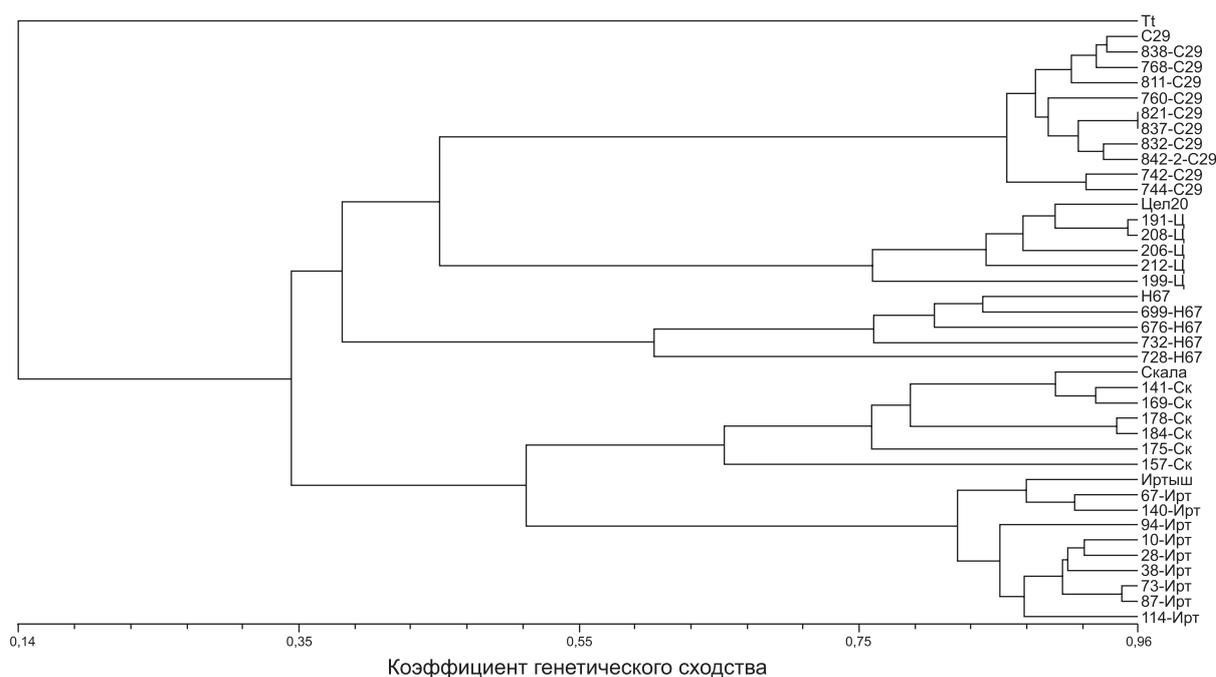


Рис. Дендрограмма генетического сходства интрогрессивных линий мягкой пшеницы *T. aestivum*/*T. timopheevii* и родительских форм.

Для построения дендрограммы использованы результаты, полученные для микросателлитных локусов трех геномов. Сорт мягкой пшеницы, участвующий в гибридизации, указан справа от номера линии. Tt – *T. timopheevii*.

где x_i – частота аллеля, k – число аллелей (Nei, 1973). Кластерный анализ проводили с помощью пакета программ NTSYS-рc 2.11Q (Rohlf, 1998). Данные амплификации фрагментов маркерами, представленные как 1 (наличие амплификации) или 0 (отсутствие), были конвертированы в бинарную матрицу с использованием алгоритма попарного невзвешенного кластерирования с арифметическим усреднением (UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic average). Генетическое сходство рассчитывалось для каждой пары образцов с использованием индекса сходства DICE (Dice, 1945).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мониторинг устойчивости интрогрессивных линий и исходных родительских сортов мягкой пшеницы к популяциям бурой ржавчины и мучнистой росы, распространенным на территории Новосибирской области, проводился в течение длительного периода времени (с 1997 г. по 2014 г.) (табл. 1). В зависимости от года проведения испытаний уровень устойчивости линий к бурой ржавчине варьировал от иммунного

(балл 0) до среднеустойчивого (балл 2). Линии, происходящие от разных сортов, различались по степени устойчивости к патогену бурой ржавчины в следующем диапазоне: л. С29 > л. Ирт10 > л. Ск > л. Ц20 > л. Н67. Наиболее высокий уровень резистентности демонстрировали линии, полученные на основе сорта Саратовская 29, в то время как линии сортов Целинная 20 и Новосибирская 67 проявили среднечувствительный (балл 3) тип реакции в годы с высокой инфекционной нагрузкой патогена (2002 и 2008 гг.). Оценка линий на восприимчивость к мучнистой росе показала, что 13 из них проявляли высокоустойчивый тип реакции (балл 9–8) во все годы проведения полевых испытаний, у остальных тип реакции варьировал от среднечувствительного до среднеустойчивого, за исключением линии 728, для которой была характерна в основном высокая восприимчивость (балл 4–3) (табл. 1). Исходные родительские сорта показывали чувствительный тип реакции к возбудителям бурой ржавчины (балл 3–4) и мучнистой росы (балл 4–3) во все годы проведения испытаний. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммунитет, сформировавшийся в процессе

Таблица 1

Мониторинг степени устойчивости гибридных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* к бурой ржавчине и мучнистой росе в полевых условиях Новосибирской области за период 1997–2014 гг.

Родительский сорт мягкой пшеницы	Линия	Иммунность (баллы)	
		Бурая ржавчина	Мучнистая роса
Саратовская 29	742, 744	0/1	7–6
	760	0/1	5/7–6
	768	1/2	5
	811, 838	0/1/2	7–6/9–8
	821, 837	0/1	7–6/9–8
	832-2, 842-2	0/1	9–8
Скала	141, 157, 169, 178	1/2	9–8
	175	2	5/7–6
	184	1/2	5/7–6
Иртышанка 10	10, 38	0/1	5/7–6
	28, 67, 140	0/1/2	7–6/9–8
	73	0/1	9–8
	87	1/2	7–6
	94	1/2/3	9–8
	114	0/1/2	5
Целинная 20	191, 208	1/2	9–8
	199	1/2	5
	206, 212	1/2/3	9–8
Новосибирская 67	676	0/1/2/3	7–6
	699	1/2/3	5/7–6
	728	0/1/2/3	4–3/5
	732	0/1/2	9–8

отбора гибридных линий на устойчивость к бурой ржавчине, стабильно сохраняется в течение длительного периода времени, при этом ряд линий характеризуется комплексным иммунитетом к грибным болезням.

Для оценки генетического разнообразия устойчивых к грибным патогенам интрогрессивных линий *T. aestivum*/*T. timopheevii* в сравнении с исходными родительскими сортами мягкой пшеницы было использовано 143 SSR маркера, 12 из которых имеют множественную

локализацию в геноме мягкой пшеницы, всего был проанализирован 161 микросателлитный локус (Ganal, Röder, 2007).

На основании результатов анализа спектров амплификации 161 микросателлитного локуса в геноме гибридных линий и родительских сортов было выявлено 521 и 440 аллелей (включая нуль-аллели) соответственно, т. е. в среднем по 3,24 и 2,73 аллеля на локус (табл. 2). Оценка маркеров на полиморфизм показала, что наиболее информативными являются 10: *Xgwm273* (хромосома 1BL), *Xgwm614* (2AS), *Xgwm372* (2AL), *Xgwm720* (3AL), *Xgwm566* (3BL), *Xgwm736* (5AL), *Xgwm617* (5AL), *Xgwm66* (5BL), *Xgwm1165* (5BL) и *Xgwm843* (5BL), позволяющих выявлять фрагменты генома большинства исходных родительских форм, использованных для гибридизации. У интрогрессивных линий и сортов пшеницы среди трех исследованных геномов наиболее полиморфными оказались маркеры генома В, которые выявляли в среднем 3,58 и 2,93 аллеля на локус по сравнению с геномами А (2.67/3.18) и D (2.43/2.63) (табл. 2).

Сравнительный анализ индивидуальных хромосом по уровню полиморфизма микросателлитных локусов показывает, что наиболее полиморфными являются маркеры, локализованные на хромосомах 5В, 2А и 6А, выявляющие 4,62/3,81, 4,14/3,25 и 4,0/3,50 аллеля на локус у линий и сортов соответственно. В группу хромосом с наименее полиморфными микросателлитными локусами вошли хромосомы 5D и 4D, у которых обнаруживалось менее 2 аллелей на локус (табл. 2). Анализ данных аллельного разнообразия среди гомеологичных групп хромосом свидетельствует о том, что локусы, расположенные в 5-й гомеологичной группе, выявляют в среднем наибольшее число аллелей на локус (3,71/3,07) по сравнению с остальными группами хромосом. У исследованных образцов наименее полиморфными являлись маркеры 3-й, 4-й и 7-й гомеологичных групп, выявляющие 2,79/2,5, 2,56/2,44 и 2,77/2,62 аллеля на локус у гибридных линий и сортов соответственно.

Индекс генетического разнообразия Н варьировал от 0,00 до 0,82 в зависимости от микросателлитного локуса и в среднем был выше у интрогрессивных линий пшеницы

Таблица 2

Характеристика родительских сортов мягкой пшеницы и интрогрессивных линий *T. aestivum* / *T. timopheevii* по числу аллелей микросателлитных локусов в индивидуальных хромосомах, гомеологичных группах и геномах

Гомеологичная группа хромосом	Геном												Всего		
	А			В			D			Локусов	Аллелей (сорта/линии)	Аллели на локус (сорта/линии)			
	Число локусов	Число аллелей (сорта/линии)	Аллели на локус (сорта/линии)	Число локусов	Число аллелей (сорта/линии)	Аллели на локус (сорта/линии)	Число локусов	Число аллелей (сорта/линии)	Аллели на локус (сорта/линии)						
1	11	31/40	2,82/3,64	13	35/42	2,69/3,23	4	11/11	2,75/2,75	28	77/93	2,75/3,32			
2	8	26/33	3,25/4,14	7	15/20	2,14/2,86	5	11/12	2,20/2,40	20	52/65	2,60/3,25			
3	10	22/24	2,20/2,40	9	22/27	2,44/3,00	5	16/16	3,20/3,20	24	60/67	2,50/2,79			
4	7	17/17	2,43/2,43	5	15/17	3,00/3,40	4	7/7	1,75/1,75	16	39/41	2,44/2,56			
5	20	52/63	2,60/3,15	21	80/97	3,81/4,62	4	6/7	1,00/1,17	45	138/167	3,07/3,71			
6	6	21/24	3,50/4,00	5	10/15	2,00/3,00	4	9/13	2,25/3,25	15	40/52	2,67/3,47			
7	5	10/12	2,00/2,40	4	11/11	2,75/2,75	4	13/13	3,25/3,25	13	34/36	2,62/2,77			
Всего	67	179/213	2,67/3,18	64	188/229	2,93/3,58	30	73/79	2,43/2,63	161	440/521	2,73/3,24			

T. aestivum/T. timopheevii (0,47) по сравнению с родительскими сортами (0,42) (табл. 3). Сравнение индексов Н для индивидуальных хромосом свидетельствует о том, что хромосомы 4D и 5D характеризуются наиболее низким разнообразием микросателлитных локусов ($H = 0,16-0,21$) как у родительских сортов, так и у гибридных *T. aestivum/T. timopheevii*, а наиболее высокий индекс Н (0,62–0,68) показан для хромосом 5B и 6A. Индексы Н, усредненные для разных геномов, указывают на то, что геномы D родительских сортов и гибридных линий сравнимы, тогда как по геномам А и В генетическое разнообразие линий выше, чем исходных сортов мягкой пшеницы, что может быть связано с наличием интрогрессий в этих хромосомах (табл. 3).

Кластерный анализ показал, что все интрогрессивные линии распадаются на 5 групп, согласно их происхождению от сорта мягкой пшеницы, при этом наблюдается низкое генетическое сходство с родительской формой *T. timopheevii* var. *viticulosum* (рис.). Генетические дистанции внутри групп интрогрессивных линий варьируют от 0,6 до 0,97, наибольший диапазон различий наблюдается в группах, происходящих от сортов Новосибирская 67 и Скала.

Высокий коэффициент генетического сходства ($> 0,85$) отмечен в кластере, происходящем от сорта Саратовская 29, в котором у двух линий (821 и 837) наблюдается почти полное генетическое сходство по микросателлитным локусам. Линии 157 и 728 имеют обособленное положение в кластерных группах и значительно различаются по генетическим дистанциям от остальных линий в группах. Анализ спектров ПЦР этих линий выявил различия в длинах фрагментов амплификации у ряда SSR маркеров по сравнению с родительскими образцами, что позволяет сделать предположение о возможном происхождении этих линий от других сортов мягкой пшеницы.

Сравнение результатов молекулярного и фитопатологического тестов показывает, что группировка линий, согласно данным по устойчивости к бурой ржавчине и мучнистой росе, имеет сходство с кластеризацией на основе молекулярных данных, что отражает генетические изменения, произошедшие в геноме линий в процессе интрогрессивной гибридизации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка генетического разнообразия мирового генофонда растений является важным моментом для сохранения и управления генетическими ресурсами и для отбора родительских образцов с целью их дальнейшего использования в селекционных программах. Основной массив опубликованных данных по изучению генетического разнообразия включает сравнительный внутри- и межпопуляционный анализ различных видов злаковых культур, местных, стародавних и современных сортов, а также диких и культурных сородичей (Roussel *et al.*, 2005; Teklu *et al.*, 2006; Митрофанова и др., 2012). Имеется небольшое число работ, в которых генетическое разнообразие оценивается в потомстве селекционных линий, происходящем от близкородственных скрещиваний, либо в образцах, полученных в результате возвратных скрещиваний (Dreisigaker *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007; Noori *et al.*, 2010).

В частности, в работах по оценке влияния возвратных скрещиваний были зафиксированы повышение генетического разнообразия в потомстве беккроссных линий и появление новых аллелей, которые не присутствуют у родительских форм (Zhang *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012).

Имеющиеся данные по исследованию влияния рекуррентного отбора свидетельствуют о том, что генетическое разнообразие образцов существенно не изменяется, а в некоторых случаях снижается по сравнению с родительскими формами (Liu *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2010). Так, Noori с соавт. (2010), изучая генетическое разнообразие продвинутых поколений селекционных линий пшеницы, установили, что отбор по признакам устойчивости к болезням (фузариоз и желтая ржавчина) изначально увеличивал внутри- и межлинейное генетическое разнообразие, которое в дальнейшем снижалось с увеличением числа поколений самоопыления.

Что касается характеристики генетического разнообразия интрогрессивных линий, полученных в результате межвидовой гибридизации, то изучению этого вопроса посвящено всего несколько публикаций, в которых установлено существенное повышение индексов Н и концентрации в геноме ценных аллелей хозяйственно важных признаков (Masum Akond *et al.*, 2008;

Falke *et al.*, 2009; Deng *et al.*, 2012). Полученные нами данные показывают, что гибридные линии превосходят исходные родительские сорта как по показателю «число аллелей на локус», так и по индексу Н, который отражает частоту встречаемости аллелей (табл. 2, 3). Превышение показателя Н у интрогрессивных линий наблюдается суммарно для всех гомеологичных групп хромосом, за исключением 4-й группы, при этом существенные различия отмечаются для 2-й и 6-й групп. Более значительное повышение индекса Н для хромосом 1А, 2А, 2В и 6В по сравнению с остальными хромосомами интрогрессивных линий может свидетельствовать об их селекционной ценности (табл. 3). Следует также отметить, что несмотря на жесткий отбор по признаку устойчивости к бурой ржавчине в первых поколениях и большое число поколений самоопыления, генетическое разнообразие интрогрессивных линий по микросателлитным локусам сохранилось, что подтверждает стабильность чужеродного генетического материала, перенесенного в геном мягкой пшеницы.

Одним из наиболее важных параметров для описания различий и выявления полиморфизма анализируемых образцов является число аллелей на SSR локус, которое в разных исследованиях по изучению пшеницы варьирует (Roussel *et al.*, 2005; Vanzetti *et al.*, 2013). Значительная часть литературных данных указывает на то, что аллельное разнообразие находится в зависимости от размера и происхождения изучаемой выборки. Например, генотипирование 480 европейских сортов мягкой пшеницы с помощью 39 SSR маркеров показало варьирование числа аллелей для разных локусов от 4 до 40 (Roussel *et al.*, 2005). В исследовании О.П. Митрофановой с соавт. (2012) при изучении 116 афганских сортов мягкой пшеницы выявлялось до 22 аллелей на локус, как часто встречающихся, так и уникальных. По данным Брайан с соавт. (Bryan *et al.*, 1997), полученным для 49 микросателлитных маркеров и 10 сортов пшеницы, среднее число составляло 3,5 аллеля на локус. Однако при генотипировании 82 коммерческих сортов мягкой пшеницы из Казахстана С.Н. Абугалиевой с соавт. (2012) установлено, что число аллелей на SSR локус не превышает 3,3, что, по-видимому, связано с

выборкой образцов, районированных для данного региона и имеющих близкородственное происхождение. В нашей работе степень полиморфизма микросателлитных локусов у родительских сортов мягкой пшеницы составляла в среднем 2,73 аллеля/локус, что соответствует литературным данным, полученным для выборки небольшого размера.

Оценка интрогрессивных линий *T. aestivum/T. timopheevii* по уровню полиморфизма микросателлитных локусов и индексу Н показывает, что хромосомы генома В имеют в среднем более высокие показатели, чем хромосомы геномов А и D. Такая тенденция, $B > A > D$, описана у многих авторов независимо от типа маркерных систем, используемых для анализа, и плоидности пшеницы (Huang *et al.*, 2002; Ganeva *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). Более высокий уровень полиморфизма для отдельных хромосом или геномов может быть связан с наличием перестроек различного типа, произошедших в процессе формообразования. Такие данные в литературе приводятся. Так, у португальских сортов пшеницы была выявлена значительно более высокая полиморфность маркеров генома D по сравнению с маркерами В генома, что связано с наличием интрогрессий хроматина ржи в хромосому 2D (Riberto-Carvalho *et al.*, 2004).

Таким образом, результаты оценки интрогрессивных линий *T. aestivum/T. timopheevii* по аллельному составу микросателлитных локусов свидетельствуют о том, что линии превосходят родительские сорта мягкой пшеницы по генетическому разнообразию, что, в первую очередь, связано с наличием чужеродного хроматина, перенесенного из генома *T. timopheevii*. Полученные результаты могут быть использованы в научных и прикладных исследованиях для изучения механизмов чужеродной интрогрессии и утилизации интрогрессивных линий в селекционных программах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-90000) и Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.604.21.0106).

ЛИТЕРАТУРА

- Абугалиева С.И., Волкова Л.А., Ерембаев К.А., Туруспеков Е.К. Генотипирование коммерческих сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана с использованием микросателлитных ДНК-маркеров // Биотехнология. Теория и практика. 2012. № 2. С. 35–45.
- Гордеева Е.И., Леонова И.Н., Калинина Н.П., Салина Е.А., Будашкина Е.Б. Сравнительный цитологический и молекулярный анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы, содержащих генетический материал *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетика. 2009. Т. 45. С. 1616–1626.
- Захаренко В.А., Медведев А.М., Ерохина С.А. и др. Методика по оценке устойчивости сортов полевых культур на инфекционных и провокационных фонах. М.: Россельхозакадемия, 2000. 88 с.
- Леонова И.Н., Добровольская О.Б., Каминская Л.Н. и др. Молекулярный анализ линий тритикале, содержащих различные системы *Vrn* генов, с помощью микросателлитных маркеров и гибридизации *in situ* // Генетика. 2005. Т. 41. С. 1236–1243.
- Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н.П., Будашкина Е.Б. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующих устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине // Генетика. 2008. Т. 44. С. 1652–1659.
- Митрофанова О.П., Стрельченко П.П., Зуев Е.В., Стрит К., Конопка Я., Маккей М. О генетическом разнообразии местных сортов мягкой пшеницы, собранных научными экспедициями в Афганистане // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. С. 579–591.
- Barakat M.N., Al-Doss A.A., Elshafei A.A., Ghazy A.I., Khaled A.M. Assessment of genetic diversity among wheat doubled haploid plants using TRAP markers and morpho-agronomic traits // Austr. J. Crop Sci. 2013. V. 7. P. 104–111.
- Bryan G.L., Collins A.J., Stephenson P. *et al.* Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat // Theor. Appl. Genet. 1997. V. 94. P. 557–563.
- Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust // Acta Phytopathol. Entomol. 2001. V. 36. P. 61–65.
- Cox T.S., Murphy J.P., Rodgers D.M. Changes in genetic diversity in the red winter wheat from regions of the United States // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 5583–5586.
- Deng X.J., Luo X.D., Dai L.F. *et al.* Genetic diversity and genetic changes in the introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff. // J. Integr. Agric. 2012. V. 11. P. 1059–1066.
- Dice L.R. Measures of the amount of ecologic association between species // Ecology. 1945. V. 26. P. 297–302.
- Dreisigacker S., Zhang P., Warburton M.L. *et al.* SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different megaenvironments // Crop Sci. 2004. V. 44. P. 381–388.
- Dreisigacker S., Melchinger A.E., Zhang P. *et al.* Hybrid performance and heterosis in spring bread wheat, and their relations to SSR-based genetic distances and coefficients of parentage // Euphytica. 2005. V. 144. P. 51–59.
- Falke K.C., Susić Z., Wilde P. *et al.* Testcross performance of rye introgression lines developed by marker-assisted backcrossing using an Iranian accession as donor // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 118. P. 1225–1238.
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Genomics assisted Crop Improvement / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. Springer, 2007. V. 2. P. 1–24.
- Ganeva G., Korzun V., Landjeva S. *et al.* Genetic diversity assessment of Bulgarian durum wheat (*Triticum durum* Desf.) landraces and modern cultivars using microsatellite markers // Genet. Resour. Crop Ev. 2010. V. 57. P. 273–285.
- Graner A., Ludwig W.F., Melchinger A.E. Relationship among European barley germplasm. II. Comparison of RFLP and pedigree data // Crop Sci. 1995. V. 34. P. 1199–1205.
- Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganal M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 105. P. 699–707.
- Jiang H., Gao Q.R., Li L.J. *et al.* Genetic diversity of recurrent selection populations with *Ms2* gene assessed by gliadins in common wheat (*Triticum aestivum* L.) // Agr. Sci. China. 2010. V. 9. P. 615–625.
- Landjeva S., Korzun V., Börner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding // Euphytica. 2007. V. 156. P. 271–296.
- Li L., Yaoyu X., Wensheng C. *et al.* The genetic variation of the backcross modified lines developed from the maize line 08-641 selected by different directions // Sci. Res. 2012. V. 3. P. 918–922.
- Liu J., Liu L., Hou N. *et al.* Genetic diversity of wheat gene pool of recurrent selection assessed by microsatellite markers and morphological traits // Euphytica. 2007. V. 155. P. 249–258.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. P. 89–120.
- Marić S., Bolarić S., Martinčić J., Pejić I., Kozumplik V. Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage // Plant Breeding. 2004. V. 123. P. 366–369.
- Masum Akond A.S.M.G., Watanabe N., Furuta Y. Comparative genetic diversity of *Triticum aestivum*–*Triticum polonicum* introgression lines with long glume and *Triticum petropavlovskyi* by AFLP-based assessment // Genet. Resour. Crop Evol. 2008. V. 55. P. 133–141.
- Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1973. V. 70. P. 3321–3323.
- Noori A., Ahmadikhah A., Soughi H., Dehghan M. The effects of selection for multiple traits on diversity of advanced wheat lines revealed by molecular markers // Adv. Appl. Sci. Res. 2010. V. 1. P. 153–159.
- Rauf S., Tariq S.A., Hassan S.W. Estimation of pedigree based diversity in Pakistani wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm // Commun. Biometry Crop Sci. 2012. V. 7. P. 14–22.
- Riberto-Carvalho C., Guedes-Pinto H., Igrejas G. *et al.* High levels of genetic diversity throughout the range of the portuguese wheat landrace ‘Barbela’ // Ann. Botany. 2004. V. 94. P. 699–705.

- Rohlf F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, vers. 2.0. N.Y.: Applied Biostatistics Inc., 1998.
- Roussel V., Leisova L., Exbrayat F. *et al.* SSR allelic diversity changes in 480 European bread wheat varieties released from 1840 to 2000 // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 162–170.
- 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.
- Teklu Y., Hammer K., Huang X.Q., Röder M.S. Analysis of microsatellite diversity in Ethiopian tetraploid wheat landraces // *Genet. Resour. Crop Ev.* 2006. V. 53. P. 1115–1126.
- van de Wouw M., Kik C., van Hintum T. *et al.* Genetic erosion in crops: concept, research results and challenges // *Plant Genet. Resour.* 2009. V. 8. P. 1–15.
- Vanzetti L.S., Yerkovich N., Chialvo I E. *et al.* Genetic structure of Argentinean hexaploid wheat germplasm // *Genet. Mol. Biol.* 2013. V. 36. P. 391–399.
- Varshney R.K., Mahendar T., Aggarwal R.K., Börner A. Genic molecular markers in plants: development and applications // *Genomics-Assisted Crop Improvement / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa.* 2007. V. 1. P. 13–29.
- Zhang P., Dreisigacker S., Melchinger A.E. *et al.* Quantifying novel sequence variation and selective advantage in synthetic hexaploid wheats and their backcross-derived lines using SSR markers // *Mol. Breed.* 2005. V. 15. P. 1–10.
- Zhang L.Y., Liu D.C., Guo X.L. *et al.* Investigation of genetic diversity and population structure of common wheat cultivars in northern China using DArT markers // *BMC Genet.* 2011. V. 12. P. 42.

MOLECULAR DIVERSITY OF COMMON WHEAT INTROGRESSION LINES (*T. AESTIVUM*/*T. TIMOPHEEVII*)

I.N. Leonova¹, O.A. Orlovskaya², M.S. Röder³, M.A. Nesterov¹, E.B. Budashkina¹

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

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

³ Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Germany

Summary

Genetic diversity of *T. aestivum*/*T. timopheevii* introgression lines was studied with regard to microsatellite loci and resistance to fungal diseases. Genotyping of hybrid lines and parental common wheat cultivars for 143 SSR markers revealed 521 and 440 alleles, respectively, or 3,24/2,73 alleles per microsatellite locus on the average. Comparison of genetic diversity indices of individual chromosomes revealed the lowest diversity for SSR loci on chromosomes 4D and 5D and the highest (0,62–0,67), on 5B and 6A. Evaluation of SSR polymorphisms and indices H in the three genomes of introgression lines indicated that the chromosomes of genome B had higher rates than A or D ($B > A > D$) which was probably a result of alien introgression into these chromosomes. Comparison of the results of molecular and phytopathological tests allows us to conclude that despite the severe selection for resistance to leaf rust in early generations and a large number of generations of selfing, the genetic diversity of introgression lines on microsatellite loci is preserved, which is indicative of the stability of alien genetic material in the common wheat genome.

Key words: genetic diversity, fungal diseases, introgression lines, common wheat *T. aestivum*, SSR markers, *T. timopheevii*.

УДК 575.224.2

ИЗУЧЕНИЕ АЛЛЕЛЬНОГО СОСТАВА ГЕНОВ *Vrn-1* И *Ppd-1* У РАННЕСПЕЛЫХ И СРЕДНЕРАННИХ СОРТОВ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СИБИРИ

© 2014 г. И.Е. Лихенко¹, А.И. Стасюк², А.Б. Щербань²,
А.Ф. Зырянова¹, Н.И. Лихенко¹, Е.А. Салина^{1,2}

¹ ГНУ Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции
Россельхозакадемии, Краснообск, Россия,
e-mail: salina@bionet.nsc.ru;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 3 октября 2014 г. Принята к публикации 17 октября 2014 г.

Комбинация аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1*, *Ppd-B1* анализировалась с использованием аллель-специфичных праймеров у 48 раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы из различных селекционных центров Сибири. По *Vrn-1* и *Ppd-1* генам выявлено 6 гаплотипов, включая 2 наиболее распространенных с двумя доминантными генами, *Vrn-A1* и *Vrn-B1*, на фоне рецессивных генов *Ppd-D1b*, обуславливающих чувствительность к фотопериоду. Доминантный аллель *Ppd-D1a* встречается очень редко и был описан в сочетании с доминантными генами *Vrn-A1* и *Vrn-B1* только у одного сорта (Тулун 15), который является наиболее скороспелым из всех проанализированных сортов. Внутри каждого гаплотипа выявлена значительная вариабельность по продолжительности вегетации, что предполагает сильное влияние «генетического фона» на данный признак. Полученные результаты могут быть использованы в маркер-опосредованной селекции для отбора генотипов, наиболее оптимальных для тех или иных условий возделывания.

Ключевые слова: аллели генов *Ppd* и *Vrn*, вегетационный период, фотопериод, сорт, мягкая пшеница.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из важнейших биологических характеристик, определяющих хозяйственную ценность сортов зерновых культур и их пригодность для возделывания в той или иной климатической зоне, являются продолжительность и структура вегетационного периода растений. По мнению Н.И. Вавилова (1935), вегетационный период является одним из мощных средств приспособления растений к условиям среды. Тесно связаны с продолжительностью различных периодов роста и развития растений большинство признаков и свойств сорта и в конечном итоге его урожайность. Основное количество работ по генетике вегетационного периода у пшеницы связано с изучением продолжительности периода «всходы–колошение». Данный факт

отражает, в первую очередь, возможность более точного определения срока выколашивания, в отличие от времени созревания.

По современным представлениям, сроки колошения (созревания) у пшеницы определяются тремя генетическими системами, контролирующими реакцию растений на: 1) яровизирующие температуры (гены *Vrn-vernalisation*); 2) фотопериод (гены *Ppd-photoperiod response*) и 3) комплекс других, менее изученных, факторов (гены *Eps-earliness per se*, контролирующие время цветения, и независимые от факторов внешней среды) (Worland, 1996). При этом большинство исследователей сходится во мнении, что главную роль играют две первые системы, а третья имеет лишь второстепенное значение. А.Ф. Стельмах (1984, 1987) пришел к заключению, что 70 % генетически обусловленного варьирования про-

должительности периода «всходы–колошение» детерминировано генами *Vrn*, 25 % – генами *Ppd* и только 5 % – другими генами.

Растительный материал классифицируется как чувствительный или нечувствительный к фотопериоду, в зависимости от того, требует ли он длинного дня для перехода к цветению. Гены *Ppd-D1*, *Ppd-B1* и *Ppd-A1*, расположенные на гомеологичных хромосомах 2-й группы, контролируют реакцию на фотопериод у мягкой пшеницы ($2n = 42$, BBAADD) (Scarth, Law, 1984). По силе влияния на чувствительность к фотопериоду *Ppd-1* гены находятся в следующем порядке: *Ppd-D1* > *Ppd-B1* > *Ppd-A1*, хотя в отдельных случаях эффект аллеля *Ppd-B1* сопоставим с *Ppd-D1* (Worland *et al.*, 1998; Nishida *et al.*, 2013). J. Beales с соавт. (2007) разработали диагностические маркеры для *Ppd-D1*, основного локуса реакции на фотопериод. Доминантный аллель этого гена *Ppd-D1a* обуславливает нейтральную реакцию на длину дня, в отличие от рецессивного аллеля *Ppd-D1b*.

На данный момент достигнут определенный успех в расшифровке молекулярно-генетического механизма детерминации чувствительности к яровизации и срока колошения. Было показано, что в основе этого механизма лежат мутации в регуляторных районах *Vrn-1* гена (Distelfeld *et al.*, 2009). Эти мутации снимают зависимость перехода к стадии колошения от фактора яровизации и переводят ген из рецессивного в доминантное состояние. У мягкой пшеницы имеется три гомеологичных *Vrn-1* локуса: *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Vrn-D1*. Установлено, что сочетание различных доминантных аллелей гомеологичных *Vrn-1* локусов влияет на срок колошения и, соответственно, на общую продолжительность вегетационного периода (Stelmakh, 1993). Изучение продолжительности фаз развития мягкой пшеницы у изогенных и замещенных линий с различными аллелями генов *Vrn-1* показало, что срок вегетационного периода зависит в основном от продолжительности этапа «кущение–первый узел» (Воронин, Стельмах, 1985; Kosner, Pankova, 2004; Емцева и др., 2013).

Сведения об общей продолжительности вегетационного периода яровой пшеницы достаточно разнообразны. По мнению К.А. Фляксбергера (1938) и М.И. Руденко (1960), она варьирует от

76 до 140 и более дней. Другие авторы считают пределами вегетации яровой мягкой пшеницы 70–80 и 120–130 дней (Кумаков, 1980; Зыкин и др., 2000). Единого мнения по вопросу классификации сортов по группам спелости также не существует. Официально в настоящее время принято пользоваться классификацией Государственной комиссии по испытанию и охране селекционных достижений, согласно которой по зерновым приняты группы спелости: раннеспелая, среднеранняя, среднеспелая, среднепоздняя, позднеспелая (www.gossort.com).

В табл. 1 представлено условное распределение генотипов с доминантными *Vrn-1* генами по группам спелости. На фоне разной реакции на фотопериод генотипы яровых сортов мягкой пшеницы с различными сочетаниями доминантных генов распределены по скорости колошения и, соответственно, общей скороспелости. Генотип с одним доминантным геном *Vrn-B1* характерен для наиболее позднеспелых сортов (двуручки или поздние), хотя в отдельных случаях более позднеспелыми являются сорта с одним доминантным геном *Vrn-D1*. Наиболее

Таблица 1

Условное распределение сортов с генами *Vrn-1* и *Ppd* по группам спелости (Леонтьев, 1980; Stelmakh, 1993)

Группа по скороспелости	Чувствительные к фотопериоду (гены <i>ppd</i>)	Нечувствительные к фотопериоду (гены <i>Ppd</i>)
Двуручки	<i>Vrn-B1</i>	–
Поздние	<i>Vrn-D1</i> <i>Vrn-B1 Vrn-D1</i>	<i>Vrn-B1</i>
Средние	–	<i>Vrn-D1</i> <i>Vrn-B1 Vrn-D1</i>
Среднеранние	<i>Vrn-A1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-B1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-D1</i>	–
Ранние	–	<i>Vrn-A1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-B1</i> <i>Vrn-A1 Vrn-D1</i> <i>Vrn-A1 VrnB1 Vrn-D1</i>

Примечание. *Ppd* – доминантные; *ppd* – рецессивные гены, контролирующие реакцию на фотопериод. Даны новые обозначения *Vrn-1* генов. Соответствующие старые обозначения: *Vrn1* (*Vrn-A1*), *Vrn2* (*Vrn-B1*), *Vrn3* (*Vrn-D1*). В таблице указаны только доминантные *Vrn-1* гены.

скороспелыми являются сорта с тремя доминантными генами – *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*. Однако необходимо иметь в виду, что такой генотип оказывается наименее продуктивным и практически не встречается среди существующих сортов (Стельмах, 1986).

Целью данной работы являются характеристика сибирских раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы по генам, детерминирующим продолжительность вегетационного периода, и сопоставление полученных результатов молекулярных исследований с реальными полевыми характеристиками генотипов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярный анализ генов *Vrn-1* и *Ppd-1* проводился на материале 48 сортов яровой мягкой пшеницы сибирской селекции из отдела растительных ресурсов Сибирского научно-исследовательского института растениеводства и селекции. ДНК выделяли из 3-дневных пророст-

ков, выращенных на влажной фильтровальной бумаге в чашках Петри. Листья 3–4 растений помещали в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 700 мкл буфера (1 мл 1М Трис-НCl, 1 мл 5 М NaCl, 1 мл 0,5 М ЭДТА, 0,625 мл 20 % SDS и 0,04 г Na₂S₂O₅), измельчали на гомогенизаторе FastPrep-24 (MP Biomedicals, USA) и инкубировали на водяной бане при 60 °С в течение 30 мин. Затем добавляли 700 мкл хлороформ-изоамилового спирта (24 : 1) и центрифугировали 25 мин при 12 тыс. об./мин. Верхнюю фракцию помещали в пробирку объемом 2 мл, добавляли 1,4 мл охлажденного при –20 °С 96 %-го этанола и центрифугировали 15 мин при 4,5 тыс. об./мин. К осадку добавляли 700 мкл 70 %-го спирта и центрифугировали 5 мин при 4,5 тыс. об./мин. Надосадочную жидкость удаляли; осадок высушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE.

Для изучения аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1* и *Ppd-B1* использовались аллель-специфичные праймеры (табл. 2). ПЦР проводи-

Таблица 2

Праймеры для идентификации различных аллелей генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у гексаплоидной пшеницы

Аллель, определяемый в результате ПЦР	Аллель-специфичные праймеры, использованные в ПЦР	Размер ДНК-фрагмента (п.н.)	Литературный источник
<i>Vrn-A1a</i> <i>Vrn-A1b</i> <i>vrn-A1</i>	VRN1AF GAAAGGAAAAATTCTGCTCG VRN1-INT1R GCAGGAAATCGAAATCGAAG	965+876 714 734	Yan <i>et al.</i> , 2004
<i>Vrn-B1a</i> <i>Vrn-B1c</i>	Intr1 ATCATCTTCTCCACCAAGGG Intr1/B/R3 CTCATGCCAAAAATTGAAGATGA	1124 737	Shcherban <i>et al.</i> , 2012a Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>vrn-B1</i>	Intr1/B/F CAAGTGGAACGGTTAGGACA Intr1/B/R4 CAAAATGAAAAGGAATGAGAGCA	1149	Fu <i>et al.</i> , 2005
<i>Ppd-D1a</i> <i>Ppd-D1b</i>	Ppd1_F ACGCCTCCCACTACTG Ppd1_R1 GTTGGTTCAAACAGAGAGC Ppd1_R2 CACTGGTGGTAGCTGAGATT	288 414	Beales <i>et al.</i> , 2007
<i>Ppd-B1b</i>	For4-PpdB-prom TCCTCCAGGTACAAAGGCA Rev1-Ppd-exon2 GTGCTTACTGATGACGGGGA	2003	Киселева и др. (Не опубликовано)

ли в общем объеме реакционной смеси 20 мкл, включающей: ДНК (50–100 нг), 10× буфер для Taq полимеразы (650 mM Tris-HCl (pH 8,9); 160 mM (NH₄)₂SO₄; 25 mM MgCl₂; 0,01 % Tween 20), по 0,25 mM каждого dNTP, по 1 нг каждого праймера, 1 мкл Taq полимеразы (1 единица активности/мкл), H₂O – до конечного объема 20 мкл. Условия ПЦР для выявления аллелей генов *PPD-1* и *Vrn-1* приведены в табл. 3.

Для аллелей гена *Ppd-B1* условия ПЦР были следующие: денатурация при 94 °C в течение 3 мин, далее 2 цикла: 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, 11 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C с постепенным понижением до 52 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, затем 27 циклов: 94 °C – 30 с, 58 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин, финальная элонгация при 72 °C – 7 мин. Разделение продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в течение 50–70 мин в 1 %-м агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

Полевые исследования проводились на опытном поле Сибирского НИИ растениеводства и селекции с 2005 г. по 2013 г., согласно методическим указаниям по изучению мировой коллекции пшеницы (Мережко, 1999). В статье приведены данные по общей продолжительности вегетационного периода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении влияния генов *Vrn-1* и *Ppd-1* на сроки созревания основное внимание было сосредоточено на идентификации доминантных

аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Ppd-D1* и *Ppd-B1*, вклад которых в сокращение сроков колошения и, как следствие, в сроки созревания, был неоднократно показан ранее. При наличии доминантных *Vrn-A1* и /или *Vrn-B1* достоверного влияния присутствия еще одного доминантного гена *Vrn-D1* на сроки колошения отмечено не было (Потокина и др., 2012). Кроме того, ранее проводимое изучение сортов, произрастающих в Европе и Сибири как генетическими, так и молекулярно-генетическими методами, показало, что *Vrn-D1* практически отсутствует у яровых сортов пшеницы, произрастающих в Европе и Сибири (Stelmakh, 1990; Моисеева, Гончаров, 2007; Shcherban *et al.*, 2012б, 2014). В связи с вышеизложенным, идентификация аллелей *Vrn-D1* у сортов Сибирского региона в данной работе не проводилась.

Аллели гена *Vrn-A1* изучались с использованием VRN1AF и VRN1-INT1R праймеров (табл. 2). Ожидаемый размер амплифицированного фрагмента с использованием этих праймеров для рецессивного аллеля *vrn-A1* составляет 734 п.н., для самого распространенного доминантного аллеля *Vrn-A1a* – 965 и 876 п.н. (рис. 1, а).

Среди проанализированных 48 генотипов рецессивный аллель *vrn-A1* обнаружен только у двух сортов – Сибирячка 4 и Фора. Остальные сорта несут доминантный аллель *Vrn-A1a* (табл. 4).

Использование праймеров Intr1 и Intr1/B/R3 позволяет выявить доминантные аллели *Vrn-B1a* (1124 п.н.) и *Vrn-B1c* (737 п.н.). На рис. 1, б представлена амплификация этих аллелей у

Таблица 3

Условия проведения ПЦР с аллель-специфичными праймерами генов *Vrn-1* и *Ppd-D1*

Тестируемый аллель/ген	Условия ПЦР					
	Начальная денатурация, t° (мин)	Количество циклов	Денатурация, t° (с)	Отжиг, t° (с)	Элонгация, t° (с)	Финальная элонгация, t° (мин)
<i>Vrn-A1a</i> , <i>Vrn-A1b</i> , <i>vrn-A1</i>	94(10)	38	94(45)	50(45)	72(60)	72(5)
<i>Vrn-B1a</i> , <i>Vrn-B1c</i>	94(2)	38	94(45)	58(45)	72(70)	72(5)
<i>vrn-B1</i>	94(2)	38	94(45)	58(45)	72(70)	72(5)
<i>Ppd-D1a</i> , <i>Ppd-D1b</i>	94(2)	38	94(45)	55(45)	72(30)	72(5)

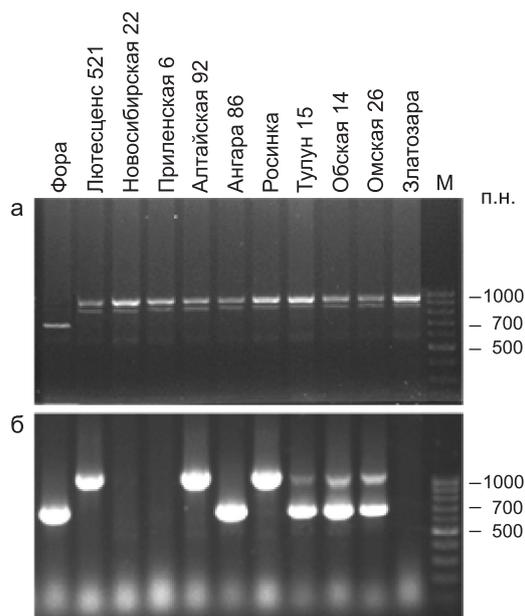


Рис. 1. Выявление рецессивного *vrn-A1* (734 п.н.) и доминантного *Vrn-A1a* (965+876 п.н.) аллелей (а), а также доминантных аллелей *Vrn-B1a* (1124 п.н.) и *Vrn-B1c* (737 п.н.) у сортов сибирской селекции с использованием аллель-специфичных праймеров (б).

некоторых сортов мягкой пшеницы, включая три гетерозиготных сорта (Тулун 15, Обская 14 и Омская 26), несущих сразу два доминантных аллеля. Сорта, у которых продукт амплификации отсутствует, вероятно, несут рецессивный аллель *vrn-B1*. Для его идентификации исполь-

зовалась комбинация праймеров Intr1/B/F//Intr1/V/R4. Всего из 48 сортов пшеницы рецессивный аллель *vrn-B1* (1149 п.н.) выявлен у 8 (рис. 2), доминантные аллели *Vrn-B1a* и *Vrn-B1c* – у 22 и 12 сортов соответственно; 6 сортов являются гетерозиготными (табл. 4).

Кроме *Vrn-1* генов, контролирующих реакцию растения на яровизацию, существенное влияние на продолжительность вегетационного периода могут оказывать гены *Ppd-1*, определяющие чувствительность растения к длине дня.

Анализ генов *Ppd-D1* с использованием аллель-специфичных праймеров (табл. 2) показал наличие доминантного аллеля *Ppd-D1a* у единственного сорта – Тулун 15 (рис. 3, а), что делает его слабочувствительным к фотопериоду; все остальные сорта характеризуются наличием рецессивного аллеля *Ppd-D1b* и являются чувствительными к длине светового дня (табл. 4). Анализ генов *Ppd-B1* выявил мономорфность всех изученных сортов в регуляторных районах гена – в области промотора и первого интрона (2003 п.н.) (рис. 3, б).

Большинство работ связано с изучением влияния генов *Vrn* и *Ppd* на сроки колошения, в первую очередь, из-за с возможностью более точного определения срока выколашивания, в отличие от времени созревания. В то же время неоднократно было показано, что общая продолжительность вегетационного периода, лежащая в основе классификации сортов по группам

Таблица 4

Выявленные аллельные комбинации генов *VRN-A1*, *VRN-B1* и *PPD-D1* у проанализированных сортов мягкой пшеницы

Сорта	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Ppd-D1</i>	Гаплотип
Балаганка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Аленькая улучшенная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Сибирка 1818	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Тулун 14	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Скороспелка улучшенная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 2078	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лютеценс 937	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Скала	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лена	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Бирюсинка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1

Окончание таблицы 4

Сорта	<i>Vrn-A1</i>	<i>Vrn-B1</i>	<i>Ppd-D1</i>	Гаплотип
Иртышанка 10	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 12	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Приобская	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Лютесценс 521	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Алтайская 92	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Росинка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Чернява 13	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Страда Сибири	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Новосибирская 15	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Удача	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Омская 36	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Тулун 14h68	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i>	<i>Ppd-D1b</i>	1
Ангара 86	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Алтайская 98	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Омская 32	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Полюшко	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Катюша	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
П. Вавенкова	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Тарская 8	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Тарская 10	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Боевчанка	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Лютесценс 25	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	2
Красноярская 1103	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Тюменская 80	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 22	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Приленская 6	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Златозара	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 29	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Новосибирская 31	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Алтайская 70	<i>Vrn A1a</i>	<i>vrn B1</i>	<i>Ppd-D1b</i>	3
Таежная	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Обская 14	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Омская 26	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
П. Азиева	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Алтайская 99	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	4
Сибирячка 4	<i>vrn A1</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	5
Фора	<i>vrn A1</i>	<i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1b</i>	5
Тулун 15	<i>Vrn A1a</i>	<i>Vrn B1a</i> <i>Vrn B1c</i>	<i>Ppd-D1a</i>	6

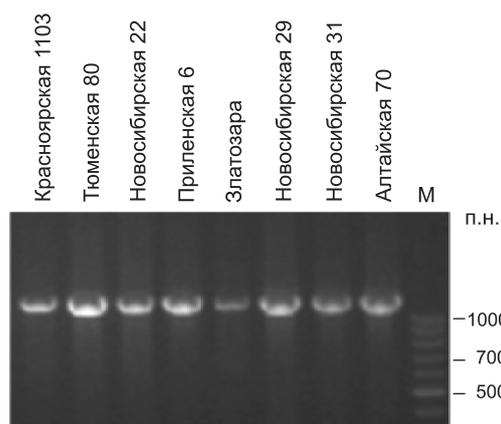


Рис. 2. ПЦР-анализ с использованием комбинации праймеров Intr1/B/F//Intr1/B/R4 для выявления рецессивного аллеля *vrn-B1* (1149 п.н.).

спелости, находится в прямой зависимости от сроков колошения и, следовательно, во многом обусловлена взаимодействием генов *Vrn* и *Ppd*. Продолжительность вегетационного периода для 48 раннеспелых и среднеранних сортов яровой мягкой пшеницы из различных селекционных центров Сибири оценивалась на протяжении 9 лет (с 2005 г. по 2013 г.) на опытном поле Сибирского НИИ растениеводства и селекции. Данные по продолжительности вегетационного периода с 2011 г. по 2013 г. для отдельных сортов представлены в табл. 5.

Согласно распределению аллелей генов *Vrn-A1*, *Vrn-B1* и *Ppd-D1*, проанализированные сорта можно распределить по 6 гаплотипам (табл. 4, 5). Гаплотипы 1 и 2 с полным набором доминантных аллелей по изучаемым генам *Vrn-1* составляют самую многочисленную группу. Следует отметить, что только к гаплотипу 1 относятся сорта, районированные как в 1920–1950-е, так и в 2000-е годы (табл. 5). В данном гаплотипе показатель продолжительности вегетации был наименьшим у Новосибирской 15 в 2006–2007 годах (65–66 дней), у сортов Балаганка и Сибирка 1818 – в 2012 г. (66 дней). Самая длительная вегетация оказалась у сортов Страда Сибири (87 дней) и Омская 36 (88 дней) в 2009 г. В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал для данной группы сортов от 70,54 до 78,4.

Такой сильный разброс показателей у сортов одного гаплотипа, значительно различающихся по времени допуска к использованию (от 1929 г.

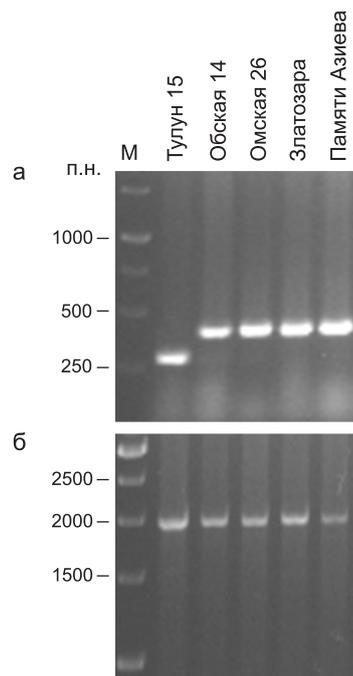


Рис. 3. ПЦР-анализ с использованием комбинации праймеров Ppd1_F//Ppd1_R1//Ppd1_R2 (а) и For4-PpdB-prom//Rev1-Ppd-exon2 (б) для анализа аллелей генов *Ppd-D1* и *Ppd-B1* соответственно.

до 2007 г.), а также происхождению (от Якутии до Омска), позволяет предположить, что данное сочетание аллелей может быть актуальным для сортов, различающихся как по продолжительности вегетации, так и по приспособительным свойствам. Кроме того, следует отметить разнообразие этих сортов и по качеству получаемого от них зерна, поскольку среди них имеются как сорта-филеры (например Омская 12, Росинка и др.), так и сорта сильной пшеницы (Новосибирская 15 и др.).

К гаплотипу 2 относятся сорта, имеющие аллель *Vrn-B1c* (табл. 5). В этой группе оказались сорта, районированные в 1989–2009 гг. Как и сорта предыдущего гаплотипа, они достаточно сильно различаются по продолжительности вегетационного периода, имея примерно такой же размах варьирования по этому признаку. Продолжительность вегетации была наименьшей у Ангара 86 в 2006 г. (62 дня) и Полношко – в 2012 г. (63). Самая длительная вегетация оказалась у омских сортов Катюша и Омская 32 в 2009–2010 гг. (86–88 дней). В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал от 67,43 до 77,14.

Таблица 5

Продолжительность вегетационного периода сортов мягкой пшеницы, относящихся к различным гаплогруппам

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания				Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013	2013	
Гаплогруппы 1: Vrn-A1a, Vrn-B1a, Ppd-D1b								
Балаганка ³	1929	с-р	Иркутск, местный	73	66	73	66–77	
Сибирка 1818 ³	1940	р	Иркутск, местная Сибирская	81	66	74	66–81	
Тулун 14-Н-683 ³	1942	р	Иркутск, Ярославская × Прелюд	74	68	72	68–74	
Омская 2078 ³	1952	с-р	Омск, Мильт.290/22821 × Ударница	77	69	79	69–79	
Скала	1955	с-р	Иркутск (Ударница × Гарнет) × Линия 1571/5	75	75	72	67–75	
Иртышанка 10 ³	1981	с-р	Омск, Скала × Сар.29	79	68	76	68–79	
Алтайская 92 ³	1995	с-р	Алтай, Н67 × Лют. 4021	82	68	76	68–85	
Росинка	1997	с-р	Омск, Сибакоская 3 (гамма-лучи)	76	68	76	68–85	
Черныя 13	2000	с-р	Омск (Тюмень), (АНК-17 × ОмСХИ-6) × ОмСХИ-6	81	74	75	72–86	
Страда Сибиря ³	2002	с-р	Омск (Ранг × Гибрид21) × (К-54049 × Л16333/617)	86	70	75	72–87	
Новосибирская 15	2003	р	Новосибирск, Без.98 × Ирг.10) × Тул.10	77	75	69	65–80	
Удача	2006	с-с	Новосибирск, Лют.25 × Лют.101	78	78	72	69–86	
Омская 36	2007	с-р	Омск, Л.15086 × Runar (Норвегия)	81	72	77	72–88	
				78,46 ± 1,02	70,54 ± 1,07	74,31 ± 0,74		

*Среднее ± ошибка среднего

Продолжение таблицы 5

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания			Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013	
Галлотип 2: <i>Vrn-A1a</i>, <i>Vrn-B1c</i>, <i>Ppd-D1b</i>							
Лютесценс 25	1991	с-р	Новосибирск, Wendel (И-306426) × Сар.36	77	65	72	65–79
Алтайская 98	2001	с-р	Алтай, Эритроспермум 70 × Люг. 25	78	66	73	70–83
Омская 32	2001	с-р	Омск, Люг.162/84 × Криз (США)	79	70	75	70–86
Полушко	2008	р	Новосибирск, Обская 14 × Н.22	73	63	69	63–73
Капюша	2008	с-р	Омск (мутант 717 × В2612) × мутант 769	76	73	81	73–88
Памяти Вавенкова	2008	с-р	Новосибирск, Н.29 × {[Funello × Бирюсинка] × (ЛА-296)} × Тул.12	79	67	73	66–82
Боевчанка	2009	с-р	Омск (Сар.60 × Люг.150/86-10) × (Сар.62 × Bastian)	78	68	74	68–78
*Среднее ± ошибка среднего				77,14 ± 0,80	67,43 ± 1,25	73,86 ± 1,39	
Галлотип 3: <i>Vrn-A1a</i>, <i>vrn-B1</i>, <i>Ppd-D1b</i>							
Тюменская 80 ³	1985	с-р	Иркутск (Тюмень), Безостая 1 × Сар.29	76	66	78	66–86
Новосибирская 22	1991	р	Новосибирск, мутант Скалы × Красноярская	75	67	74	67–81
Златозара ³	1999	с-р	Омск (Тюмень), Красноводопадская 210 × Ирт.10	81	74	75	71–85
Новосибирская 29	2003	с-р	Новосибирск, (ППГ × Sonoga) × (ППГ × Грекум 114 × пырей) × Н.22	77	68	74	68–82
Алтайская 70	2009	с-р	Алтай, Алтайская 98 × Алтайская 325	77	68	75	68–77
Новосибирская 31	2010	с-р	Новосибирск {Тюм.80 × [(Целинная 20 × АНК-102) × АНК-102]} × Sport (Швеция)	77	69	74	69–85
* Среднее +\– ошибка среднего.				77,17 ± 0,83	68,67 ± 1,15	75 ± 0,63	

Окончание таблицы 5

Сорт	Год ¹	Г.с. ²	Происхождение	Годы испытания				Размах варьирования 2005–2013
				2011	2012	2013		
Гаплогруппы 4: <i>Vrn-A1a</i>, <i>Vrn-B1a</i>/<i>Vrn-B1c</i>, <i>Ppd-D1b</i>								
Омская 26 ³	1998	с-р	Омск, Н.22 × WW16151	74	74	74	66–81	
Памяти Азиева	2000	с-р	Омск, Сар.29 × Лют.99/80-1	88	74	76	71–88	
Алтайская 99	2005	с-р	Алтай (Лют.183 × К 54975) × Лют.183	84	68	75	68–84	
*Среднее ± ошибка среднего				82 ± 4,16	72 ± 2,00	75 ± 0,58		
Гаплогруппы 5: <i>vrn-A1</i>, <i>Vrn-B1c</i>, <i>Ppd-D1b</i>								
Фора	1996	р	Курган, С.-Петербург, ТРР (Sarazino) siete Citros F 66 / 3 / 2 Кинельская 30	82	79	71	71–86	
Гаплогруппы 6: <i>Vrn-A1a</i>, <i>Vrn-B1a</i>/<i>Vrn-B1c</i>, <i>Ppd-D1a</i>								
Тулун 15	1998	р	Иркутск, Харьковская 93 × Тулунчанка	73	61	70	60–73	

¹ Год внесения в Госреестр допущенных к использованию селекционных достижений (районирования); ² группа спелости: р – раннеспелые, с-р – среднеранние; ³ сорт не внесен в Госреестр допущенных к использованию сортов. * Статистически значимых различий между изученными гаплогруппами с использованием t-критерия Стьюдента выявлено не было.

Сокращения: Н. – Новосибирская; Лют. – Лютеценс; Сар. – Саратовская; Без. – Безенчукская; Тул. – Тулунская; Ирт. – Иртышанка; Тюм. – Тюменская.

К гаплотипу 3 относятся сорта с рецессивным аллелем *Vrn-B1*, районированные в 1952–2010 гг. Продолжительность вегетации была наименьшей у Тюменской 80 в 2012 г. (66 дней) и Новосибирской 22 в 2006, 2008 и 2012 гг. (67 дней). Самая длительная вегетация оказалась у сортов Тюменская 80 в 2009 г. (86 дней), Златозара – в 2010 г. (85 дней) и Новосибирская 31 – в 2009 г. (85 дней). В среднем за 2011–2013 гг. показатель варьировал от 68,67 до 77,17 у сорта Златозара. Следует отметить, что большинство данных генотипов по качеству относятся к ценным и сильным сортам. Кроме того, именно в эту группу входят перспективные современные среднеранние сибирские сорта Новосибирская 29, Новосибирская 31 и Алтайская 70, которые особенно близки по вегетации к «классическому» среднераннему сибирскому сорту Скала. Данные сорта в высокой степени насыщены генетическим материалом местных форм и саратовских сортов, как это отмечается для сибирских генотипов и другими авторами. Но они еще и отличаются тем, что при их создании были использованы пшенично-пырейные гибриды и ряд иностранных сортов, которые, видимо, играли роль эффективных источников устойчивости к болезням.

Гаплотип 4, гетерозиготный по гену *Vrn-B1*, включает сорта, районированные в 1982–2005 гг. По продолжительности вегетации в 2011–2013 гг. в среднем варьирование было в пределах 72–82 дня.

К гаплотипу 5 отнесен самый позднеспелый из всех изученных сорт Сибирячка 4 (размах варьирования продолжительности вегетации от 80 в 2008 г. до 100 дней в 2005 г.), а также сорт Фора, особой отличительной чертой которого являются очень короткий вегетативный период развития растений (всходы–колошение) и растянутый репродуктивный период от колошения до созревания.

Единственным сортом, имеющим, в отличие от других генотипов, аллель *Ppd-D1a* вместо *Ppd-D1b*, оказался сорт Тулун 15. В настоящее время это самый скороспелый сорт из всего набора допущенных к использованию сортов яровой мягкой пшеницы на территории Сибири и России в целом. Его районирование только в Восточной Сибири оправдывается тем, что сорт способен формировать приемлемую в хозяйственном отношении урожайность только

при достаточной, а еще лучше при избыточной, увлажненности. Следует отметить, что различие яровых сортов только по присутствию *Ppd-D1a/Ppd-D1b* всегда сопровождается более коротким сроком колошения у сортов с *Ppd-D1a* аллелем (Потокина и др., 2012; Kumar *et al.*, 2012). Кроме того, гаплотип *Vrn-A1 Vrn-B1 Ppd-D1a*, описанный у Тулун 15, достаточно редко встречается у яровых сортов пшеницы, произрастающих в Европе и России. Так, анализ 245 европейских сортов выявил только один сорт с гаплотипом *Vrn-A1 Vrn-B1 Ppd-D1a* (Shcherban *et al.*, 2014). Частота встречаемости аллеля *Ppd-D1a*, подавляющего чувствительность к фотопериоду, существенно увеличивается от северных регионов к южным, что можно проследить по результатам оценки генов *Vrn-1* и *Ppd-1* у сортов мягкой пшеницы из различных регионов мира (Iqbal *et al.*, 2010; Gomeza *et al.*, 2014; Shcherban *et al.*, 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие в первых трех гаплотипах максимального количества раннеспелых и среднеранних сортов сибирской селекции, актуальных для современного растениеводства, косвенно свидетельствует о перспективности использования в практической селекции имеющихся у них сочетаний аллелей генов *Vrn* и *Ppd*. Немногочисленность сортов 5–6-го гаплотипов, а также локальный характер использования их в производстве предполагают их специфичность и/или узкую экологическую специализацию.

В пределах каждой из выделенных групп имеются весьма значительные различия по продолжительности вегетации. Например, среди сортов 1-го гаплотипа особенно резко различаются раннеспелый сорт Новосибирская 15 и среднеранний сорт селекции Сибирского НИИСХ Омская 36. Размах варьирования продолжительности вегетации первого сорта – от 65 до 80 дней, второго – от 72 до 88 дней. Во второй группе различаются раннеспелый сорт Полюшко селекции СибНИИРС (63–73 дня) и среднеранний сорт Сибирского НИИСХ Катюша (73–83 дня). Данные факты предполагают наличие дополнительных генетических различий, вносящих существенный вклад в определение продолжительности как отдельных

фаз развития, так и вегетационного периода в целом у сортов, имеющих одинаковый гаплотип по генам *Vrn-1* и *Ppd-1*.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта VI.53.1.5.

ЛИТЕРАТУРА

- Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции // Теоретические основы селекции растений. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. Т. 1. С. 17–94.
- Воронин А.Н., Стельмах А.Ф. Этапы органогебеза у почти изогенных по локусам *Vrn1_3* линий мягкой пшеницы // Науч.-техн. бюл. ВСГИ. 1985. № 1(55). С. 19–23.
- Емцева М.В., Ефремова Т.Т., Арбузова В.С. Влияние аллелей *Vrn_B1a* и *Vrn_B1c* на продолжительность фаз развития замещенных и изогенных линий мягкой пшеницы // Генетика. 2013. Т. 49. № 5. С. 632–640.
- Зыкин В.А., Шаманин В.П., Белан И.А. Экология пшеницы. Омск: Изд-во ФГОУ ВПО ОмГАУ, 2000. 124 с.
- Кумаков В.А. Физиология яровой пшеницы. М.: Колос, 1980. 207 с.
- Леонтьев С.И. Основные параметры моделей сортов яровой пшеницы интенсивного типа для степи и южной лесостепи Западной Сибири. Омск: ОмСХИ, 1980. 85. С. 139.
- Мережко А.Ф. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и триitikале // Методические указания. СПб.: ВИР, 1999. 82 с.
- Моисеева Е.А., Гончаров Н.П. Генетический контроль ярового типа развития у стародавних и местных сортов мягкой пшеницы Сибири // Генетика. 2007. Т. 43. № 4. С. 469–476.
- Потокина Е.К., Кошкин В.А., Алексеева Е.А., Матвиенко И.И., Филобок В.А., Беспалова Л.А. Комбинация аллелей генов *Ppd* и *Vrn* определяет сроки колошения у сортов мягкой пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. Р. 77–86.
- Руденко М.И. К вопросу селекционного использования твердой пшеницы в районах Юго-Востока // Тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1960. Т. 32. Вып. 2. С. 227–247.
- Стельмах А.Ф. Изучение генетики типа и скорости развития мягких пшениц во ВСГИ // Генетико-цитологические аспекты селекции сельскохозяйственных растений: Сб. науч. тр. Одесса, 1984. С. 5–15.
- Стельмах А.Ф. О генетической природе типичных двуручек мягкой пшеницы // С.-х. биология. 1986. № 2. С. 22–30.
- Стельмах А.Ф. Роль генетических систем в онтогенетической адаптации мягкой пшеницы // Экологическая генетика и эволюция. Кишинев, 1987. С. 146–161.
- Фляксбергер К.А. Пшеницы. М.; Л.: ОГИЗ, 1938. 269 с.
- Beales J., Turner A., Griffiths S., Snape J.W., Laurie D.A. 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.
- Distelfeld A., Li C., Dubcovsky J. Regulation of flowering in temperate cereals // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 1–7.
- Gomez D., Vanzetta L., Helguera M., Lombardo L., Franschina J., Miralles D.J. Effect of *Vrn-1*, *Ppd-1* genes and earliness per se on heading time in Argentinean bread wheat cultivars // Field Crops Res. 2014. V. 158. P. 73–81.
- Fu D., Szucs P., Yan L., Helguera M., Skinner J.S., Zitzewits J.V., Hayes P.M., Dubcovsky J. Large deletions within the first intron in *VRN-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat // Mol. Genet. Genom. 2005. V. 273. P. 54–65.
- Iqbal M., Shahzad A., Ahmed I. Allelic variation at the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Vrn-B3* and *Ppd-D1a* loci of Pakistani spring wheat cultivars // Electron. J. Biotechnol. 2010. V. 14. P. 1–8.
- Kosner J., Pankova 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.
- Kumar S., Sharma V., Chaudhary S., Tyagi A., Mishra P., Priyadarshini A., Singh A. Genetics of flowering time in bread wheat *Triticum aestivum*: complementary interaction between vernalization-insensitive and photoperiod-insensitive mutations imparts very early flowering habit to spring wheat // J. Genet. 2012. V. 91. No. 1. P. 33–47.
- Nishida H., Yoshida T., Kawakami K. *et al.* Structural variation in the 5' upstream region of photoperiod insensitive alleles *Ppd-A1a* and *Ppd-B1a* identified in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), and their effect on heading time // Mol. Breeding. 2013. V. 31. No. 1. P. 27–37.
- Scarth R., Law C.N. The control of day length response in wheat by the group 2 chromosomes // Z. Pflanzenzücht. 1984. Bd. 92. S. 140–150.
- 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. 2012a. V. 29. No. 3. P. 675–685.
- Shcherban A.B., Emtseva M.V., Efremova T.T. Molecular genetic characterization of vernalization genes *Vrn-A1*, *Vrn-B1* and *Vrn-D1* in spring wheat germplasm from Russia and adjacent regions // Cereal Res. Commun. 2012b. V. 40. P. 54–65.
- Shcherban A.B., Boerner A., Salina E.A. Effect of *VRN-1* and *PPD-D1* genes on heading time in European bread wheat cultivars // Plant Breeding. 2014. doi:10.1111/pbr.12223.
- Stelmakh A.F. Geographic distribution of *Vrn* genes in landraces and improved varieties of spring bread wheat // Euphytica. 1990. V. 45. P. 113–118.
- Stelmakh A.F. Genetic effects of *Vrn* genes on heading date and agronomic traits in bread wheat // Euphytica. 1993. V. 65. P. 53–60.
- 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., Li M.W., Petrovic S., Sayers E.J. The influence of photoperiod genes on the adaptability of European winter wheat // Euphytica. 1998. V. 100. P. 385–394.
- Yan L., Helguera M., Kato K., Fukuyama S., Sherman J., Dubcovsky J. Allelic variation at the *VRN-1* promoter region in polyploid wheat // Theor. Appl. Genet. 2004. V. 109. P. 1677–1686.

ANALYSIS OF THE ALLELIC VARIATION OF THE *VRN-1* AND *PPD-1* GENES IN SIBERIAN EARLY AND MEDIUM EARLY VARIETIES OF SPRING WHEAT

**I.E. Likhenko¹, A.I. Stasyuk², A.B. Shcherban'²,
A.F. Zyryanova¹, N.I. Likhenko¹, E.A. Salina^{1,2}**

¹ Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding, Krasnoobsk, Russia,
e-mail: salina@bionet.nsc.ru;

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

Combinations of alleles of the *Vrn-A1*, *Vrn-B1*, *Vrn-D1*, *Ppd-D1*, and *Ppd-B1* genes were analyzed with allele-specific primers in 48 spring wheat varieties from different breeding centers in Siberia. Six haplotypes were identified for *Vrn-1* genes, including two most abundant with two dominant genes *Vrn-A1* and *Vrn-B1* against the background of recessive *Ppd-D1b* genes, which cause sensitivity to photoperiod. Only one variety (Tulun 15) was found to bear the photoperiod-neutral *Ppd-D1a* allele, combined with the dominant *Vrn-A1* and *Vrn-B1* alleles. It showed the earliest ripening of all accessions examined. Within each haplotype, a considerable variability was found in growing duration, suggesting a strong influence of the “genetic background” on this trait. Nevertheless, the results can be used for marker-assisted selection of genotypes most appropriate for different growing conditions.

Key words: alleles of *Vrn* and *Ppd* genes, time of vegetation, photoperiod, variety, common wheat.

УДК 575.001.893:633.111.1:575.222.7

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ПРИЗНАКОВ ПРОДУКТИВНОСТИ КОЛОСА У ГИБРИДОВ F₂, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ СКРЕЩИВАНИЯ СОРТОВ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НОВОСИБИРСКАЯ 67, САРАТОВСКАЯ 29, PUZA-4 С МНОГОЦВЕТКОВОЙ ЛИНИЕЙ SKLE 123-09

© 2014 г. В.С. Арбузова¹, Т.Т. Ефремова¹, П. Мартинек²,
Е.В. Чуманова¹, О.Б. Добровольская¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: arbuzova@bionet.nsc.ru;

² Agrotest, Agricultural Testing, Advisory Services and Research, Ltd.,
Kroměříž, Czech Republic

Поступила в редакцию 19 сентября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Оценивались параметры продуктивности колоса у растений популяций F₂, полученных от скрещивания сортов Новосибирская 67, Саратовская 29 и Puza-4 с образцом Skle 123-09, характеризующимся «многоцветковостью». Показано, что линия Skle 123-09 по плотности колоса достоверно отличается от изученных сортов; по длине колоса и числу колосков в колосе достоверных различий не обнаружено. Двухфакторный дисперсионный анализ гибридов F₂ показал, что основная доля изменчивости признака «длина колоса» определялась главным образом генотипической средой и взаимодействием факторов «генотип × среда». На изменчивость признака «число колосков колоса» основное влияние оказывали условия среды. Особенно это касается сортов Саратовская 29 и Puza-4, которые были созданы для засухоустойчивых зон возделывания. На изменчивость результирующего признака «плотность колоса» оказывают влияние условия среды, генотип и взаимодействие обоих факторов «генотип × среда». В результате проведенной оценки среди растений популяции F₂ были выделены формы, обладающие веерообразными колосками и высокой озерненностью, типичные для Skle 123-09, и имеющие наилучшие показатели других признаков колоса. Отобранные растения будут использованы для закрепления признака «многоцветковость» в родительских сортах.

Ключевые слова: мягкая пшеница, «многоцветковая» линия, признаки продуктивности колоса, генетический анализ гибридов второго поколения, дисперсионный анализ.

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является важнейшей зерновой культурой, которая играет ключевую роль в обеспечении продовольственной безопасности, независимости и благосостояния страны (Вавилов, 1935; Жученко, 2004). Поэтому повышение урожайности пшеницы по-прежнему остается приоритетной задачей для многих отраслей генетики и селекции (Жученко, 2004; Godfray *et al.*, 2010; Reynolds *et al.*, 2011). В связи с этим особую актуальность имеют поиск и создание новых источников разнообразного исходного

материала, сочетающего в себе высокую продуктивность и оптимально адаптированного к местным природно-климатическим условиям, а также изучение его генетического потенциала и использование новых подходов, позволяющих выявлять перспективные для селекции формы. Для этого в исследовании привлекаются местные образцы и сородичи пшеницы, обладающие повышенной продуктивностью колоса (Вавилов, 1935; Martinek, Bednar, 1988, 2001; Jiang *et al.*, 1994; Martinek, 1994; Мережко, 1994; Li, Zhao, 2000; Dobrovolskaya *et al.*, 2009).

Для пшеницы одним из основных элементов структуры урожая является продуктивность отдельного колоса или масса зерна с колоса. Но эта составляющая урожая является обобщенным показателем, на который влияют другие элементы продуктивности (длина колоса, плотность колоса, число колосков в колосе, число зерен в колосе, масса 1-й зерновки) (Вавилов, 1935; Филипченко, 1934; Hucl, Fowler, 1992; Ma *et al.*, 2007). Поэтому необходим детальный анализ отдельных элементов продуктивности колоса для целенаправленного влияния на формирование структуры урожая в изменяющихся почвенных, агрономических и климатических условиях (Лелли, 1980; Börner *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2010; Morgounov *et al.*, 2013). Кроме того, на урожай пшеницы влияют развитие соцветий колоса, количество цветков в соцветии, рост меристемы колоса и фертильность колоса (Куперман, 1953; Лутова и др., 2010; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012).

У мягкой пшеницы колоски многоцветковые и содержат до 3–5 цветков. На ранних фазах формирования колоса в колоске закладывается до 8–9 зачатков цветков, но после развития первых 2–4 цветков остальные вышерасположенные цветки перестают расти (Куперман, 1953; Дорофеев, 1979; Лутова и др., 2010). Однако описаны сорта и линии мягкой пшеницы, имеющие до 5–6 фертильных цветков в колоске (Martinek, Bednar, 1988, 2001; Martinek, 1994). Интересно, что среди представителей рода *Triticum* L. была обнаружена уникальная форма, обладающая повышенной многоцветковостью, у которой каждый колосок имеет четыре колосковые чешуи (по две справа и слева) и при благоприятных условиях в колоске может сформироваться до 26 фертильных цветков (Острейко, 1959).

Как правило, максимальное количество зерен (до четырех) формируется в колосках в средней части колоса, а на верхушке и основании колоса в колосках по две зерновки. Считается, что 25–35 зерен в колосе могут обеспечить урожайность до 30–50 ц/га (Носатовский, 1965; Жученко, 2004). При увеличении до 70 зерновок в одном колосе можно удвоить продуктивность растений. Некоторые исследователи считают, что использование в скрещиваниях уникальных форм, имеющих большое число колосков,

цветков и зерен, может быть одним из путей повышения урожайности пшеницы (Martinek, Bednar, 1988, 2001; Hucl, Fowler, 1992; Martinek, 1994; Li, Zhao, 2000; Aliyeva, Aminov, 2011; Sreenivasulu, Schnurbusch, 2012). В этом отношении признак многоцветковости практически не изучен и отсутствуют данные о влиянии многоцветковости на признаки продуктивности колоса и характер их наследования. Поэтому весьма актуальным является изучение новых источников многоцветковости и их генетических характеристик.

Целью данной работы была оценка параметров продуктивности колоса (длина колоса, плотность колоса, число колосков колоса) у растений популяций F_2 мягкой пшеницы, полученных с использованием многоцветковой линии Skle 123-09, для выделения перспективных образцов, обладающих повышенной озерненностью колоса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве сортов-реципиентов использовали яровые сорта мягкой пшеницы Саратовская 29 (С29), Новосибирская 67 (Н67) и индийский сорт Puza-4 (Р-4). В одном колоске сортов С29 и Н67, как правило, завязывается 3–4 зерна. Сорт Р-4 характеризуется повышенной массой 1000 зерен (до 44 г), но низкой фертильностью, в колоске завязывается всего 2 зерна. Донором послужила «многоцветковая» линия Skle 123-09. Колосок этой пшеницы имеет веерообразную форму с 5, иногда 6 фертильными цветками в колоске. Линия Skle 123-09 получена д-ром П. Мартинеком (Agrotest Fyto Ltd., Kromeriz, Czech Republic) при самоопылении и последующем отборе образца формы «многоколосковой» мягкой пшеницы, передана в Agrotest Fyto Ltd. д-ром Wang Tao без детального описания происхождения.

Сорта-реципиенты (Н67, С29, Р-4) скрещивали с «многоцветковой» линией Skle 123-09 для получения гибридных популяций F_2 , которые использовали для оценки элементов продуктивности колоса. Семена, использованные в двухлетних опытах, были одной репродукции как для контроля, так и для каждой гибридной популяции F_2 . Посев производили 24 мая в 2010 г. и 19 мая в 2011 г. вручную на опытном

поле ИЦиГ СО РАН в трехкратной повторности. В первый год предшественником был пар, во второй – горох. Гибридные популяции F_2 , сорта-реципиенты и многоцветковую линию Skle 123-09 сеяли на делянках шириной 1 м по 20 зерен в рядке. В посев брали не менее 160 гибридных зерен из каждой популяции и по 60 зерен родительских сортов. Уборку проводили вручную. Для структурного анализа признаков продуктивности колоса срезали 25 лучших колосьев родительских сортов и 50 случайно отобранных колосьев из каждой гибридной популяции F_2 .

Анализировали следующие элементы структуры урожая: длину колоса (ДК), число колосков колоса (ЧКК), плотность колоса. Плотность колоса (D – индекс плотности) рассчитывали по формуле: $D = (A - 1) \times 10 / B$, где: $(A - 1)$ – число колосков колоса без верхушечного колоска; B – длина стержня колоса (Якубцинер, 1976).

Для оценки значимости различий между средними значениями двух выборочных совокупностей использовали критерий Стьюдента (Рокицкий, 1974). Двухфакторный дисперсионный анализ проводили с использованием

программы SNEDECOR 5.61 (www.odsoft.narod.ru).

Основные метеоусловия вегетационных периодов 2010 и 2011 гг., прохождение фаз развития и этапов органогенеза пшеницы представлены на рис. 1. Сравнение средних температур обеих вегетаций со среднемноголетней показало мало отличий, только в условиях 2011 г. июнь был на 3 °С теплее и июль на 2 °С холоднее. По количеству выпавших осадков 2010 г. оказался засушливым в июне и августе. В 2011 г. на протяжении всей вегетации отмечалась нехватка влаги (от 8,5 мм в мае и до 17,9 мм в августе), особенно во 2-й декаде июня (0 мм) и июля (13 мм) (рис. 1), что непосредственно повлияло на формирование изученных признаков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предыдущими исследованиями показано, что увеличение числа зерен в колосе увеличивает урожай (Вавилов, 1935; Писарев, 1964; Лукьяненко, 1973; Feil, 1992; Wang *et al.*, 2002; Цильке, 2003; Green *et al.*, 2012). Кроме того, исследователи сообщают о зависимости уро-

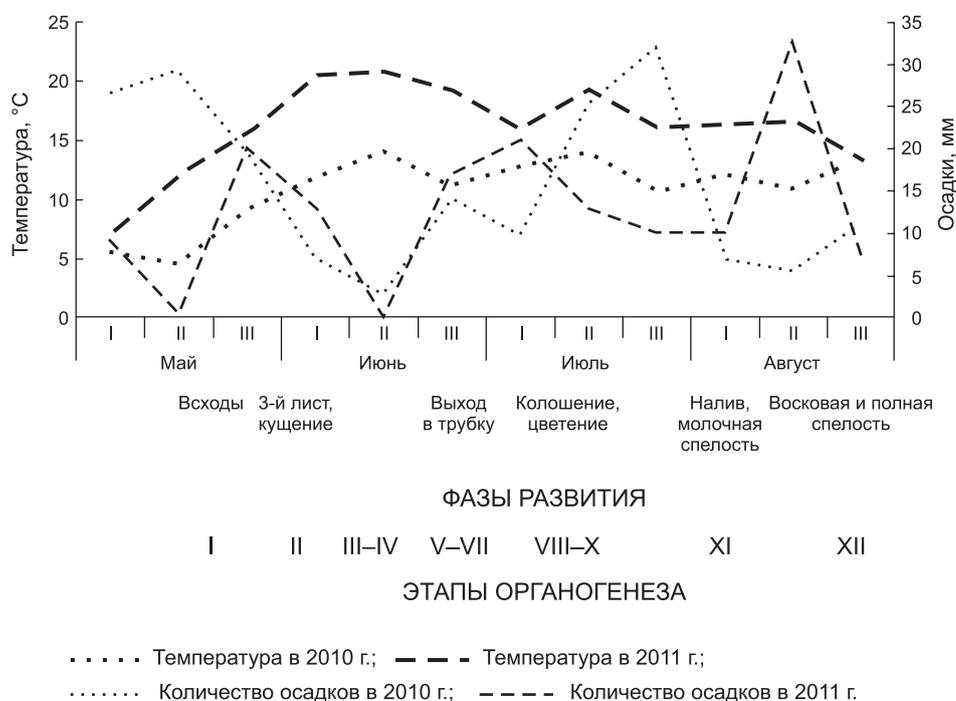


Рис. 1. Основные метеоусловия вегетационных периодов 2010 и 2011 гг. и прохождение фаз развития и этапов органогенеза пшеницы.

жайности пшеницы от числа зерен в колоске (Вавилов, 1935; Арбузова, Майстренко, 1986; Feil, 1992; Цильке, 2003) и массы зерна с колоса (McNeal *et al.*, 1978; Дорофеев, 1987; Wang *et al.*, 2002; Цильке, 2003). На основании этих исследований можно предположить, что многоцветковость должна представлять интерес для селекционеров, так как она непосредственно влияет на число зерен в колоске. Так, показано, что многоцветковая линия Skle 123-09 имеет высокие показатели элементов структуры урожая (число зерен в колосе, плотность колоса, озерненность колоска, масса зерна колоса) (Арбузова. Неопубл. данные).

В табл. 1 представлены средние показатели изученных признаков исходных сортов за два года. Многоцветковая форма Skle 123-09 по признаку ДК имела достоверные различия только с сортом Н67. По ЧКК изученные сорта и линия Skle 123-09 практически не отличались, кроме

сорта Р-4 в 2010 г. По признаку плотности колоса форма Skle 123-09 была достоверно выше остальных сортов в 2010 г.

Размах изменчивости признака ДК у гибридов F_2 представлен в табл. 2. Распределения значений признака ДК у гибридов F_2 , как правило, находились в диапазоне изменчивости родительских форм. В условиях острой засухи в популяциях F_2 (Н67, Р-4 × Skle 123-09) были обнаружены растения с ДК, равной 13,4 см. Надо сказать, что в условиях обеих вегетаций, как правило, доминировали или средние значения признака, или же они были смещены в сторону наибольших значений. Эти результаты свидетельствуют о появлении трансгрессивных форм, например, в комбинации (Р-4 × Skle 123-09, 2010 г.) (рис. 2, а).

По результатам двухфакторного дисперсионного анализа гибридов F_2 выяснили, что основная доля изменчивости признака ДК

Таблица 1

Значения показателей изученных признаков у родительских сортов

Признак	Год	Н67	С29	Р-4	Skle 123-09
ДК, см	2010	9,38 ± 0,81*	8,35 ± 0,52	7,43 ± 0,60	7,54 ± 0,66
	2011	8,67 ± 0,57**	6,92 ± 0,64	6,73 ± 0,52	6,79 ± 0,48
ЧКК, шт.	2010	14,92 ± 1,19	13,80 ± 1,12	11,63 ± 0,92***	15,28 ± 0,99
	2011	14,78 ± 1,35	12,26 ± 0,93	14,35 ± 1,35	13,40 ± 1,17
Плотность колоса (D)	2010	15,93 ± 1,13**	16,54 ± 1,18*	15,69 ± 1,24**	20,23 ± 1,36
	2011	16,88 ± 1,17*	17,80 ± 1,45	21,32 ± 1,19	21,10 ± 1,90

* $P \leq 0,05$; ** $0,05 \leq P \leq 0,01$; *** $0,01 \leq P \leq 0,001$.

Таблица 2

Средние значения (M) элементов продуктивности колоса и размах изменчивости признаков у гибридов F_2 (С29, Н67, Р-4 × Skle 123-09) в сравнении с формой Skle 123-09. Новосибирск, 2010 и 2011 гг.

Признак	Год	Skle 123-09		F_2 (С29 × Skle 123-09)		F_2 (Н67 × Skle 123-09)		F_2 (Р-4 × Skle 123-09)	
		M ± m	min-max	M ± m	min-max	M ± m	min-max	M ± m	min-max
ДК, см	2010	7,5 ± 0,6	6,2–8,4	7,6 ± 1,2	4,5–10,4	7,5 ± 1,1	4,5–11,4	7,6 ± 1,3	5,5–11,4
	2011	6,8 ± 0,5	5,7–8,0	8,3 ± 1,3	4,5–11,4	8,8 ± 1,1*	4,5–13,4	8,3 ± 1,5	5,5–13,4
ЧКК, шт	2010	15,3 ± 1,0	13,7–16,4	15,2 ± 2,6	10,5–24,4	15,2 ± 2,0	10,5–22,4	14,7 ± 2,7	8,5–22,4
	2011	13,4 ± 1,2	12,5–16,5	14,2 ± 2,6	6,5–20,4	15,4 ± 2,3	8,5–24,4	11,1 ± 2,6	8,5–24,4
D	2010	20,2 ± 1,3	19,3–24,0	20,2 ± 2,2	15,5–27,4	20,6 ± 2,4	15,5–29,4	19,5 ± 2,8	11,5–27,4
	2011	21,1 ± 1,9	19,5–25,0	17,0 ± 2,0	11,5–21,4	17,4 ± 2,3	11,5–25,5	17,2 ± 2,3	11,5–25,5

* $P \leq 0,05$.

определялась в равных долях генотипом и взаимодействием факторов «генотип × год» (43,5 %) в комбинации (P-4 × Skle 123-09). Надо сказать, что условия года никак не влияли на выраженность признака для всех трех комбинаций. Основная доля изменчивости признака ДК зависит от генотипа в популяции F_2 (C29 × Skle 123-09) на 45,7 % и в популяции F_2 (H67 × Skle 123-09) на 47,1 %, а взаимодействие «генотип × год» на 39,5 % и 36 % соответственно (табл. 3).

Признак «длина колоса», как известно, детерминируется многими генами, локализованными почти во всех хромосомах пшеницы

(Sears, 1954; Ригин, 1971; Лелли, 1980; Арбузова, Майстренко, 1986; Цильке, 2003; Pestsova *et al.*, 2006). Так, изучение моносомных серий сортов пшеницы C29 и Диамант I показало, что в моносомном состоянии практически все хромосомы участвуют в детерминации длины колоса и эффекты моносомии в значительной степени модифицируются условиями внешней среды (Арбузова, Майстренко, 1986). По данным Морис (Morris, 1974), гены, детерминирующие ДК, найдены на хромосомах 2A, 3A, 4A, 1B, 2B, 3B, 4B, 5B. Другие исследователи локализовали 9 хромосом – 3A, 3B, 3D, 4B, 4D, 5A, 5B, 5D, 6D, контролирующих длину колоса (Ауземус и др., 1970; Цильке Р.А., Цильке И.А., 1973, 1974, 1976).

В настоящее время для анализа агрономических и хозяйственно ценных признаков применяют молекулярно-генетические подходы, в том числе картирование локусов количественных признаков (QTL). По литературным данным, основные локусы, определяющие проявление длины колоса мягкой пшеницы, расположены в хромосомах 1B, 4A, 5A и 5D (Kato *et al.*, 2000; Vцrner *et al.*, 2002; Sourdille *et al.*, 2003; Marza *et al.*, 2006; Pestsova *et al.*, 2006). Для признака «длина колоса» было найдено 9 основных QTL, причем 8 из них располагались на хромосоме 4A, а один – на 5A (Чесноков и др., 2012).

В продуктивности колоса базисным показателем является ЧКК, поскольку этот элемент структуры урожая закладывается и формируется одним из первых, и чем больше колосков в колосе, тем он выше. Родительские линии по признаку ЧКК имели незначительные различия. Анализ гибридов F_2 позволил выявить ряд закономерностей в наследовании этого признака. При скрещивании образцов с одинаковым проявлением признака наблюдали доминирование больших значений признака среди гибридов F_2 . Кривые распределения гибридов были смещены в сторону наибольших значений признака, что также указывает на появление новых трансгрессивных форм, например у гибридов F_2 (C29 × Skle 123-09, 2010 г.) (рис. 2, б). Поэтому форму Skle 123-09 можно использовать в скрещивании при отборе на увеличение ЧКК. По нашим данным, в условиях 2010 г. были обнаружены растения с 24 колосками в колосе у F_2 (C29 × Skle 123-09) и с 22 у F_2 (H67, P-4 × Skle 123-09)

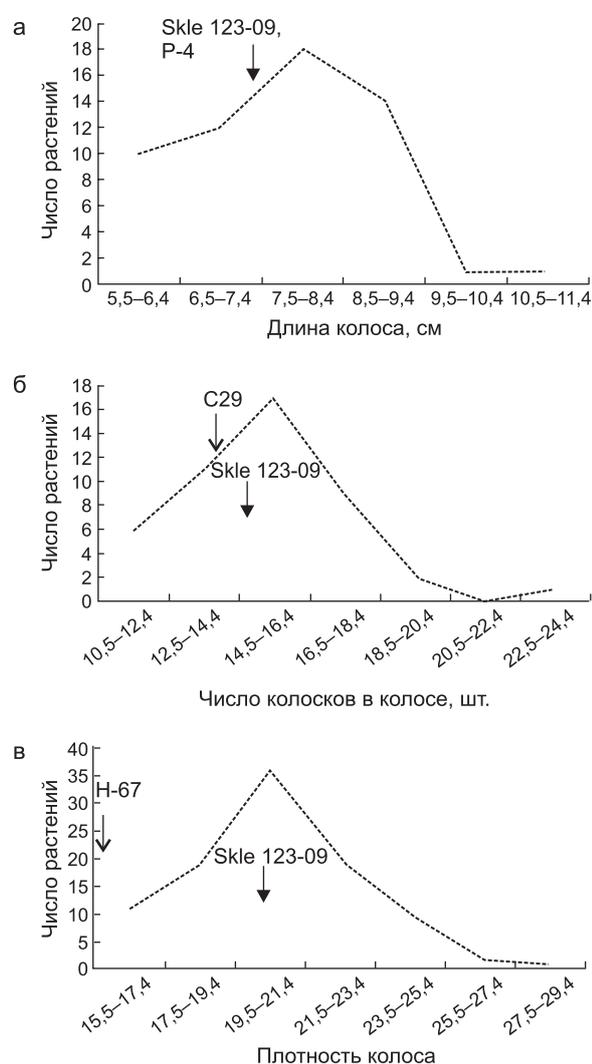


Рис. 2. Распределение показателей продуктивности колоса у растений гибридных популяций F_2 .

а – P-4 × Skle 123-09; б – C29 × Skle 123-09; в – H67 × Skle 123-09. Средние значения признаков родительских сортов указаны стрелками, Новосибирск, 2010.

Таблица 3

Двухфакторный дисперсионный анализ гибридов F₂ мягкой пшеницы по признакам продуктивности колоса

Изменчивость	C29 × Skle 123-09, длина колоса					H67 × Skle 123-09, длина колоса					P-4 × Skle 123-09, длина колоса								
	Сумма квадратов, S	Степени свободы, df	Средний квадрат, mS	Доля вариации, V, %	F-критерий	Вероятность	Сумма квадратов, S	Степени свободы, df	Средний квадрат, mS	Доля вариации, V, %	F-критерий	Вероятность	Сумма квадратов, S	Степени свободы, df	Средний квадрат, mS	Доля вариации, V, %	F-критерий	Вероятность	
Общая	3,198	7	0,457	100		4,600	7	0,657	100		2,720	7	0,389	100		2,720	7	0,389	100
Фактор А (год)	0,004	1	0,004	0,13	0,0346	0,86149	0,180	1	0,180	3,91	1,7143	0,26057	0,000	1	0,000	0,00	0,0000	1,00000	
Фактор В (генотип)	1,462	1	1,462	45,71	12,491	0,02414*	2,000	1	2,000	43,48	19,048	0,01202*	1,280	1	1,280	47,06	11,130	0,02894*	
Взаимодействие АВ	1,264	1	1,264	39,52	10,799	0,03032*	2,000	1	2,000	43,48	19,048	0,01202*	0,980	1	0,980	36,03	8,5217	0,04328*	
Случайные факторы	0,468	4	0,117	14,64		0,420	4	0,105	9,13		0,460	4	0,115	16,91		0,460	4	0,115	16,91
	C29 × Skle 123-09, число колосков колоса					H67 × Skle 123-09, число колосков колоса					P-4 × Skle 123-09, число колосков колоса								
Общая	5,115	7	0,731	100		5,655	7	0,657	100		4,175	7	0,596	100		4,175	7	0,596	100
Фактор А (год)	4,205	1	4,205	82,21	64,692	0,00130*	1,445	1	1,445	25,55	28,900	0,00578*	3,125	1	3,125	74,85	62,500	0,00138*	
Фактор В (генотип)	0,245	1	0,245	4,79	3,7692	0,12417	1,805	1	1,805	31,92	36,100	0,00386*	0,005	1	0,005	0,12	0,1000	0,76765	
Взаимодействие АВ	0,405	1	0,405	7,92	6,2308	0,06704	2,205	1	2,205	39,99	44,100	0,00267*	0,845	1	0,845	20,24	16,900	0,01472*	
Случайные факторы	0,260	4	0,065	5,08		0,200	4	0,105	3,54		0,460	4	0,050	4,79		0,460	4	0,050	4,79
	C29 × Skle 123-09, плотность колоса					H67 × Skle 123-09, плотность колоса					P-4 × Skle 123-09, плотность колоса								
Общая	18,880	7	2,697	100		16,855	7	2,408	100		17,055	7	2,436	100		17,055	7	2,436	100
Фактор А (год)	2,420	1	2,420	12,82	21,044	0,01013*	2,645	1	2,645	15,69	29,389	0,00561*	0,845	1	0,845	4,95	9,3889	0,03751*	
Фактор В (генотип)	8,000	1	8,000	42,37	69,565	0,00113*	5,445	1	5,445	32,30	60,500	0,00147*	11,045	1	11,045	64,76	122,72	0,00038*	
Взаимодействие АВ	8,000	1	8,000	42,37	69,565	0,00113*	8,405	1	8,405	49,87	93,389	0,00064*	4,805	1	4,805	28,17	53,389	0,00187*	
Случайные факторы	0,460	4	0,115	2,44		0,360	4	0,090	2,14		0,360	4	0,090	2,11		0,360	4	0,090	2,11

* Достоверно при $p < 0,05$.

(табл. 2). В засушливом 2011 г. картина была несколько иная. Так, у гибридов F_2 (C29 × Skle 123-09) были выявлены формы только с 20 колосками в колосе, у растений F_2 (H67, P-4 × Skle 123-09) – и с 24 колосками. Результаты двухфакторного анализа гибридов F_2 указывают на то, что изменчивость признака ЧКК значительно зависит от условий выращивания во всех комбинациях: на 82,2 % в F_2 (C29 × Skle 123-09), на 74,9 % в F_2 (P-4 × Skle 123-09) и на 25,6 % в F_2 (H67 × Skle 123-09). В первом случае генотип и взаимодействие «генотип × год» достоверно не влияли на выраженность ЧКК, генотип также достоверно не влиял и в комбинации F_2 (P-4 × Skle 123-09), но взаимодействовал со средой на 20,4 % (табл. 3). Вероятно, это связано с тем, что сорта C29 и P-4 были созданы для засухоустойчивых зон возделывания.

По литературным данным, почти все хромосомы в разной степени влияют на ЧКК. Так, Морис (Morris, 1974) методом моносомного анализа показала, что гены, детерминирующие ЧКК, локализованы в хромосомах 5A, 6A, 1B, 4B, 6B, 7B и 7D. По другим данным, ЧКК контролируется генами, расположенными во всех хромосомах, кроме 4A, 2B, 6D (Ауземус и др., 1970; Цильке Р.А., Цильке И.А., 1973, 1974, 1976). Установлено, что главные QTL признака ЧКК локализованы на хромосомах 4A и 5A, а минорные – на 2A, 3B и 7A (Araki *et al.*, 1999; Pestsova *et al.*, 2006; Чесноков и др., 2012).

Как было отмечено ранее, «плотность колоса» – это результирующий признак, зависящий от ДК и ЧКК. В нашем исследовании по данному признаку выделяется многоцветковая линия Skle 123-09, которая имеет плотный колос с индексом плотности, равным 20–21 в оба года изучения (табл. 1). Максимальное проявление признака наблюдали в 2011 г., когда отдельные растения Skle 123-09 имели индекс плотности 25 (табл. 2). Среди гибридов в популяциях F_2 были обнаружены отдельные растения с плотностью большей, чем у Skle 123-09. В условиях 2010 г. в популяциях F_2 (C29, H67, P-4 × Skle 123-09) по признаку D выделялись растения с индексом плотности колоса 27 и 29 соответственно (табл. 2). Конфигурации распределения признака у гибридов F_2 находились в диапазоне изменчивости родительских форм и были смещены в сторону увеличения призна-

ка, что указывает на доминирование большего значения признака, например, у гибридов F_2 (H67 × Skle 123-09, 2010 г.) (рис. 2, в). По нашему мнению, растения с более высоким индексом плотности, чем у формы Skle 123-09, могут являться исходным материалом для отбора, направленного на увеличение плотности колоса. При оценке доли влияния факторов показано, что на изменчивость признака «плотность колоса» у гибридов F_2 наименьшее, но достоверное, влияние оказывают условия среды (12,8, 15,7 и 5 %), а генотипический фон и взаимодействие «генотип × год» показали наибольший эффект (табл. 3).

Таким образом, в результате скрещивания сортов H67, C29 и P-4 с линией Skle 123-09 наблюдали появление трансгрессивных форм по изученным признакам. Это может свидетельствовать о том, что в детерминации признаков ДК, ЧКК и D играют значительную роль гены не только с аддитивным действием. Так, изменчивость признаков ЧКК и D в основном обусловлена генотипом и средой, а признака ДК – генотипом и взаимодействием «генотип × год». Оценка гибридов F_2 позволила выявить гибридные комбинации с комплексом положительных признаков продуктивности. Многоцветковую форму Skle 123-09 можно использовать в скрещиваниях при отборе на увеличение плотности колоса и числа колосков в колосе.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта VI.53.1.3 и Интеграционной программы СО РАН (№ 61).

П. Мартинек благодарит за поддержку Министерство сельского хозяйства Чешской Республики (проект QJ1310055).

ЛИТЕРАТУРА

- Арбузова В.С., Майстренко О.И. Изучение серий моносомных линий сортов пшеницы Саратовская 29 и Диамант I в разные годы вегетации по ряду количественных признаков. Сообщение I. Число колосков и зерен главного колоса // Генетика. 1986. Т. XXII. № 9. С. 2317–2325.
- Ауземус Э.Р., Мак-Нил Ф.Х., Шмидт Ю.У. Генетика и наследование // Пшеница и ее улучшение. М., 1970. 519 с.
- Вавилов Н.И. Научные основы селекции пшеницы // Теоретические основы селекции растений. Т. 2. М.; Л.: Сельхозгиз, 1935. 244 с.
- Дорофеев В.Ф. Пшеницы мира. Л.: ВО Агропромиздат,

1987. 559 с.
- Дорофеев В.Ф. Культурная флора СССР. Т. I. Пшеница. Л.: Колос, 1979. 356 с.
- Жученко А.А. Ресурсный потенциал производства зерна в России (теория и практика). М.: ООО «Изд-во Агрорус», 2004. 1110 с.
- Куперман Ф.М. Биологические основы культуры пшеницы. Биологические особенности формирования органов плононошения пшеницы. М.: МГУ, 1953. 299 с.
- Лелли Я. Селекция пшеницы. Теория и практика. М.: Колос, 1980. 384 с.
- Лукияненко П.П. Селекция и семеноводство озимой пшеницы. Избр. труды. М.: Колос, 1973. 448 с.
- Лутова Л.А., Ежова Т.Е., Додуева И.Е., Осипова М.А. Генетика развития растений / Под ред. С.Г. Инге-Вечтомова. 2-е изд. перераб. и доп. СПб.: ООО «Изд-во Н.-Л», 2010. 432 с.
- Мережко А.Ф. Проблема доноров в селекции растений. СПб.: ВИР, 1994. 127 с.
- Носатовский А.И. Пшеница. Биология. М.: Колос, 1965. 586 с.
- Острейко С.А. Новая форма пшеницы // Вестн. с.-х. науки. 1959. № 11. С. 133–137.
- Писарев В.Е. Селекция зерновых культур. Избранные работы. М.: Колос, 1964. 318 с.
- Ригин Б.В. Генетический контроль некоторых признаков мягкой пшеницы // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М.: Наука, 1971. С. 120–144.
- Рокицкий П.Ф. Введение в статистическую генетику. Минск: Высш. шк., 1974. 448 с.
- Филипченко Ю.А. Генетика мягких пшениц. М.; Л.: Сельхозгиз, 1934. 262 с.
- Цильке Р.А. Генетика, цитогенетика и селекция растений. Собрание науч. тр. Новосибирск: Новосиб. гос. аграрн. ун-т, 2003. 622 с.
- Цильке Р.А., Цильке И.А. Моносомный анализ плотности колоса у мягкой яровой пшеницы // Генетика. 1973. Т. IX. № 5. С. 5–12.
- Цильке И.А., Цильке Р.А. Моносомный анализ числа колосков в колосе мягкой яровой пшеницы // Генетика. 1974. Т. X. № 9. С. 5–10.
- Цильке Р.А., Цильке И.А. Моносомный анализ длины колоса мягкой яровой пшеницы // Генетика. 1976. Т. XII. № 10. С. 5–9.
- Чесноков Ю.В., Почепня Н.В., Козленко Л.В. и др. Картирование QTL, определяющих проявление агрономически и хозяйственно ценных признаков у яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) в различных экологических регионах России // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 4/2. С. 970–986.
- Жукудинер М.М. Пшеница. Описание культуры. Руководство по апробации сельскохозяйственных культур. М.: Колос, 1976. С. 7–39.
- Aliyeva A.J., Aminov N.K. Inheritance of the branching in hybrid populations among tetraploid wheat species and the new branched spike line 166-Schakheli // Genet. Res. Crop Evol. 2011. V. 58. P. 621–628.
- Araki E., Miura H., Sawada S. Identification of genetic loci affecting amylose content and agronomic traits on chromosome 4A of wheat // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 98. P. 977–984.
- Börner A., Schumann E., Fürste 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.
- Dobrovolskaya O., Martinek P., Voylokov A.V. *et al.* Microsatellite mapping of genes that determine supernumerary spikelets in wheat (*T. aestivum*) and rye (*S. cereale*) // Theor. Appl. Genet. 2009. V. 119. No. 5. P. 867–874.
- Feil B. Breeding progress in small grain cereals – a comparison of old and modern cultivars // Plant Breed. 1992. V. 108. P. 1–11.
- Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R. *et al.* Food security: The challenge of feeding 9 billion people // Science. 2010. V. 327. P. 812–818.
- Green A.J., Berger G., Griffey C.A. *et al.* Genetic yield improvement in soft red winter wheat in the eastern United States from 1919 to 2009 // Crop. Sci. 2012. V. 52. P. 2097–2108.
- Hucl P., Fowler J. Comparison of a branched spike wheat with the cultivars Neepawa and HY320 for grain yield and yield components // Can. J. Plant Sci. 1992. V. 2. P. 671–677.
- Jiang J., Fribe B., Gill B.S. Recent advances in alien gene transfer in wheat // Euphytica. 1994. V. 73. P. 199–212.
- Kato K., Miura H., Sawada S. Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 1114–1121.
- Li W.P., Zhao W.M. A breeding method for increasing spikelet and studies on creation of new germplasm resource in wheat // Acta Agron. Sin. 2000. V. 26. P. 222–230.
- McNeal F.H., Qualset C.O., Baldrige D.E., Stewart V.R. Selection for yield and yield components in wheat // Crop Sci. 1978. V. 18. P. 795–799.
- Ma Z., Zhao D., Zhang C. *et al.* Molecular genetic analysis of five spike-related traits in wheat using RIL and immortalized F₂ populations // Mol. Gen. Genomics. 2007. V. 277. P. 31–42.
- Martinek P. Branchiness of the turgidum type spikes, its heredity and utilization in wheat (*Triticum aestivum* L.) // Genet Slecht. 1994. V. 30. P. 61–67.
- Martinek P., Bednar J. Gene resources with non-standard spike morphology in wheat // Proc. Int. 9th Wheat Genet. Symp., Saskatoon, Canada. 2–7 Aug. 1988 / Ed. A. Slinkard. Univ. Saskatchewan, Saskatoon. P. 286–288.
- Martinek P., Bednar J. Changes of spike morphology (multirow-spike-MRS, long glumes-LG) in wheat (*Triticum aestivum* L.) and their importance for breeding // Proc. of Intern. Conf. «Genetic collections, isogenic and alloplasmic lines». Novosibirsk, Russia, 2001. P. 192–194.
- Marza F., Bai G.-H., Carver B.F., Zhou W.-C. Quantitative trait loci for yield and related traits in the wheat population Ning7840 × Clark // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 112. P. 688–698.
- Morgounov A., Haun S., Lang L. *et al.* Climate change at winter wheat breeding sites in central Asia, eastern Europe, and USA, and implications for breeding // Euphytica. 2013. V. 94. P. 277–292.
- Morris R. Chromosomal locations of genes for wheat characters // Wheat Newslett. 1974. V. 20. P. 20–44.
- Pestsova E.G., Börner A., Röder M.S. Development and

- QTL assessment of *Triticum aestivum*–*Aegilops tauschii* introgression lines // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 112. P. 634–647.
- Reynolds M., Bonnett D., Chapman S.C., Furbank R.T., Manès Y., Mather D.E., Parry M.A.J. Raising yield potential of wheat. I. Overview of a consortium approach and breeding strategies // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. No. 2. P. 439–452.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat // *Res. Bull. Mis. Agric. Exptl. Sta.* 1954. V.572. P. 1–58.
- Sreenivasulu N., Schnurbusch T. A genetic playground for enhancing grain number in cereals // *Trends Plant Sci.* 2012. V. 17. No. 2. P. 91–100.
- Sourdille P., Cadalen T., Guyomarc'h H. *et al.* An update of the Courtot × Chinese Spring intervarietal molecular marker linkage map for the QTL detection of agronomic traits in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 530–538.
- Zheng B.S., Gouis J.L., Leflon M. *et al.* Using probe genotypes to dissect QTL × environment interactions for grain yield components in winter wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. P. 1501–1517.
- Wang H., McCaig T. N., DePauw R. M. *et al.* Physiological characteristics of recent Canada western red spring wheat cultivars: Yield components and dry matter production // *Can. J. Plant Sci.* 2002. V. 82. P. 299–306.

**VARIABILITY OF SPIKE PRODUCTIVITY IN F₂ HYBRIDS
OBTAINED BY CROSSING COMMON WHEAT VARIETIES
NOVOSIBIRSKAYA 67, SARATOVSKAYA 29,
AND PUZA-4 TO THE SKLE 123-09 MULTIFLORET LINE**

V.S. Arbuzova¹, T.T. Efremova¹, P. Martinek², E.V. Chumanova¹, O.B. Dobrovolskaya¹

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

² Agrotest, Agricultural Testing, Advisory Services and Research, Ltd.,
Kroměříž, Czech Republic

Summary

Parameters of spike productivity were evaluated in plants of populations F₂ obtained by crossing the varieties Novosibirskaya 67, Saratovskaya 29, and Puza-4 with the Skle 123-09 line, characterized by the multifloret habit. Skle 123-09 differed significantly from the studied cultivars in spike density, but no significant differences were found in spike length or the number of spikelets per spike. Two-way analysis of variance in F₂ hybrids showed that the «spike length» variability character was determined mainly by the genotypic environment and the interaction of the factors «genotype × environment». The variability of the character “number of spikelets” was determined mainly by environmental conditions. This was particularly true for cultivars Saratovskaya 29 and Puza-4, recommended for arid areas. The variability of the resulting «spike density» character was affected by environmental conditions, genotype, and the «genotype × environment» interaction. The examination of the F₂ populations revealed plants with fan-shaped spikelets; high grain content, as in Skle 123-09; and the best performance of other spike traits. The selected plants will be used to fix the «multiple florets» character in the parental varieties.

Key words: common wheat, «multifloret» line, spike productivity characters, genetic analysis of the F₂ hybrids, analysis of variance.

УДК [634.11+634.13]:575.2

ПОЛИМОРФИЗМ ДИКОРАСТУЩИХ ВИДОВ РОДА *MALUS* MILL. ПО ГЕНУ (*MD-Exp-7*) БИОСИНТЕЗА ЭКСПАНСИНА

© 2014 г. Н.И. Савельев¹, И.Н. Шамшин², Н.Н. Савельева¹, А.С. Лыжин¹

¹ ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и селекции плодовых растений им. И.В. Мичурина, Мичуринск, Россия,
e-mail: cglm@ Rambler.ru;

² Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия,
e-mail: Ivan_Shamshin@mail.ru

Поступила в редакцию 23 октября 2014 г. Принята к публикации 7 октября 2014 г.

На основании молекулярно-генетического анализа среди диких видов рода *Malus* выявлен полиморфизм гена *MD-Exp7*, контролирующего биосинтез экспансина. Всего идентифицировано 8 аллельных форм гена, 4 из которых являются уникальными. Отмечены закономерности распределения аллелей у 37 генотипов согласно их систематическому положению. Выявлено значительное разнообразие данного признака как между секциями рода, так и между представителями внутри одной секции. Идентифицированы различные варианты гена среди представителей одного вида.

Ключевые слова: дикие виды яблони, ПЦР-анализ, аллельное разнообразие, ген *MD-Exp7*, лежкость плодов.

ВВЕДЕНИЕ

Род яблони *Malus* Mill. является наиболее важным для народного хозяйства. Яблоня имеет широкое распространение в различных эколого-географических условиях. При этом ее дикорастущие формы и виды обладают многими ценными хозяйственно-биологическими признаками, прежде всего меньшей требовательностью к условиям произрастания и более высокой адаптивностью по сравнению с другими плодовыми культурами. Однако они недостаточно широко используются в селекции ввиду их слабой генетической изученности (Пономаренко, 2013). Развитие методов современной генетики требует постоянного переосмысления применяемых подходов и совершенствования технологий анализа биологического материала. Поэтому одной из наиболее важных и перспективных задач в области селекции яблони является изучение молекулярно-генетических компонентов, ответственных за ключевые факторы отбора и позволяющих понять механизм функциони-

рования целевых генов и их распространение внутри рода.

Одним из таких факторов является срок хранения плодов яблони. Данный механизм имеет сложную генетическую структуру, которая контролируется комплексом генов, ответственных за различные биохимические реакции. К ним относится и биосинтез экспансина – белка, регулирующего твердость мякоти плодов. Экспансин участвует в нарушении нековалентных связей между матрицей гемицеллюлозы и целлюлозы микрофибрилл. Тем самым он способствует воздействию ферментов на клеточную стенку и подвергает ее разрушению (Шарова, 2007). Для гена *MD-Exp7*, вовлеченного в биосинтез экспансина у яблони, был разработан микросателлитный маркер *MD-Exp7^{SSR}*, который позволяет идентифицировать его аллельные состояния (Costa *et al.*, 2008).

Целью данной работы было изучение генетического полиморфизма дикорастущих видов и разновидностей рода *Malus* по аллелям гена биосинтеза экспансина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве биологических объектов исследования использованы видовые формы и разновидности яблони из коллекции ГНУ ВНИИГиСПР им. И.В. Мичурина. Цифровым индексом обозначены образцы одного вида, взятые из различных регионов распространения. Номер соответствует каталожному номеру ВНИИР им. Н.И. Вавилова.

Экстракция ДНК была проведена из части листовой пластинки каждого растения. Для выделения использовали метод, предложенный Д. Пучоа и адаптированный для работы с растениями с высоким содержанием полифенольных соединений (Puchooa, 2004).

Аmplификацию проводили в приборе T1000 производства фирмы BIO-RAD. Реакционная смесь для ПЦР объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTPs, 2,5 мМ MgSO₄, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 2,5 мМ 10× стандартного ПЦР-буфера. Все компоненты производства компании Fermentas. Для идентификации использовали следующую последовательность праймерных пар: MD-Exp7^{SSR} For 5'catagaaggtgcatgagca3', MD-Exp7^{SSR} Rev 5'tttctctcacacccaaacc3', синтезированных ЗАО «Синтол» (Москва).

ПЦР-реакция была проведена по следующей программе: 94 °С – 120 с, 35 циклов: 52 °С – 45 с, 72 °С – 120 с, 94 °С – 30 с; 1 цикл 52 °С – 45 с, 72 °С – 10 мин (Costa *et al.*, 2008).

Разделение продуктов амплификации проводили путем электрофореза в 6 %-м секвенирующем полиакриламидном геле (ПААГ) в камере для вертикального электрофореза Sequi-gen GT system (BIO-RAD). Электрофорез проводили в 1× TBE-буфере при следующих условиях: 500 В, 1100 мА, 110 Вт, 50–55 °С. Время проведения – 2 ч. Проявляли гель, используя метод окрашивания нитратом серебра (Benbouza *et al.*, 2006). Для определения длины амплифицированных фрагментов использовали маркер молекулярной массы 10bp DNA ladder (Invitrogen) (0,05 г/л).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате проведенного молекулярного анализа были получены электрофоретические

спектры для 37 видов и разновидностей дикорастущих видов яблони (рис.).

Анализируемые генотипы содержат различные комбинации аллелей гена *MD-Exp7*. Для удобства работы аллели обозначали латинскими буквами с цифровым индексом. У диких видов яблони идентифицированы аллельные варианты гена, размер которых: *A1* (198 п.н.), *B1* (201 п.н.), *C1* (202 п.н.), *D1* (204 п.н.), *E1* (210 п.н.), *F1* (214 п.н.), *G1* (220 п.н.), *H1* (226 п.н.), *I1* (230 п.н.) (табл.).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *MD-Exp7*, контролирующей биосинтез экспансина, расположен на первой хромосоме яблони. Ряд исследований подтверждают его роль в процессе хранения плодов (McQueen-Mason, Cosgrove, 1994; Шарова, 2007). Кроме того, авторы в своих работах находят зависимость твердости плода от аллельного варианта гена (Costa *et al.*, 2008, Nybom *et al.*, 2012). Однако все исследования ранее были сконцентрированы только на сортах. В проведенной нами работе рассмотрен полиморфизм данного гена у дикорастущих видов яблони, что позволяет оценить их потенциал для использования в маркер-опосредованной селекции.

Изучаемые виды, согласно классификации, предложенной Лангенфельдом (1991),

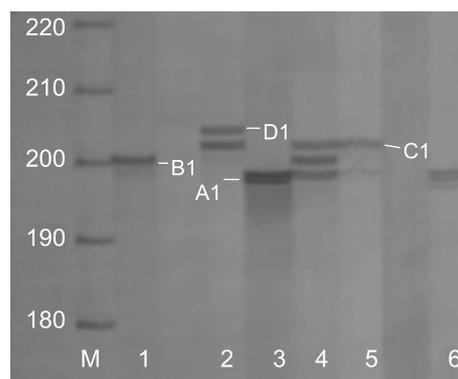


Рис. Аллельное разнообразие гена *MD-Exp7* среди дикорастущих видов яблони.

M – маркер молекулярного веса; 1 – *Malus hupehensis*; 2 – *M. turkmenorum* (K 13283); 3 – *M. sieboldi*; 4 – *M. loensis*; 5 – *M. niedzwetskiana* (K29422); 6 – *M. spectabilis* var. *Rubra plena*; 7 – *M. caspiensis* (K 14942); 8 – *M. orientalis* (K 29476); 9 – *M. cerasifera* (K 29494). *A1–D1* – аллельные варианты.

Таблица

 Аллельное разнообразие по гену *MD-Exp7*
 у дикорастущих видов и разновидностей рода *Malus*

№	Виды и разновидности яблони	Аллельные варианты (размер п.н.)*
Секция <i>Sorbomalus</i> Zabel		
1	<i>M. zumi</i> (Matsum.) Rehd.	<i>CI</i> (202)
2	<i>M. sargentii</i> Rehd.	<i>DI</i> (204)
3	<i>M. sieboldi</i> (Regel) Rehd.	<i>DI</i> (204)
Секция <i>Chloromeles</i> Rehd.		
4	<i>M. coronaria</i> (L.) Mill (K14986)	<i>AI</i> (198), <i>EI</i> (210)
5	<i>M. coronaria</i>	<i>CI</i> (202), <i>DI</i> (204)
6	<i>M. ioensis</i> (Wood) Britt	<i>DI</i> (204)
Секция <i>Gimnomeles</i> Koehne		
7	<i>M. baccata</i> (L.) Borkh (K 2317)	<i>CI</i> (202), <i>II</i> (230)
8	<i>M. baccata</i> (K 2324)	<i>BI</i> (201), <i>GI</i> (220)
9	<i>M. baccata</i> var. <i>coerulea</i>	<i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210)
10	<i>M. cerasifera</i> Spach (K 29494)	<i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210)
11	<i>M. cerasifera</i> var. <i>adarata</i>	<i>DI</i> (204), <i>EI</i> (210)
12	<i>M. cerasifera</i> var. <i>hiemalis</i>	<i>CI</i> (202), <i>EI</i> (210)
13	<i>M. cerasifera</i> var. <i>auramica</i>	<i>DI</i> (204)
14	<i>M. hupehensis</i> (Pamp.) Rehd.	<i>DI</i> (204)
15	<i>M. pallasiana</i> Juz.	<i>EI</i> (210)
16	<i>M. robusta</i> (Carr) Rehd (K 43199)	<i>GI</i> (220)
17	<i>M. robusta</i> var. <i>persicifoliae</i>	<i>FI</i> (214)
Секция <i>Malus</i> Langenf.		
18	<i>M. niedzwetskiana</i> Dieck. (K 29429)	<i>CI</i> (202)
19	<i>M. niedzwetskiana</i> (K 29422)	<i>AI</i> (198)
20	<i>M. niedzwetskiana</i> (K 13279)	<i>DI</i> (204)
21	<i>M. turkmenorum</i> Juz. et Pop. M. (K 29421)	<i>AI</i> (198), <i>CI</i> (202)
22	<i>M. turkmenorum</i> (K 13283)	<i>AI</i> (198)
23	<i>M. orientalis</i> Uglitzk. (K 41623)	<i>DI</i> (204)
24	<i>M. orientalis</i> (K 29476)	<i>AI</i> (198)
25	<i>M. orientalis</i> (K 49478)	<i>DI</i> (204)
26	<i>M. pumila</i> Mill	<i>CI</i> (202)
27	<i>M. purpurea</i> (Barbier) Rehd. (K 2392)	<i>DI</i> (204)
28	<i>M. purpurea</i> <i>Hienamensis</i>	<i>CI</i> (202)
29	<i>M. purpurea</i> var. <i>eleyi</i>	<i>AI</i> (198), <i>CI</i> (202)
30	<i>M. silvestris</i> (L.) Mill	<i>AI</i> (198)
31	<i>M. asiatica</i> Nakai (K 2343)	<i>AI</i> (198)
32	<i>M. caspiensis</i> Langenf.	<i>CI</i> (202), <i>GI</i> (220)
33	<i>M. caspiensis</i> (K 14943)	<i>DI</i> (204), <i>HI</i> (226)
34	<i>M. caspiensis</i> (K 14942)	<i>AI</i> (198)
35	<i>SR 0523</i>	<i>CI</i> (202), <i>DI</i> (204)
36	<i>NR12740-7A</i>	<i>DI</i> (204)
37	<i>M. spectabilis</i> var. <i>rubra plena</i> (Ait) Borkh	<i>CI</i> (202)

* Размер фрагментов рассчитан относительно близлежащих фрагментов маркера молекулярного веса, разница между которыми 10 п.н.

относятся к четырем секциям. Максимальным количеством видов представлена секция *Malus* (20 генотипов), к которой относятся молодые в эволюционном плане представители рода. Наиболее древними из анализируемых образцов являются растения секции *Sorbomalus*, куда вошли всего три вида.

Анализ генетического полиморфизма по гену *MD-Exp7* представителей различных секций рода *Malus* показал, что аллель *A1* размером 198 п.н. идентифицирован у следующих видов: *M. purpurea* var. *eleyi*, *M. silvestris*, *M. turkmenorum* (K29421), *M. asiatica* (K2343), *M. orientalis* (K29476), *M. caspiensis* (K14942), *M. niedzwetskiana* (K29422), *M. turkmenorum* (K13283). При этом большинство носителей аллеля являются представителями секции *Malus*. Кроме того, 5 видов из данной секции являются гомозиготными по данному аллелю. Как отмечают некоторые авторы, плоды этих видов имеют поздние сроки созревания, а для всех разновидностей *M. orientalis* отмечены такие качества, как плотная кожица плода и жесткая горькая мякоть. Они также обладают длительным периодом хранения (Барсукова, 2007). Аллель *A1* отмечен у представителя секции *Chloromeles* – вида *M. coronaria* (K14986). Вероятно, этому есть объяснение с точки зрения схожих условий произрастания, при которых данный вариант гена имеет важное значение для растения. При этом у еще одной разновидности *M. coronaria* данный аллель отсутствует.

У наибольшего количества диких видов яблони (15 образцов) присутствует аллель *C1* размером 202 п.н. Стоит отметить, что данная форма гена характерна для большинства генотипов не только исследуемых образцов, но и для культурных сортов яблони (Costa *et al.*, 2008; Шамшин и др., 2012; Урбанович и др., 2013). Возможно, что этот аллель является наиболее древним в сравнении с другими вариантами гена. Сочетание в генотипе аллелей *A1* и *C1* выявлено у видов *M. purpurea* var. *eleyi* и *M. turkmenorum* (K29421) из секции *Malus*. Аллель *F1* отмечен лишь у одной разновидности вида *M. robusta* var. *persicifoliae*.

Кроме описанных ранее аллелей гена *MD-Exp7*, у исследуемых видов обнаружены и другие аллельные варианты. Так, у 15 видов выявлен аллель *D1* размером 204 п.н. Отмечены

также аллели размером 210, 220, 226, 230 п.н., которые можно считать уникальными, так как они обнаружены у незначительного количества анализируемых образцов и в предыдущих работах не выявлены. Значение данных форм гена для растения неопределенно и требует дальнейшего изучения.

Полиморфизм изучаемого гена выявлен среди разновидностей одного вида. Так, например, у образцов вида *M. baccata* (*M. baccata* (K2317), *M. baccata* (K2324)), а также *M. baccata* var. *coerulea* выявлены аллели *I1*, *G1*, *E1* размером 230, 220 и 210 п.н. соответственно. Кроме того, необходимо отметить факт отсутствия аллеля *E1* у представителей секции *Malus*. Такое разнообразие, скорее всего, связано с различными условиями произрастания представителей этого вида, в результате чего возникают несколько вариантов данного гена.

Данные о разнообразии генов биосинтеза экспансина среди диких видов рода *Malus* свидетельствуют о том, что они могут быть перспективными для использования их в маркер-опосредованной селекции. Знания о генетической структуре отдельных видов или секций рода в целом позволяют более обоснованно планировать подбор родительских пар для скрещивания. При этом появляется возможность конкретной работы с определенными группами видов, обладающих наибольшим полиморфизмом данного признака.

ВЫВОДЫ

Проведенный молекулярный анализ дикорастущих видов яблони по гену биосинтеза экспансина *MD-Exp7* позволил выявить значительную полиморфность данного гена. Отмечено разнообразие как между секциями рода, так и между представителями внутри одной секции. Кроме того, у ряда представителей отмечены уникальные аллели гена, не идентифицированные ранее, имеющие размер 210, 220, 226, 230 п.н.

ЛИТЕРАТУРА

- Барсукова О.Н. Виды, разновидности и формы рода *Malus* Mill. Иммунологическая характеристика // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб., 2007. Вып. 781. 26 с.

- Лангенфельд В.Т. Яблоня: Морфологическая эволюция, филогения, география, систематика. Рига: Зинатие, 1991. 234 с.
- Пономаренко В.В., Пономаренко К.В. Генофонд видов рода *Malus* Mill. Яблоня / В.В. Пономаренко, К.В. Пономаренко. СПб.: Общество памяти игумении Таисии, 2013. 222 с.
- Урбанович О.Ю., Кузмицкая П.В., Козловская З.А. и др. Аллельный состав генов *MD-ACS1*, *MD-ACO1* и *MD-EXP7* сортов яблони (*Malus × domestica* Borkh.) с различным сроком хранения плодов // Вестн. Национальной академии наук Беларуси (Сер. «биол. науки»). 2013. № 3. С. 47–55.
- Шамшин И.Н., Савельев Н.И., Кудрявцев А.М. Аллельное разнообразие гена *MD-EXP 7* у сортов яблони и груши // Вестн. Мичуринск. гос. аграр. ун-та. 2012. № 4. Ч. 1. С. 23–26.
- Шарова Е.И. Экспансины – белки, размягчающие клеточные стенки в процессе роста и морфогенеза растений / Е.И. Шарова // Физиол. растений. 2007. Т. 54. С. 805–819.
- Benbouza H., Jacquemin J.-M., Baudoin J.-P. *et al.* Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels // Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006. V. 10. No. 2. P. 77–81.
- Costa F., Van de Weg W.E., Stella S. Map position and functional allelic diversity of *Md-Exp7*, a new putative expansin gene associated with fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and pear (*Pyrus communis*) // Tree Genet. Genomes. 2008. V. 4. P. 575–586.
- McQueen-Mason S., Cosgrove D.J. Disruption of hydrogen bonding between Wall polymers by proteins that induce plant wall extension / S. McQueen-Mason, D.J. Cosgrove // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 6574–6578.
- Nybom H., Ahmadi-Afzadi M., Sehic J., Maarten H. DNA marker-assisted evaluation of fruit firmness at harvest and post-harvest fruit softening in a diverse apple germplasm / H. Nybom, M. Ahmadi-Afzadi, J. Sehic, H. Maarten // Tree Genet. Genomes. 2012. V. 9. No. 1. P. 279–290.
- Puchooa D.A. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis*- Sonn.) / D.A. Puchooa // Afr. J. Biotechnol. 2004. V. 3. No. 4. P. 253–255.

POLYMORPHISM FOR THE MD-EXP-7 GENE FOR EXPANSIN BIOSYNTHESIS IN WILD SPECIES OF THE GENUS *MALUS* MILL

N.I. Savel'ev¹, I.N. Shamshin², N.N. Savel'eva¹, A.S. Lyzhin¹

¹ Michurin All-Russia Research Institute of Fruit Crop Genetics and Breeding, Michurinsk, Russia, e-mail: cglm@rambler.ru;

² Michurin State Agrarian University, Michurinsk, Russia, e-mail: Ivan_Shamshin@mail.ru

Summary

Molecular analysis revealed polymorphism for the *MD-Exp7* gene, controlling expansin biosynthesis, in wild *Malus* species. Eight allelic forms of the gene were identified, and four of them were unique. The regularities in the allele distribution in 37 genotypes were found to be in accordance with their systematic positions. The trait was found to be broadly diverse both among the sections of the genus and within a particular section. Variants of the gene were identified in representatives of one species.

Key words: wild apple species, PCR test, allelic diversity, *MD-Exp7* gene, fruit storability.

УДК 575.174.015.3

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФРАГМЕНТА ГЕНА КИСЛОЙ ВАКУОЛЯРНОЙ ИНВЕРТАЗЫ *PAIN-1* У СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ

© 2014 г. М.А. Слугина^{1,2}, Е.З. Кочиева^{1,2}¹ Центр «Биоинженерия» Российской академии наук, Москва, Россия;² Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, кафедра биотехнологии, Москва, Россия, e-mail: ekochieva@yandex.ru

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 1 октября 2014 г.

Фермент кислая вакуолярная инвертаза *Pain-1* определяет содержание крахмала и сахаров в клетках, а также участвует в формировании ответной реакции растения на воздействие абиотического стресса. Впервые охарактеризована переменность фрагмента (экзон V–экзон VII) гена *Pain-1* у 19 сортов картофеля российской и зарубежной селекции. Выявлено 25 полиморфных нуклеотидных позиций. Детектирован ранее не описанный SNP C₁₈₉₅ в экзоне VII. 5 из 8 SNPs, детектированных в экзонах, приводили к аминокислотным заменам, три из которых были радикальными. Также были выявлены три аминокислотные замены в последовательности консервативного C-терминального гликозилгидролазного домена.

Ключевые слова: сорта картофеля, кислая вакуолярная инвертаза, аллельная переменность, нуклеотидный и аминокислотный полиморфизм.

ВВЕДЕНИЕ

Инвертазы – группа ферментов, осуществляющих необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Инвертазы играют важную роль в метаболизме углеводов и распределении источников углерода между фотосинтезирующими тканями растений и гетеротрофными органами, такими как семена, клубни и плоды (Elliott *et al.*, 1993). Показано, что работа ферментов углеводного метаболизма, в частности растительных инвертаз, играет важную роль в формировании устойчивости к воздействию биотических и абиотических стрессовых факторов, таких как засуха, холод и засоление (Draffehn *et al.*, 2010).

Всего у растений обнаружены три типа инвертаз, кодируемых тремя небольшими генными семействами: инвертазы, связанные с клеточной стенкой и расщепляющие сахарозу в апопласте (апопластические инвертазы); растворимые кислые инвертазы, локализованные в вакуолях (вакуолярные инвертазы);

цитоплазматические растворимые нейтральные инвертазы (Ji *et al.*, 2005).

Кислая вакуолярная инвертаза, кодируемая геном *Pain-1*, участвует в регуляции накопления сахарозы в вакуоли, влияет на растяжение клеток и формирование ответа на воздействие гормонов. Принято считать, что активность кислых инвертаз в значительной степени регулируется стрессовыми факторами среды (Koch, 2004; Ruan *et al.*, 2010; Alpacete *et al.*, 2011). Так, показано, что активность кислой вакуолярной инвертазы повышается в пострадавших от насекомых листьях и гетеротрофных органах (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012). Более того, предполагается, что данный сахаролитический фермент совместно с сахарозосинтазами может иметь значение в распределении запасов углерода, что способствует сохранению роста при потере листьев (Castrillón-Arbeláez *et al.*, 2012).

В настоящее время у представителей сем. Solanaceae гены кислой вакуолярной инвертазы идентифицированы только у картофеля *Solanum tuberosum* и двух видов томата (*S. lycopersicum* и

S. pimpinellifolium). Гены вышеперечисленных видов растений имеют протяженность более 4 т.п.н. и состоят из 7 экзонов и 6 интронов. Изучение полиморфизма генов инвертаз у картофеля и томата выявило значимую корреляцию, особенно гена *Pain-1*, с содержанием полисахаридов в плодах и клубнях, а также с общей адаптивностью растений к стрессовым условиям (Ji *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Draffehn *et al.*, 2010). С использованием сравнительного анализа последовательностей *Pain-1* у растений *S. tuberosum* с 6 гетерозиготными генотипами (3 тетраплоидных и 3 диплоидных) найдены 11 различных аллельных вариантов, в разной степени связанных с превращением и накоплением крахмала (Draffehn *et al.*, 2010). Таким образом, выявление аллельных вариантов генов у широкого круга разнообразных сортов картофеля может иметь практическое значение, заключающееся в идентификации нуклеотидных и аминокислотных замен,

ассоциированных с хозяйственно важными признаками.

Целью данной работы являются описание нуклеотидного и аминокислотного полиморфизма последовательностей кислой вакуолярной инвертазы *Pain-1* у различных сортов картофеля российской и зарубежной селекции и оценка их аллельного разнообразия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для изучения аллельного полиморфизма генов кислой вакуолярной инвертазы был составлен набор из 19 сортов картофеля российской и зарубежной селекции, различающихся по содержанию крахмала в клубнях и устойчивости к абиотическим факторам (табл. 1).

Выделение ядерной растительной ДНК производили по методике, описанной ранее (Слугина и др., 2013). Для амплификации анализируемого фрагмента гена *Pain-1* у сортов кар-

Таблица 1

Сорта картофеля, выбранные для исследования

Сорт	Страна	Крахмалистость, %*	Засухо-устойчивость*	Холодо-устойчивость*
Ресурс	Россия	13–16	+	
Петербургский	Россия	13–16	–	
Невский	Россия	10–12	+	
Чародей	Россия	15–17	+	
Любимец	Россия	11–15		+
Брянский ранний	Россия	14–16	–	+
Голубизна	Россия	17–19	+	
Яхонт	Белоруссия	–		
Атлант	Белоруссия	17–22		
Ласунак	Белоруссия	15–22	–	
Лазурит	Белоруссия	14–16		
Явар	Белоруссия	10–13		
Бинтье	Голландия	различная		
Никита	Голландия	13,5–18		
Дезире	Голландия	13–21	–	
Гранола	Германия	низкая–средняя		
Адретта	Германия	13–18	–	
Фрегата	Польша	14–16		
Руссет Бурбанк	США	высокая		

* Данные по: Симаков и др., 2010.

тофеля была разработана пара праймеров: IV5F (5'CGGAATTGGATTGTGGAATTG3') и IVendR (5'CGGTTTCCAGGAACCCATACATT3').

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала 1× буфер (50 мМ Tris Cl (pH = 8,6), 50 мМ KCl, 0,1 % Tween 20 («Диалат», Москва)), 1,5 М MgCl₂, 20 мМ dNTP; 10 мкМ соответствующего праймера; 0,25 единиц Taq полимеразы и ~100 нг геномной ДНК. Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: 1) первый цикл: 94 °С – 5 мин; 2) последующие 35 циклов: 94 °С – 30 с, 57,5 °С – 40 с и 72 °С – 1 мин. После окончания последнего цикла смеси дополнительно выдерживали 10 мин при 72 °С для достройки незавершенных цепей, затем 5 мин при 10 °С. Анализ полученных продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1 %-м агарозном геле. Результаты документировали в системе BioDoc II (Biometra, Германия).

Полученные фрагменты секвенировали с использованием тех же праймеров, что и для амплификации. Секвенирование проводили с использованием реагентов ABI PRISM Dye Deoxi terminator sequencing kit («Applied Biosystems», США), согласно протоколу фирмы-производителя на автоматическом секвенаторе ABI 310 capillary DNA Analyzer («Applied Biosystems», США) в Центре «Биоинженерия» РАН.

Выравнивание и анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей проводили с помощью программы MEGA 5.0 (Kumar, 2011).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента гена *Pain-1* (экзон V – стоп-кодон). Для анализа аллельного полиморфизма *Pain-1* выбран наиболее варибельный фрагмент гена в интервале с V по VII экзон (Слугина. Личные данные), который включал последовательность функционального С-терминального домена и для которого ранее была показана возможная связь аллельного полиморфизма с хозяйственно ценными признаками (Draffehn *et al.*, 2010).

При использовании разработанных праймеров IV5F и IVendR у 19 сортов картофеля амплифицированы и секвенированы фрагменты гена *Pain-1*. Доступная для анализа последовательность содержала экзон V–интрон V–экзон IV–интрон IV–экзон IIIV (до стоп-кодона) (рис.).

Было показано, что идентифицированные последовательности фрагмента гена кислой вакуолярной инвертазы у анализируемых сортов картофеля инвариантны по длине (707 н.п.), за исключением сорта Брянский ранний (697 п.н.), у которого выявлены 11-нуклеотидная делеция (CAAGCTTATAT) и мононуклеотидная инсерция (T) в интроне VI. Общий уровень полиморфизма составил 3,53 %. Как и ожидалось, в составе исследованной последовательности полиморфизм интронов был выше полиморфизма экзонов: 6,75 и 1,91 % соответственно.

Наибольший интерес при проведении данного исследования представлял анализ варибельности экзонов, так как именно такие замены могут потенциально привести к изменению конформации нативного белка, что может отразиться на его функции. Ранее на широкой выборке из 219 образцов картофеля, включающих тетраплоидные сорта Satina, Diana, Theresa, диплоидные и селекционные линии, было выявлено 28 единичных точковых замен (SNP) в нуклеотидной последовательности гена *Pain-1* и 11 аллельных вариантов белка кислой вакуолярной инвертазы (Draffehn *et al.*, 2010). Из 28 ранее идентифицированных нуклеотидных замен 25 SNP были детектированы в анализируемом фрагменте (экзон V–VII) гена *Pain-1*. Было показано, что определенные нуклеотидные замены в первичной последовательности *Pain-1* могут быть ассоциированы с хозяйственно ценными признаками, такими как повышенное содержание крахмала и качество клубней (Draffehn *et al.*, 2010).

Из 25 SNP, обнаруженных в анализируемых последовательностях сортов российской и зарубежной селекции, 8 замен локализовались в экзонах. При этом следует заметить, что в экзоне VII был выявлен новый SNP C₁₈₉₅: ранее по этому положению детектировались только A/G. Всего у анализируемых сортов картофеля было идентифицировано 9 аллельных вариантов *Pain-1* (табл. 2).

Как видно из табл. 2, большая часть образцов представлена двумя основными аллельными вариантами: А и В. При этом два преобладающих аллельных варианта различаются по SNP₁₈₉₅, а также гетерозиготой C/A₁₅₄₄. Как в группу А, так и в группу В входят виды как с высоким, так и с низким содержанием крахмала. Остальные

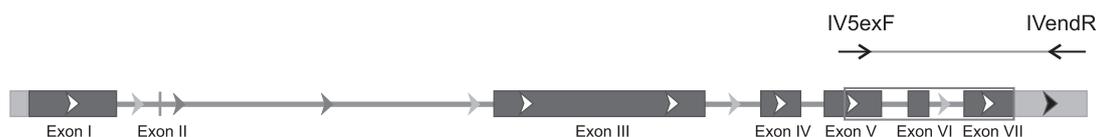


Рис. Анализируемый фрагмент гена *Pain-1*.

аллельные варианты были выделены только у некоторых сортов.

Ранее было показано, что SNP A₁₅₄₄ считается наиболее значимым, так как коррелирует с повышенным содержанием и выходом крахмала клубней (Draffehn *et al.*, 2010). Среди рассматриваемого в данной работе набора образцов аллельный вариант A₁₅₄₄ присутствовал в последовательности гена *Pain-1* сорта российской селекции Брянский ранний. Сорт раннеспелый, содержание крахмала в нем относительно высокое – 14–16 %. Отличительной чертой данного

сорта является повышенная холодоустойчивость: сорт успешно переносит переохлаждение при хранении и ранний посев (Симаков и др., 2010). Можно предположить, что столь высокие качественные характеристики данного сорта могут иметь ассоциацию с SNP A₁₅₄₄ в гене инвертазы *Pain-1*. Ряд сортов (Яхонт, Явар, Фрегата, Дезире, Руссет Бербанк, Атлант, Ласунак), большинство из которых характеризуются высоким содержанием крахмала в клубнях (Симаков и др., 2010), оказались гетерозиготами, при этом преобладающим аллелем является C₁₅₄₄, но помимо него

Таблица 2

SNP в экзонах и аминокислотные замены

Экзон	Экзон V				Экзон VI	Экзон VII			Аллельный вариант
	№ нуклеотида на кДНК	snp1574	snp1596	snp1629		snp1661	snp1843	snp1895	
Нуклеотидная замена	C/A	A/T	T/C	T/C	A/G	G/T	G/A	A/G	
Аминокислотная замена	T515K	Y525F			Q554R	A615S	R632Q		
Гранола	C	A/T	C	C	A	T	A	A	A
Адретта	C	A	C	C	A	T	A	A	
Бинтье	C	A	C	C	A	T	A	A	
Никита	C	A	C	C	A	T	A	A	
Чародей	C	A	C	C	A	T	A	A	
Любимец	C	A	C	C	A	T	A	A	
Яхонт	C/A	A	C	C	A	T	C	A	B
Атлант	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Ласунак	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Явар	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Фрегата	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Руссет Бурбанк	C/A	A	C	C	A	T	C	A	
Петербургский	C	A	C	C	A	T	A	G	C
Голубизна	C	T	C	C	A	G	G	A	D
Лазурит	C	A	C	C	A	G	G	A	E
Дезире	C/A	A	T	T	A	G	C	A	F
Невский	C	A	T	T	A	G	G	G	G
Брянский ранний	A	A	T	T	A	G	G	A	H
Ресурс	C	T	T	T	G	G	G	A	I

в их геноме присутствует аллель инвертазы с заменой A₁₅₄₄ (соотношение 1 : 3). Этот факт представляет интерес, так как данная группа образцов может быть использована в селекции для создания холодоустойчивых сортов с повышенным содержанием крахмала.

Анализ аминокислотной последовательности. Фермент кислая вакуолярная инвертаза относится к гликозид гидролазному семейству белков 32 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEV46297.1>). Ферменты данного семейства обладают либо гидролазной, либо гликозилтрансферазной активностью. Фрагмент пептида, включающий аминокислоты с 506 по 586, соответствует С-терминальному домену гликозилгидролаза, который формирует бета-сэндвич модуль белка (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AEV46297.1>).

Рассматриваемый в данной работе участок нуклеотидной последовательности был транслирован, и было показано, что данный фрагмент кислой вакуолярной инвертазы соответствует последовательности белка, включающей аминокислоты с 483 по 639, и, таким образом, содержит полную последовательность С-терминального гликозилгидролазного домена.

Подобно анализу вариабельности последовательности гена *Pain-1*, проведен анализ полиморфизма аминокислотного состава. Ранее на данном фрагменте инвертазы идентифицировано 15 аминокислотных замен (Draffehn *et al.*, 2010). Пять из них встречаются у анализируемых сортов картофеля (табл. 1), при этом замены T515K, Q554R, R632Q являются радикальными и потенциально могут привести к образованию иной конформации белка. Интересно, что три аминокислотные замены (T515K, Y525F, Q554R) выявлены в пределах достаточно консервативного С-терминального гликозилгидролазного домена. Замена T515K выявлена у единственного сорта – Брянский ранний. Замена A615S есть у всех сортов аллельных групп А и В, а также у сорта Петербургский. Замена R632Q характерна для сортов группы А и сорта Петербургский.

Таким образом, в данной работе впервые описан полиморфизм нуклеотидных и аминокислотных последовательностей и определены аллельные варианты наиболее вариабельного участка гена кислой вакуолярной инвертазы 19 сортов картофеля российской и зарубежной

селекции. Полученные данные о нуклеотидной и аминокислотной вариабельности кислой вакуолярной инвертазы могут быть в дальнейшем использованы в селекции сортов картофеля с повышенным содержанием крахмала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки (ГК № 14.М04.12.0016) и программы Президиума Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

- Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Еланский С.Н., Зейрук В.Н., Кузнецова М.А., Мальцев С.В., Пшеченков К.А., Складорова Н.П., Спиглазова С.Ю., Яшина И.М. Сорта картофеля, возделываемые в России. М.: Агроспас, 2010. 128 с.
- Слугина М.А., Снигирь Е.А., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-1*, кодирующего вакуолярную инвертазу *Solanum* // Молекуляр. биология. 2013. Т. 47. С. 243–250.
- Albacete A., Grosskinsky D.K., Roitsch T. Trick and treat: A review on the function and regulation of plant invertases in the abiotic stress response // *Phyton – Annales Rei Botanicae*. 2011. V. 50. P. 181–204.
- Castrillón-Arbeláez P.A., Martínez-Gallardo N., Arnaut H.A., Tiessen A., Délano-Frier J.P. Metabolic and enzymatic changes associated with carbon mobilization, utilization and replenishment triggered in grain amaranth (*Amaranthus cruentus*) in response to partial defoliation by mechanical injury or insect herbivory // *Plant Biol*. 2012. V. 12. P. 163–185.
- Draffehn A.M., Sebastian M., Li L., Gebhardt C. Natural diversity of potato (*Solanum tuberosum*) invertases // *BMC Plant Biol*. 2010. V. 10. P. 271–286.
- Elliott K.J., Butler W.O., Dickinson C.D., Konno Y. *et al.* Isolation and characterization of fruit vacuolar invertase genes from two tomato species and temporal differences in mRNA levels during fruit ripening // *Plant Mol. Biol*. 1993. V. 21. P. 515–524.
- Ji X., Ende van den W., Laere van A. *et al.* Structure, evolution and expression of the two invertase gene families of rice // *Mol. Evol*. 2005. V. 60. P. 615–634.
- Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Curr. Opin. Plant Biol*. 2004. V. 7. P. 235–246.
- Kumar S., Tamura K., Peterson D. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // *Mol. Biol. Evol*. 2011. V. 28. No. 10. P. 2731–2739.
- Li L., Paulo M-J., Strahwald J., Lubeck J., Natural H-R. DNA variation at candidate loci is associated with potato chip color, tuber starch content, yield and starch yield // *Theor. Appl. Genet*. 2008. V. 116. P. 1167–1181.
- Ruan Y-L., Jin Y., Yang Y-J., Li G-J., Boyer J.S. Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat // *Mol. Plant*. 2010. V. 3. P. 942–955.

VARIABILITY OF A FRAGMENT OF THE ACID VACUOLAR INVERTASE *PAIN-1* GENE IN POTATO CULTIVARS

M.A. Slugina^{1,2}, E.Z. Kochieva^{1,2}

¹ Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

² Chair of Biotechnology, Biological Department, Lomonosov State University, Moscow, Russia,
e-mail: ekochieva@yandex.ru

Summary

Acid vacuolar invertase Pain-1 participates in the regulation of starch and sucrose contents in cells. This enzyme is also involved in plant response to abiotic stress. For the first time *Pain-1* gene fragment (exon V – exon VII) polymorphism was determined in 19 potato varieties. A total of 25 SNPs were detected. A new SNP, C₁₈₉₅, was found in exon VII. Five of eight SNPs located in exons led to amino acid substitutions. Three of them were radical. It was shown that the conservative C-terminal domain contained three variable amino acids.

Key words: potato varieties, acid vacuolar invertase, allelism, nucleotide and amino acid polymorphism.

УДК 575.174.015.3

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ИНТРОНА ПЛАСТИДНОГО ГЕНА *trnL* У ВИДОВ FABOIDEAE (СЕМ. FABACEAE)

© 2014 г. Е.А. Дьяченко^{1,2}, М.А. Филюшин¹, Е.П. Пронин², Е.З. Кочиева^{1,3}

¹ Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, Россия,
e-mail: dyachenko-el@yandex.ru;

² Всероссийский научно-исследовательский институт селекции и семеноводства
овощных культур, поселок ВНИИССОК, Одинцовский район, Московская область, Россия;

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
кафедра биотехнологии, Москва, Россия

Поступила в редакцию 16 сентября 2014 г. Принята к публикации 21 октября 2014 г.

Инtron, расположенный между первым и вторым нуклеотидами антикодона лейциновой транспортной РНК, является единственным представителем интронов группы I у высших растений. В данной работе впервые охарактеризована последовательность интрона пластидного гена *trnL* у 16 видов бобовых и построена вероятная вторичная структура всего интрона и отдельных функциональных участков. Выявлен высокий уровень полиморфизма как между родами семейства Fabaceae, так и между видами одного рода. В последовательностях каталитического центра, которые считаются крайне консервативными, были детектированы единичные нуклеотидные замены.

Ключевые слова: растения, инtron группы I, хлоропластный геном, нуклеотидный полиморфизм, вторичная структура интрона.

ВВЕДЕНИЕ

Интроны группы I представляют собой последовательности, способные катализировать собственный сплайсинг из последовательности пре-РНК. Механизм сплайсирования включает две связанные реакции трансэтерификации в присутствии гуанозинового кофактора на первом этапе с последующими конформационными изменениями последовательности РНК интрона. Границы между экзонами и интроном обычно четко определены на уровне вторичной структуры пре-РНК. Механизм сплайсирования интронов группы I зависит от стабильной вторичной структуры пре-РНК, состоящей из 10 элементов (Nielsen *et al.*, 2009).

Вторичные структуры, образованные интронами группы I, представляют собой центральный (коровый) элемент и периферические элементы, функцией которых считается стабилизация центрального элемента. Центральный элемент ответственен за каталитическую актив-

ность и представляет собой три спиральные петли/структуры, которые формируют активный центр рибозима. Периферические элементы могут также включать различные последовательности (кодирующие, повторяющиеся и др.) (Nielsen *et al.*, 2009).

Единственным интроном группы I у фотосинтезирующих растений является инtron гена лейциновой тРНК *trnL* пластидного генома, который встроен между U и A в антикодонном триplete UAA тРНК^{Leu}. Считается, что инtron тРНК^{Leu} возник 2,7–3,5 млрд лет назад у предков цианобактерий и порядка 1 млрд лет назад был перенесен в составе пластидного генома в эукариотическую клетку растений (Paquin *et al.*, 1997, Summons *et al.*, 1999). Однако не ясно, сохранена ли рибозимная функция этого интрона, показанная для цианобактерий, в пластидах растений.

В настоящее время известно около 16 000 последовательностей интрона *trnL*, представленных в базе GISSD (Zhou *et al.*, 2008). По-

следовательности, включающие район гена *trnL*, широко используются для реконструкций филогении, в популяционной генетике и для ДНК-штрихкодирования на различных таксономических уровнях (Borsch *et al.*, 2003; Taberlet *et al.*, 2007; Yulita, 2013). Однако данные о вторичных структурах и изменениях во вторичных структурах интрона тРНК^{Leu} крайне ограничены. Поэтому представлялось интересным определить вторичные структуры интрона *trnL* у образцов различного таксономического уровня; определить вариабельность последовательностей, места локализации нуклеотидных замен и возможность изменения вторичной структуры интрона группы I гена *trnL*.

Семейство Fabaceae насчитывает более чем 40 культурных видов и включает 3 подсемейства и более 30 триб, в том числе трибы Viciae, Cicereae, Trifolieae и Phaseoleae подсемейства Faboideae, которое включает большинство агрономически ценных видов, таких как горох, бобы, фасоль, чечевица и др. (Weeden, 2007).

Таким образом, целью работы стало определение первичной последовательности интрона гена *trnL* у семейства Fabaceae, включая представителей всех пяти родов видов трибы Viciae, а также представителей триб Trifolieae, Cicereae и Phaseoleae; исследование нуклеотидного полиморфизма последовательности, в том числе в функционально значимых участках, а также построение вероятной вторичной структуры всего интрона и его отдельных частей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения исследования из коллекции ГНУ ВНИИР им. Н.И. Вавилова РАСХН (Санкт-Петербург) были отобраны образцы 16 видов 8 родов, относящихся к трибам Viciae (Fabaceae), Cicereae, Trifolieae, и Phaseoleae подсем. Faboideae (табл. 1).

Выделение ДНК проводили по стандартной методике (Слугина и др., 2013). Амплификацию гена *trnL* проводили с праймерами, соответствующими концевым 5'- и 3'-последовательностям экзона гена *trnL*. Пара праймеров trnLF (CGAAATCGGTAGACGCTACG) и trnLR (GGGGATAGAGGGACTTGAAC) была

разработана на основании известных последовательностей интрона у бобовых, представленных в базе данных NCBI. Анализ полученного продукта проводили методом электрофореза в 1 %-м агарозном геле. Первичные последовательности амплифицированных фрагментов были определены методом прямого секвенирования с использованием праймеров. Выравнивание последовательностей производили с помощью программы MEGA 5.0. (Tamura *et al.*, 2011). Определение позиций единичных нуклеотидных замен и делеций и дупликаций в интроне проводили по последовательности *Lens culinaris*. Для построения вторичных структур пре-мРНК интрона была использована программа MFOLD (Zuker, 2003).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Вариабельность последовательности интрона *trnL*

Последовательность гена *trnL* у 16 образцов Fabaceae была амплифицирована и секвенирована. Полученные первичные последовательности *trnL* были выровнены, определены границы экзонов и интрона. Как и ожидалось, длины последовательностей экзона I и II гена *trnL* у всех анализируемых образцов составляли 35 п.н. и 50 п.н. соответственно и были инвариантны (табл. 1).

Как и у всех растений, последовательность интрона *trnL* была А/Т богатой. GC состав интрона практически не различался у представителей анализируемых родов Fabaceae (31,4–33,3%). Так, было показано, что для представителей *Gnetum* GC состав варьировал в пределах 34–39%, у *Welwitschia* он составил 30% (Wop, Renner, 2005). GC состав у голосеменных рода *Taxus* составил 32%, у родственного *Cephalotaxus* – 35% (Gielly *et al.*, 1996).

В отличие от экзонов, последовательность интрона *trnL* анализируемых образцов характеризовалась высоким уровнем полиморфизма. Длина последовательности интрона *trnL* варьировала в пределах от 430 п.н. у образца вида *L. culinaris* (триба Viciae) до 555 п.н. у вида *S. arietinum* (триба Cicereae) (табл. 1). При этом следует отметить, что вариабельность по длине выявлялась не только между представителями

Таблица 1

Характеристика интрона гена *trnL* у представителей подсемейства Faboideae

№ п/п	Вид	Каталожный номер/происхождение	Длина интрона <i>trnL</i> , п.н.	Длина Р6 петли, п.н.	Длина Р8 петли, п.н.	GC состав, %
Триба Viciae						
1	<i>Lathyrus sativus</i>	701	442	57	205	32,1
2	<i>Lathyrus aphaca</i>	1293	442	61	201	32,4
3	<i>Lathyrus gmelinii</i>	453	441	61	200	33,3
4	<i>Lathyrus sphaericus</i>	1329	437	61	195	32,5
5	<i>Lathyrus ochrus</i>	380	436	61	195	33,3
6	<i>Lathyrus clymenum</i>	1370	441	61	200	32,9
7	<i>Pisum fulvum</i>	422009	437	57	200	32,7
8	<i>Pisum sativum</i>	3980	432	57	195	32,9
9	<i>Vavilovia formosa</i>	4/Армения	432	57	195	33,3
10	<i>Vicia unijuga</i>	k-35828	452	61	211	32,7
11	<i>Vicia villosa</i>	277	421	30	211	31,4
12	<i>Vicia faba</i>	1506	451	50	221	31,5
13	<i>Lens culinaris</i>	224	430	57	193	32,1
Триба Trifolieae						
14	<i>Trifolium repens</i>		554	58	316	31,6
Триба Ciceraceae						
15	<i>Cicer arietinum</i>		555	60	315	30,1
Триба Phaseoleae						
16	<i>Phaseolus vulgaris</i>		523	56	287	31,5

различных триб и родов, но и между видами одного рода (табл. 1). И если различия в длине интрона у анализируемых представителей родов *Pisum* и *Lathyrus* не превышали 6 нуклеотидов, то у представителей *Vicia* внутривидовая вариабельность по длине последовательности интрона составила 31 нуклеотид.

Выровненная длина интрона *trnL* для всех анализируемых образцов составила 593 п.н. (табл. 1). Последовательность интрона была крайне вариабельной: у анализируемых образцов 182 сайта были полиморфны, уровень полиморфизма составил 30,7 %. Число информативных в отношении парсимонии сайтов – 38 (6,4 %), что несколько выше, чем показано в среднем для покрытосеменных растений (Borsch *et al.*, 2003).

В последовательности интрона были обнаружены как многочисленные единичные нуклеотидные замены, так и инсерции и делеции. Для некоторых образцов были выявлены

видоспецифичные делеции и дупликации, остальные инсерции встречались у групп видов (табл. 2, рис. 1).

Вторичная структура интрона *trnL*

Вторичная структура интрона *trnL* была определена у достаточно ограниченного ряда растений, таких как нимфея (Borsch *et al.*, 2003), горечавка (Gielly *et al.*, 1996), и у представителей семейства Dipterocarpaceae (Yulita, 2013).

В качестве модельной считается вторичная структура интрона *trnL* у нимфеи, которая была подробно описана Borsch с соавт. (2003). В структуре интрона выделяют 10 петель и 2 функциональных домена: каталитический и субстратный. Наиболее вариабельными участками интрона считаются последовательности петель Р6 и Р8 (Taberlet *et al.*, 2007).

На основании полученных данных о первичной последовательности нами была построена

Таблица 2

Положение инсерций/делеций в последовательности P8 петли
у представителей подсемейства Faboideae

Положение в последовательности интрона (по <i>Lens culinaris</i>)	Инсерция/ делеция	Длина	Вид/род
199	Инсерция	114	<i>Trifolium repens</i>
		109	<i>Cicer arietinum</i>
		79	<i>Phaseolus vulgaris</i>
199	Тандемный повтор	5	<i>Pisum fulvum</i>
216	Делеция	15	<i>Phaseolus vulgaris</i>
229	Делеция	4	<i>Lathyrus sphaericus</i>
232	Делеция	4	<i>Lens culinaris</i>
		12	<i>Vicia unijuga</i> <i>Vicia villosa</i>
		17	<i>Vicia faba</i>
240	Инсерция	4	<i>Phaseolus vulgaris</i>
250	Инсерция	5	<i>Vicia faba</i>
261	Делеция	5	<i>Lathyrus ochrus</i>
			<i>Pisum fulvum</i>
			<i>Pisum sativum</i>
			<i>Vavilovia formosa</i>
278	Инсерция	3	<i>Cicer arietinum</i>
289	Делеция	5	<i>Cicer arietinum</i>
			1
	Инсерция	1	<i>Lathyrus sativus</i> <i>Pisum fulvum</i> <i>Pisum sativum</i> <i>Vavilovia formosa</i> <i>Lathyrus aphaca</i> <i>Lathyrus sphaericus</i> <i>Lathyrus gmelinii</i> <i>Lathyrus ochrus</i> <i>Lathyrus clymenum</i>
299	Тандемный повтор	5	<i>Lathyrus sativus</i>

вероятная вторичная структура этого интрона для анализируемых образцов Fabaceae. При построении вторичной структуры у видов Fabaceae были определены все 10 петель и последовательности обоих функциональных доменов. При этом было показано, что выявленные точковые замены локализовались даже в функциональных доменах и мотивах, которые считаются наиболее консервативными участками интрона (рис. 2). Так, в последовательности каталитического центра были выявлены четыре

замены: две, локализованные в одном положении в последовательности R2 центра, A/G (*Tr. repens*) и A/U (*Ph. vulgaris*), и две замены в последовательности S центра у видов *V. villosa* U/G и *V. faba* A/G (рис. 2).

Полиморфизм петли P6

Известно, что петля P6 интронов группы I может несколько различаться как по длине, так и по нуклеотидным последовательностям

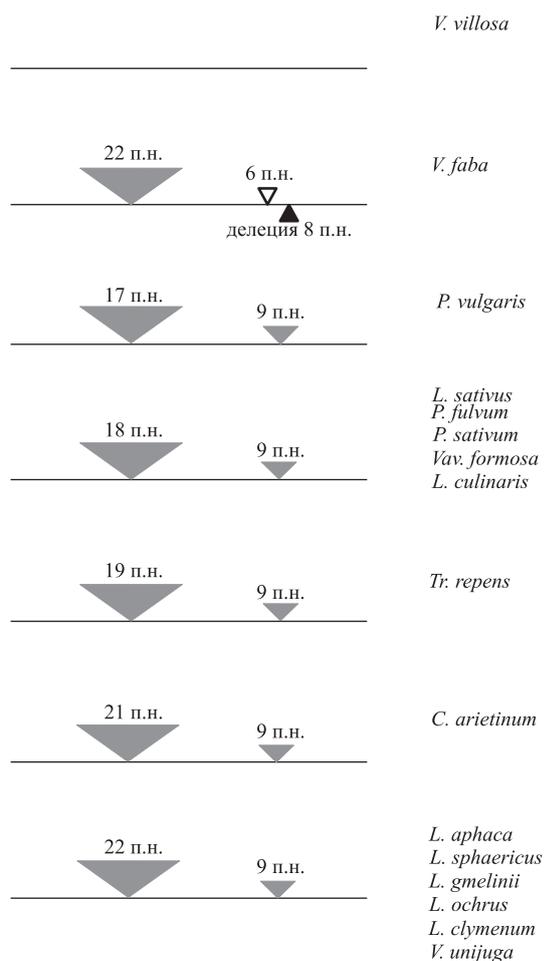


Рис. 1. Схема расположения инсерций/делеций в петле P6 у разных видов подсемейства Faboideae.

(Taberlet *et al.*, 2007). Анализ последовательностей петли P6 у Fabaceae позволил выявить значительные различия, при этом интересно то, что длина последовательностей, формирующих P6 петлю, различалась не только у представителей различных родов, но и у видов одного рода. Так, разница в размере P6 у образцов с максимальной длиной последовательности петли (*V. unijuga* и некоторые виды *Lathyrus*) и минимальной (*V. villosa*) составила 31 нуклеотид (табл. 1, рис. 1). P. Taberlet с соавт. (2007) в своих исследованиях показали невысокий уровень различия в длине петли P6 и в ее нуклеотидной последовательности внутри родов и близкородственных групп видов. Так, например, последовательность P6 петли у трех исследованных видов рода *Solanum* различалась лишь на один нуклеотид при одинаковой длине. Аналогично последовательность петли у 8 ро-

дов злаковых различалась по длине не более чем на 5 нуклеотидов, при этом последовательности петли у образцов родов *Triticum* и *Secale* были полностью идентичны, а у последовательности петли образца *Zea mays* по отношению к роду *Panicum* была детектирована только однонуклеотидная делеция (Taberlet *et al.*, 2007).

Для всех анализируемых образцов Fabaceae была построена вторичная структура P6 петли. Было получено пять разных типов вторичной структуры петли (рис. 3). Наибольшее число образцов относится к I и II типу. Отметим то, что некоторые образцы одного рода имели разный тип строения петли. Так, образцы родов *Pisum*, *Vavilovia*, *Lens* и *Cicer* формировали P6 петли I типа. Почти все образцы рода *Lathyrus* образовывали петли II типа. Исключение составил образец *L. sativus*, у которого был I тип строения петли. Все три образца рода *Vicia*, взятые в анализ, различались по типу строения P6 петли. Так, образец вида *V. unijuga* имел тип строения петли II, *V. faba* – тип IV, *V. villosa* – тип V. Такие различия в строении петли P6 можно объяснить тем, что данные виды относятся к разным секциям рода *Vicia*: *Vicilla*, *Vicia* и *Cracca* соответственно (Schaefer *et al.*, 2012).

Стоит отметить, что образцы родов *Pisum* и *Vavilovia* имели одинаковую длину и различались лишь тремя нуклеотидами, что подтверждает точку зрения об их близком родстве (Oskoueiyani *et al.*, 2010). Полностью идентичные последовательности P6 петли были детектированы у образцов *P. sativum* и *P. fulvum*; *L. ochrus* и *L. clymenum*; *L. sphaericus* и *L. aphaca* соответственно.

Полиморфизм петли P8

Последовательность петли P8 у Fabaceae была крайне вариабельной и содержала в себе многочисленные нуклеотидные замены, инсерции и делеции. Ее протяженность варьировала от 193 п.н. у рода *Lens* до 316 п.н. у образцов родов *Trifolium* и *Cicer*. Среди единичных замен и делеций и дупликаций были детектированы как видоспецифичные, так и характерные для групп видов (табл. 2).

Наиболее протяженную инсерцию содержали в себе образцы *Tr. repens* (114 п.н.), *C. arieti-*

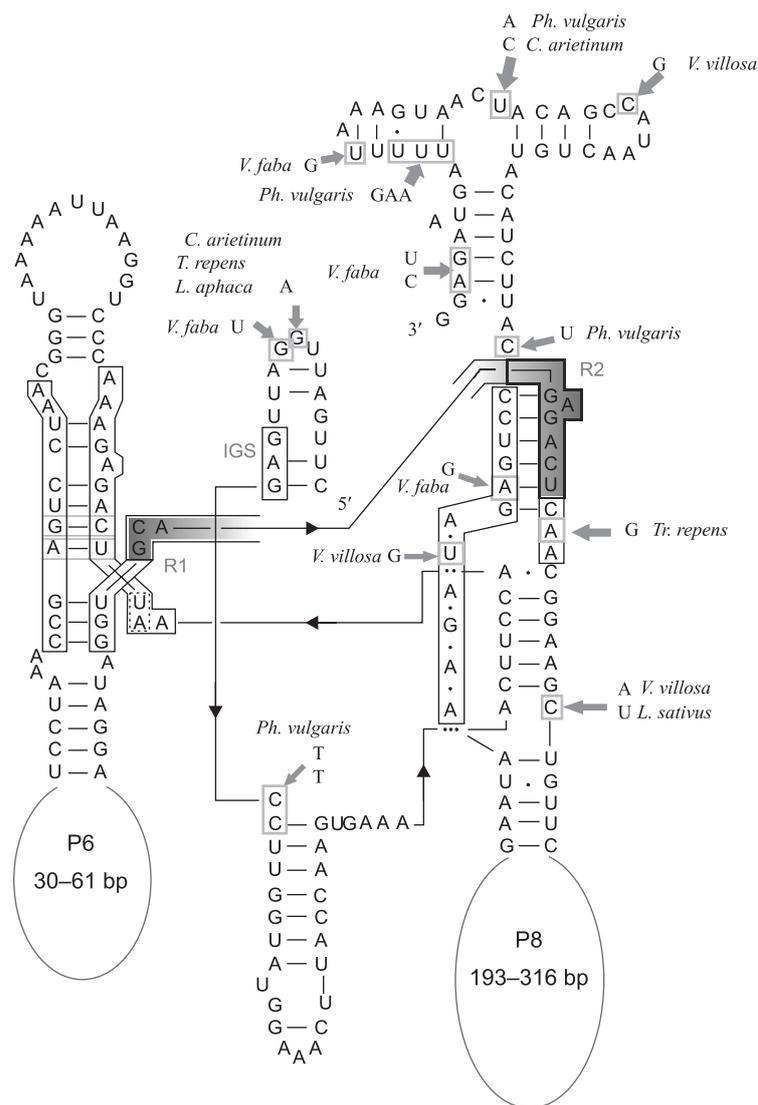


Рис. 2. Вторичная структура интрона гена *trnL*.

num (109 п.н.) и *Ph. vulgaris* (79 п.н.) (табл. 2). Образцы *L. ochrus* и *L. clymenum*, относящиеся к секции *Clymenum* (по классификации Kurіcha, 1976), различались наличием единственной инсерции/делеции в положении 261 п.н. (табл. 2), а также содержали единственную замену из всей последовательности интрона.

При исследовании последовательности участка пластидного генома *trnT-trnF* выделяют 8 «горячих точек/районов» с наивысшей вероятностью инсерций, из них две расположены в I и II спиральных элементах петли P8 (Borsch *et al.*, 2003). В нашем исследовании наиболее протяженные вставки находились в элементе I.

Последовательности петли P8 у образцов рода *Pisum* (*P. sativum* и *P. fulvum*) различались лишь наличием однокопийного тандемного пятинуклеотидного повтора у *P. fulvum* в районе 199 п.н. от первого нуклеотида интрона. Образец *V. formosa* в своей последовательности имел идентичные делеции и дупликации по отношению к образцу вида *P. sativum*, однако содержал 7 нуклеотидных замен.

Таким образом, в данной работе был проведен анализ полиморфизма интрона гена *trnL* и предложена его вторичная структура. Последовательность интрона была достаточно полиморфной и содержала замены даже в функциональных центрах. Были определены

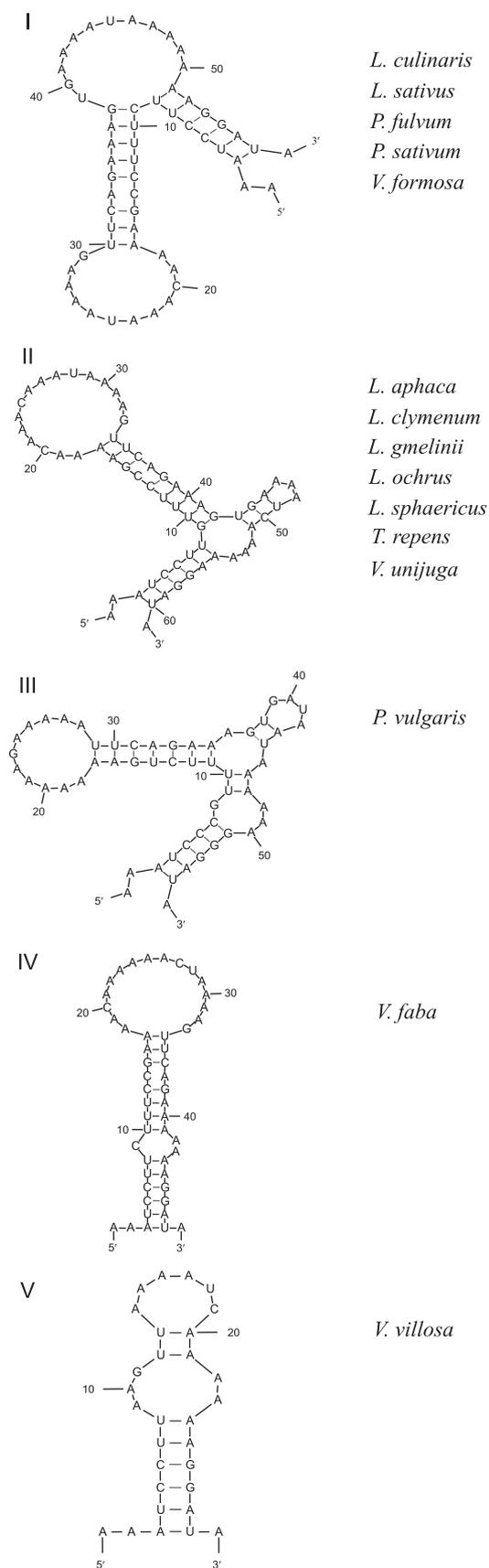


Рис. 3. Типы вторичной структуры петли Р6.

все функциональные участки и петли интрона, относящегося к интронам группы I. Было показано наличие пяти типов строения вторичной структуры Р6 петли. При этом виды одного рода имели различный тип строения петли Р6.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ Президиума Российской академии наук «Динамика и сохранение генофондов» и «Молекулярная и клеточная биология».

ЛИТЕРАТУРА

- Слугина М.А., Снигирь Е.А., Рыжова Н.Н., Кочиева Е.З. Структура и полиморфизм фрагмента локуса *Pain-I*, кодирующего вакуолярную инвертазу *Solanum* // Молекуляр. биология. 2013. Т. 47. С. 243–250.
- Borsch T., Hilu K.W., Quandt D., Wilde V., Neinhuis C., Barthlott W. Noncoding plastid trnT-trnF sequences reveal a well resolved phylogeny of basal angiosperms // J. Evol. Biol. 2003. V. 16. P. 558–576.
- Gielly L., Yuan Y.-M., Kupfer P., Taberlet P. Phylogenetic use of noncoding regions in the genus *Gentiana* L.: chloroplast *trnL* (UAA) intron versus nuclear ribosomal internal transcribed spacer sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 1996. V. 5. No. 3. P. 460–466.
- Kupicha F.K. The infrageneric structure of *Vicia* // Notes from the Royal Botanic Garden. Edinburg. 1976. V. 34. No. 3. P. 287–326.
- Nielsen H., Johansen S.D. Group I introns // RNA Biology. 2009. V. 6. No. 4. P. 375–383
- Oskoueian R., Osaloo S.K., Maassoumi A.A., Nejadstatti T., Mozaffarian V. Phylogenetic status of *Vavilovia formosa* (Fabaceae-Fabeae) based on nrDNA ITS and cpDNA sequences // Biochem. Syst. Ecol. 2010. V. 38. P. 313–319.
- Paquin B., Kathe S.D., Nierzwicki-Bauer S.A., Shub D.A. Origin and evolution of group – I introns in cyanobacterial tRNA genes // J. Bacteriol. 1997. V. 179. P. 6798–6806.
- Schaefer H., Hechenleitner P., Santos-Guerra A., Menezes de Sequeira M., Pennington R., Kenicer G., Carine M.A. Systematics, biogeography, and character evolution of the legume tribe Fabeae with special focus on the middle-Atlantic island lineages // BMC Evol. Biol. 2012. V. 12. P. 250.
- Summons R.E., Jahnke L.L., Logan G.A., Hope J.M. 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis // Nature. 1999. V. 398. P. 554–557.
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Gielly L., Miquel C., Valentini A., Vermet T., Corthier G., Brochmann C., Willerslev E. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding // Nucl. Acids Res. 2007. V. 35. No. 3. e14.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
- Weeden N.F. Genetic changes accompanying the domestica-

- tion of *Pisum sativum*: is there a common genetic basis to the 'domestication syndrome' for legumes // *Ann. Bot.* 2007. V. 100. P. 1017–1025.
- Won H., Renner S.S. The chloroplast trnT–trnF region in the seed plant lineage Gnetales // *J. Mol. Evol.* 2005. V. 61. P. 425–436.
- Yulita K.S. Secondary structures of chloroplast *trnL* intron in dipterocarpaceae and its implication for the phylogenetic reconstruction // *Hayati J. Biosci.* 2013. V. 20. No. 1. P. 31–39.
- Zhou Y., Lu C., Wu Q.-J., Wang Y., Sun Z.-T., Deng J.-C., Zhang Y. GISSD: Group I intron sequence and structure database // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. D31–D37.
- Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. P. 3406–3415.

PLASTID *TRNL* INTRON VARIABILITY IN FABOIDEAE SPECIES (FABACEAE)

E.A. D'yachenko^{1,2}, M.A. Filyushin¹, E.P. Pronin², E.Z. Kochieva^{1,3}

¹ Bioengineering Center, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia,
e-mail: dyachenko-el@yandex.ru;

² All-Russia Research Institute for Vegetable Breeding and Seed Production,
VNISSOK Village, Odintsovo region, Moscow oblast, Russia;

³ Chair of Biotechnology, Moscow State University, Moscow, Russia

Summary

The intron located between the first and second nucleotide of the leucine tRNA anticodon is the only representative of group I introns in higher plants. In this paper, for the first time the intron sequence of the plastid *trnL* gene is described in 16 legume species, and putative secondary structures of the entire intron and some of its functional domains are reconstructed. It has been found that genera of the Fabaceae family, as well as species within a single genus, are highly diverse in this sequence. Single nucleotide polymorphisms have been found in sequences of the catalytic center, believed to be highly conserved.

Key words: plants, group I intron, chloroplast genome, nucleotide polymorphism, intron secondary structure.

УДК 633.111.1:577.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ ПШЕНИЦЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ В КРАСНОДАРСКОМ НИИСХ им. П.П. ЛУКЪЯНЕНКО

© 2014 г. Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Ю.С. Зубанова,
Д.С. Миков, В.А. Филобок, Ж.Н. Худокормова

ГНУ Краснодарский научно-исследовательский институт
сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко Россельхозакадемии, Краснодар, Россия,
e-mail davayan@rambler.ru

Поступила в редакцию 10 сентября 2014 г. Принята к публикации 21 октября 2014 г.

С использованием молекулярных маркеров, сцепленных с генами устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*, проанализировано 1 920 растений и 46 коммерческих сортов селекции КНИИСХ. В основном анализируемые сорта несут утративший эффективность ген *Lr10*, а также слабоэффективные *Lr26* и *Lr34* и их комбинации. Высокоэффективные гены *Lr9* и *Lr24* не были идентифицированы. Эффективный на территории Краснодарского края ген *Lr19* был идентифицирован в сортах Паллада и Яра. Ген *Lr37* выявлен в сорте Морозко. За короткий срок были получены растения поколения F_2 , F_3 с интрогрессиями генов *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr37*. Выявлены образцы с комбинациями генов *Lr24+Lr37*, *Lr24+Lr19*, *Lr24+Lr9*, *Lr19+Lr37*, *Lr37+Lr9*, *Lr19+Lr9*. Отобрано 7 растений с комбинацией из трех генов *Lr37+Lr19+Lr9* и одно с комбинацией *Lr37+Lr24+Lr9*.

Ключевые слова: мягкая пшеница, гены устойчивости к бурой ржавчине, молекулярные маркеры, MAS-селекция.

ВВЕДЕНИЕ

Бурая или листовая ржавчина, возбудителем которой является облигатный патоген *Puccinia triticina* Eriks., – одна из самых вредоносных и распространенных болезней мягкой пшеницы. Создание устойчивых сортов – наиболее эффективный и экологически безопасный метод борьбы с данной болезнью. Условием успешной селекции на устойчивость к бурой ржавчине является достаточное количество доноров и источников (*Lr*-генов). По данным каталога генных символов, до настоящего времени опубликовано около 80 генов устойчивости к бурой ржавчине (McIntosh *et al.*, 2010). Для идентификации многих *Lr*-генов используют сцепленные с ними молекулярные маркеры. Внедрение в селекционные программы современных подходов с использованием молекулярных маркеров может стать мощным инструментом в решении

проблемы устойчивости к бурой ржавчине. Одним из таких подходов является маркер-вспомогательная селекция (MAS, marker-assisted selection). Основным принцип MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциации маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий (Леонова, 2013).

В Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко с 1930 г. успешно ведется селекция, направленная на создание сортов пшеницы, устойчивых к болезням. В селекции на устойчивость используются как традиционные методы – внутривидовая и отдаленная гибридизация, индивидуальный отбор, так и отбор с помощью молекулярных маркеров. Для создания генетически разнообразного исходного материала и сортов с различной природой устойчивости к бурой ржавчине были отобраны доноры эффективных

в большинстве регионов России генов *Lr9*, *Lr19* и *Lr24* и среднеэффективного гена возрастной устойчивости *Lr37*. Исходя из их родословной предполагалось, что гены устойчивости к бурой ржавчине *Lr10*, *Lr26*, *Lr34* могут присутствовать в сортах селекции КНИИСХ.

Цель данной работы заключалась в анализе отдельных растений и сортов пшеницы селекции КНИИСХ на присутствие молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*, и отборе перспективных растений с содержанием одного или нескольких генов устойчивости к бурой ржавчине.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 1 920 растений и 46 коммерческих сортов мягкой пшеницы селекции КНИИСХ. Растения пшеницы были получены от скрещивания доноров генов *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr37* с районированными сортами-реципиентами. В качестве доноров использовали почти изогенные линии сорта Thatcher RL6040 для гена *Lr19*, RL6010 для гена *Lr9*, RL6040 для гена *Lr24* и RL6081 для гена

Lr37. В качестве реципиентов были отобраны устойчивые к бурой ржавчине сорта: Фортуна, Юнона, Таня; среднеустойчивые: Айвина, Адель; средневосприимчивые: Нота, Гром, Вита; восприимчивый сорт Краснодарская 99. 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*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*. Праймеры отбирали на основании литературных данных; их названия, источники и условия амплификации представлены в табл. 1.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с 0,5× буфером ТВЕ. Концентрация геля варьировала от 1,5 до 2,0 % в зависимости от размера амплифицированного фрагмента. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса «INFINITI 1000». В качестве маркера молекулярной массы использовали ДНК-маркер М 24 100 бр «СибЭнзим». В качестве положительных контролей для опре-

Таблица 1

Происхождение генов устойчивости к бурой ржавчине, условия ПЦР и характеристика праймеров, используемых для идентификации соответствующих генов

Ген	Источник гена	Название праймеров	Условия амплификации фрагментов	Размер фрагмента п.н.	Литературный источник
<i>Lr9</i>	<i>Aegilops umbellulata</i>	<i>FJ13/1</i>	94 °С – 6 мин; 35 циклов (92 °С – 30 с, 63 °С – 30 с, 72 °С – 60 с); 72 °С – 5 мин	1100	Schachermayer <i>et al.</i> , 1994
		<i>RJ13/2</i>			
<i>Lr10</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Lrk10 D1</i>	94 °С – 3 мин; 35 циклов (92 °С – 45 с, 63 °С – 45 с, 72 °С – 30 с); 72 °С – 3 мин	282	Schachermayer <i>et al.</i> , 1997
		<i>Lrk10 D2</i>			
<i>Lr19</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	<i>FGbf</i>	94 °С – 5 мин; 40 циклов (94 °С – 30 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 60 с); 72 °С – 5 мин	130	Prinse <i>et al.</i> , 2001
		RGbr			
<i>Lr24</i>	<i>Ag. elongatum</i>	<i>J 09/1</i>	94 °С – 4 мин; 40 циклов (92 °С – 60 с, 60 °С – 60 с, 72 °С – 2 мин); 72 °С – 5 мин	320	Schachermayer <i>et al.</i> , 1995
		<i>J 09/2</i>			
<i>Lr26</i>	<i>Secale cereale</i>	<i>SCM9/F</i>	94 °С – 3 мин; 30 циклов (94 °С – 45 с, 60 °С – 60 с, 72 °С – 90 с); 72 °С – 5 мин	207	Weng <i>et al.</i> , 2007
		<i>SCM9/R</i>			
<i>Lr34</i>	<i>Triticum aestivum</i>	<i>csLV34F</i>	94 °С – 5 мин; 40 циклов (94 °С – 45 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 60 с); 72 °С – 5 мин	150	Lagudah <i>et al.</i> , 2006
		<i>csLV34R</i>			
<i>Lr37</i>	<i>Aegilops ventricosa</i>	<i>Ventriup</i>	94 °С – 45 с; 30 циклов (94 °С – 45 с, 65 °С – 30 с, 72 °С – 60 с); 72 °С – 7 мин	262	Helguera <i>et al.</i> , 2003
		<i>Ln2</i>			

деления известных генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к бурой ржавчине: *Lr9* (TcLr9), *Lr10* (TcLr10), *Lr19* (TcLr19), *Lr24* (TcLr24), *Lr26* (TcLr26), *Lr34* (TcLr34), *Lr37* (TcLr37).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящее время из 80 генов устойчивости к бурой ржавчине, описанных в каталоге генных символов, для 50 % определены ДНК-маркеры, сцепленные с ними, и только для 15 % маркеры валидированы для использования в схемах MAS (Леонова, 2013). Валидация означает тестирование способности ДНК-маркеров предсказывать фенотип на широком наборе сортов, изогенных линий, популяций в различном генетическом окружении и в различных условиях окружающей среды. Из литературных источников нами были отобраны известные ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости к бурой ржавчине: *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*. Гены *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr37* рекомендованы для интрогрессии в озимые сорта пшеницы и валидации маркеров.

На начальном этапе исследования было проанализировано 46 коммерческих сортов селекции КНИИСХ с целью характеристики их генотипов по анализируемым генам устойчивости к бурой ржавчине. Полученные результаты представлены в табл. 2. Высокоэффективные в большинстве регионов нашей страны гены *Lr9* и *Lr24* не были идентифицированы. Ген *Lr10* был выявлен в сортах Батько, Гром, Нота, Краля, Краснодарская 99, Трио, Этнос, Юмпа. Эффективный на территории Краснодарского края ген *Lr19* был идентифицирован в сортах Паллада и Яра. Пшенично-ржаная транслокация 1BL.1RS, несущая ген устойчивости *Lr26*, идентифицирована в сортах Баграт, Васса, Вершина, Иришка, Курень, Лауреат, Ольхон, Уруп, Фортуна.

Ген возрастной устойчивости *Lr34* выявлен в сортах Дмитрий, Есаул, Калым, Лига 1, Протон, Юнона. Ген *Lr37* выявлен в высокоустойчивом сорте Морозко. Сорта с неспецифичной устойчивостью Адель, Айвина, Вита и Юка несут комбинацию, состоящую из трех генов: *Lr10*, *Lr26*, *Lr34*.

В 4 сортах с частичной устойчивостью – Афина, Дока, Таня, Утриш – выявлены гены

Таблица 2

Анализ сортов мягкой пшеницы селекции КНИИСХ на присутствие генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*

Гены устойчивости	Сорта мягкой пшеницы
<i>Lr10+Lr26+Lr34</i>	Адель, Айвина, Вита, Юка
<i>Lr26+Lr34</i>	Афина, Дока, Таня, Утриш
<i>Lr10+Lr26</i>	Коллега, Антонина, Стан, Курс
<i>Lr10+Lr34</i>	Зимтра
<i>Lr37</i>	Морозко
<i>Lr19</i>	Паллада, Яра
<i>Lr10</i>	Батько, Гром, Нота, Краля, Краснодарская 99, Трио, Этнос, Юмпа
<i>Lr26</i>	Баграт, Васса, Вершина, Иришка, Курень, Лауреат, Ольхон, Уруп, Фортуна
<i>Lr34</i>	Дмитрий, Есаул, Калым, Лига 1, Протон, Юнона, Кума, Юбилейная 100

Lr26 в сочетании с *Lr34*. Комбинация генов *Lr10+Lr26* идентифицирована в сортах с неспецифичной устойчивостью: Коллега, Антонина, Стан, Курс. Сорт Зимтра несет комбинацию *Lr10+Lr34*.

В дальнейшем в отделе селекции пшеницы и тритикале была начата работа по передаче эффективных в условиях Краснодарского края генов устойчивости к бурой ржавчине в сорта мягкой пшеницы селекции КНИИСХ. В качестве доноров были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами *Lr9*, *Lr19*, *Lr24* и *Lr37*. Данные гены были перенесены в мягкую пшеницу от дикорастущих сородичей. Преимущество некоторых из них состоит в том, что они были переданы в составе транслокаций совместно с другими генами устойчивости. Ген *Lr19*, переданный от *Ag. elongatum*, тесно сцеплен с геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr25*, от этого вида в мягкую пшеницу передан ген *Lr24*, который сцеплен с *Sr24*. Переданный от *Ae. ventricosa* ген *Lr37* входит в состав транслокации вместе с генами *Yr17* и *Sr38* (Friebe *et al.*, 1996). Ген *Lr9* передан в мягкую пшеницу от *Ae. umbellulata*. До недавнего времени ген от-

носился к группе высокоэффективных во всем мире. В настоящее время вирулентность к гену *Lr9* отмечается как в регионах выращивания сортов с этим геном, так и за их пределами. Однако *Lr9* продолжает оставаться эффективным в условиях Краснодарского края.

Далее проводили беккроссы с целью увеличения адаптивного материала сорта-реципиента в гибридном потомстве. С помощью ПЦР анализа выявляли присутствие ДНК-маркеров, сцепленных с интрогрессируемыми генами (рис. 1).

Из 130 растений поколения F_2 маркер, сцепленный с геном *Lr9*, выявлен у 39. Маркер, сцепленный с геном *Lr19*, идентифицировали в 57 из 123 анализируемых образцов. В 57 образцах из 215 детектировали диагностический маркер, сцепленный с геном *Lr24*. Из 346 растений были выделены 219, несущих маркер, сцепленный с геном *Lr37*.

В растениях поколения F_3 диагностический маркер, сцепленный с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr9*, детектировали в 205 образцах. Маркер, сцепленный с геном *Lr19*, был идентифицирован у 221 из 368 анализируемых образцов. Диагностические маркеры к генам *Lr24* и *Lr37* были выявлены в 841 и 743 растениях соответственно.

Растения, у которых были выявлены ДНК-маркеры, сцепленные с искомыми генами, отбирали для повторного беккросса, а также проведения скрещиваний по объединению нескольких генов в одном генотипе. Известно, что сочетание нескольких генов устойчивости к

бурой ржавчине в одном генотипе может обеспечивать более надежную и продолжительную защиту вследствие расширения генетической основы устойчивости. Работы по пирамидированию 5 генов и 2 локусов количественных признаков устойчивости к болезням (*Lr19*, *Lr34*, *Sr2*, *Sr26*, *YrSp*, *QYr*, *sgi-7D* *QYr.sgi-2B*) в одном генотипе пшеницы изложены у S.L. Sydenham (2007). D.G. Bonnet с соавт. (2005) провели работу по сочетанию в одном генотипе генов устойчивости к болезням (*Sr2*, *Lr37*, *Yr17*, *Sr38*) и вредителям (*Cre 1*), генов карликовости (*Rht-B1b*, *Rht8*) и генов, определяющих качество зерна (*Glu-B1*, *Glu-D1*, *Glu-A3*).

Использование молекулярных маркеров для пирамидирования генов позволяет идентифицировать растения, имеющие более одного гена устойчивости, а также выявлять генотипы, содержащие комбинации генов, на ранних стадиях, например, в популяциях F_2 (Sivasamy *et al.*, 2009; Беспалова и др., 2012). Комбинации генов и количество проанализированных образцов представлены в табл. 3.

Идентифицировано 443 растения с сочетанием диагностических маркеров, сцепленных с генами *Lr24+Lr37*. Выявлено 77 образцов, несущих маркеры, сцепленные с генами *Lr24+Lr19*. 82 растения несли маркеры, сцепленные с комбинацией генов *Lr24+Lr9*. Комбинации генов *Lr19+Lr37*, *Lr37+Lr9*, *Lr19+Lr9* были выявлены в 41, 12 и 58 образцах соответственно. Отобрано 7 растений с сочетанием генов *Lr37+Lr19+Lr9* и один образец с комбинацией генов *Lr37+Lr24+Lr9*.

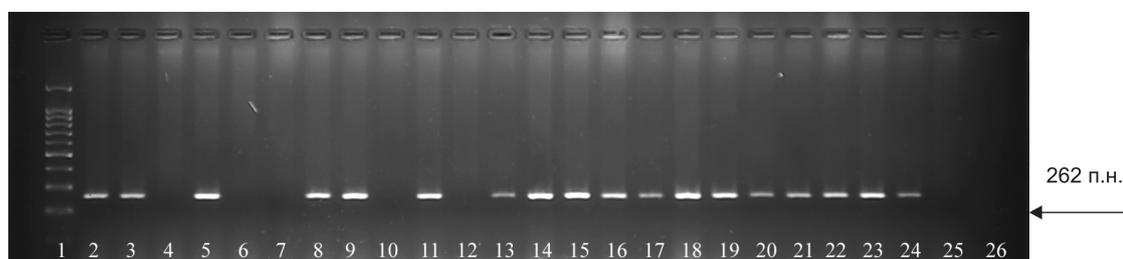


Рис. 1. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *Ventriup* и *Ln2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr37*.

1 – маркер длины; 2 – почти изогенная линия сорта Thatcher (*TcLr37*); 3–26 – растения, полученные от скрещивания сорта Thatcher (*TcLr37*) с сортом Юнона.

Таблица 3

Анализ гибридов мягкой пшеницы на присутствие комбинаций генов устойчивости к бурой ржавчине

Комбинация генов	Число анализируемых растений	Число растений с комбинацией генов
<i>Lr24+Lr37</i>	864	443
<i>Lr24+Lr19</i>	144	77
<i>Lr24+Lr9</i>	205	82
<i>Lr19+Lr37</i>	188	41
<i>Lr37+Lr9</i>	96	12
<i>Lr19+Lr9</i>	96	58
<i>Lr37+Lr19+Lr9</i>	96	7
<i>Lr37+Lr24+Lr9</i>	96	1

ОБСУЖДЕНИЕ

На сегодняшний день очевидно, что селекция с использованием ДНК-технологий является мощным инструментом для повышения эффективности селекционного процесса. Интрогрессия генов в различных схемах MAS в сравнении с методами традиционной селекции позволяет существенно сократить размер выборки, время при проведении беккроссов и контролировать длину чужеродного фрагмента (Timonova *et al.*, 2013). Анализ ДНК-маркерами можно проводить на любой стадии развития растения в лабораторных условиях. Удешевление технологии MAS в совокупности с преимуществами применения ДНК-маркеров позволит в течение следующего десятилетия добиться большей эффективности селекции растений.

Создание сортов пшеницы с генами устойчивости к бурой ржавчине и их комбинациями является актуальной задачей практической селекции. Для стабильной защиты растений пшеницы от бурой ржавчины необходимо использовать гены, определяющие разные механизмы устойчивости. Перспективными в России для использования в селекции пшеницы являются высокоэффективные гены *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr39(41)*, *Lr47*, *Lr50*, а также гены устойчивости взрослых растений *Lr22a*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr48*, *Lr49* (Гульятеева, 2012). Пирамидирование этих генов в сочетании с генами,

утратившими эффективность, и генами возрастной устойчивости позволит в значительной степени повысить генетическое разнообразие в сортах и адаптивность к популяции патогена. В настоящее время селекция с использованием молекулярных маркеров активно проводится во многих странах. Так, в Индии с использованием пирамидирования были созданы линии и сорта, несущие сочетание генов *Lr19* и *Lr24* (Singh *et al.*, 2004), *Lr32* и *Lr28*, *Lr9*, *Lr24* и *Lr28*, *Lr28* и *Lr48*, *Lr24* и *Lr48* (Prubhu, Tiwary, 2007). В США с использованием стратегии маркер-вспомогательного беккроссирования в североамериканские сорта пшеницы перенесены гены *Lr21*, *Lr39(41)*, *Lr47* и *Lr37*. С использованием молекулярных маркеров *Lr*-генов во Франции были созданы линии пшеницы с генами *Lr1*, *Lr9*, *Lr24* и *Lr47* (Nocente *et al.*, 2007); линии с генами *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr35* и *Lr37* – в Венгрии (Vida *et al.*, 2009); линии с генами *Lr24* и *Lr19* – в Чехии (Slikova *et al.*, 2004).

Селекция с использованием молекулярных маркеров в Краснодарском НИИСХ проводится с использованием различных доноров устойчивости. Для передачи генов широко применяются почти изогенные линии сорта Thatcher, интрогрессивные линии с генетическим материалом от видов *Aegilops*, *Agropyron*, *Secale* и *Triticum*, а также сорта иностранной селекции TAM 200, Agarachoe, Kapchorn, Alkazar, KS93U62. Ведутся работы с использованием маркеров, сцепленных с генами устойчивости к бурой ржавчине *Lr22a*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr35*, *Lr39(41)*, *Lr47*, *Lr50* и *Lr51*.

В основном в сортах Краснодарского НИИСХ выявляются утративший эффективность ген *Lr10*, а также слабоэффективные *Lr26* и *Lr34*. Ген *Lr10* является одним из наиболее широко представленных в российских сортах. Из-за широкого возделывания сортов, несущих *Lr10*, ген потерял эффективность во всем мире. Однако, согласно R.A. McIntosh с соавт. (1995), *Lr10* может быть эффективен в сочетании с другими генами. Утративший эффективность ген *Lr26* входит в состав транслокации 1BL.1RS. В этой транслокации находятся гены устойчивости к мучнистой росе (*Pm8*), стеблевой (*Sr31*) и желтой (*Yr9*) ржавчинам, в связи с чем ген *Lr26* в сочетании с другими генами устойчивости представляет особый интерес для селекции.

Следует отметить, что в условиях Краснодарского края хороший эффект по устойчивости к бурой ржавчине показывают комбинации генов *Lr10+Lr26+Lr34*, *Lr26+Lr34*, *Lr10+Lr26*, *Lr10+Lr34* (Аблова, 2014).

Известно, что в сортах, несущих ген возрастной устойчивости *Lr34*, болезнь развивается медленнее, несмотря на восприимчивый тип реакции растения. Подобную устойчивость называют частичной или устойчивостью по типу медленного развития. Так, например, сорта пшеницы, созданные в СИММУТ, 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).

Ген *Lr37* выявлен у сорта Морозко. До недавнего времени этот ген являлся высокоэффективным во всем мире. В середине 2000-х годов ген утратил эффективность в Западной Европе в связи с широким возделыванием сортов – его носителей. В условиях северо-запада России в 2011 г. пораженность сортов и линий бурой ржавчиной возросла до 5 % (Гультияева, Баранова, 2010). Несмотря на потерю эффективности, ген возрастной устойчивости *Lr37* рекомендуется для селекции во многих странах мира, в том числе и в России.

Таким образом, использование молекулярных маркеров позволило за короткий срок изучить 46 сортов пшеницы на присутствие генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr37*. Получены и проанализированы растения поколений F₂ и F₃ с интрогрессиями генов *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr37*. Растения пшеницы с пирамидами генов *Lr19+Lr9*, *Lr24+Lr37*, *Lr24+Lr19*, *Lr24+Lr19*, *Lr37+Lr19+Lr9*, *Lr37+Lr24+Lr9*, отобранные с использованием молекулярных маркеров, интенсивно вовлекаются в гибридизацию.

ЛИТЕРАТУРА

- Аблова И.Б., Беспалова Л.А., Колесников Ф.А. и др. Принципы, методы и результаты селекции озимой пшеницы на устойчивость к болезням в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Сб. науч. тр. Краснодарского НИИСХ. 2014. С. 48–67.
- Беспалова Л.А., Васильев А.В., Аблова И.Б. и др. Применение молекулярных маркеров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 37–43.
- Гультияева Е.И. Методы идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине с использованием ДНК-маркеров и характеристика эффективности *Lr*-генов. СПб.: РАСХН, отделение защиты растений, ГНУ ВНИИЗР, 2012. С. 59–60.
- Гультияева Е.И., Баранова О.А. Тенденции изменчивости популяции *Puccinia triticina* под влиянием выращиваемых сортов пшеницы и эффективность *Lr*-генов в основных зернопроизводящих регионах РФ // Технология создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб.: РАСХН, отделение защиты растений, ГНУ ВНИИЗР, 2010. С. 26–48.
- Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 314–325.
- Bonnett D.G., Rebetzke G.J., Spielmeier W. Strategies for efficient implementation of molecular markers in wheat breeding // Mol. Breeding. 2005. V. 15. P. 75–78.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J. *et al.* PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // Crop Sci. 2003. V. 43. P. 1839–1847.
- Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P. *et al.* Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat // Theor. Appl. Genet. 2006. V. 114. P. 21–30.
- 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.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat rust: An atlas of resistance gene // CSIRO, Australia. 1995. P. 234–237.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2010. Suppl. 2011, 2012. Available at <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>.
- Nocente F., Fritz A.K., Moran J.L. *et al.* Identification and molecular tagging of genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr24*, *Lr47* and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection // Euphytica. 2007. V. 155. P. 329–336.
- Plaschke J., Ganai 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.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F. *et al.* AFLP STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 91. P. 618–624.
- Prubhu K.W., Tiwary R. Marker assisted breeding in wheat: rust and biotic stresses-I // ICAR-ACIAR Planning Workshop 11–13 Oct. 2007 NASC, New Delhi 2007 (<http://aciara.gov.au/Files/node/3871/Session%20IV-Prabhu%20Tiwari.pdf>).
- Schachermayer G., Siedler H., Gale M.D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat // Theor. Appl. Genet. 1994. V. 88. P. 110–115.

- Schachermayer G., Messemer M., Feuillet C. *et al.* Identification of molecular markers linked to the Agropyron elongatum-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 90. P. 982–990.
- Schachermayer G., Feuillet C., Keller B. Molecular markers for detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds // *Mol. Breeding.* 1997. V. 3. P. 65–74.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Wiliam M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts of wheat // *Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and Intern. cooperation: Proc. 1st Central Asian Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan, 10–13 June, 2003. Almaty, 2003. P. 127–132.*
- Singh D., Franks C.D., Huang L. *et al.* *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 108. P. 586–591.
- Slikova S., Gregova E., Bartos P. Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes *Lr19* and *Lr24* // *Plant Soil Environ.* 2004. V. 50. No. 10. P. 434–438.
- 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/iunrestricted/Sydenham S.L.pdf>.
- Sivasamy M., Vinod, Tiwari S. *et al.* Introgression of useful linked genes for resistance to stem rust, leaf rust and powdery mildew and their molecular validation in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Indian J. Genet.* 2009. V. 69. P. 17–27.
- Timonova E.M., Leonova I.N., Roder M.S., Salina E.A. Marker-assisted development and characterization of a set of *Triticum aestivum* lines carrying different introgressions from the *T. timopheevii* genome // *Mol. Breed.* 2013. V. 31. P. 123–136.
- Vida G., Gal M., Uhrin A. *et al.* Molecular markers for the identification of resistance genes and marker-assisted selection in breeding wheat for leaf rust resistance // *Euphytica.* 2009. V. 170. P. 67–76.
- Weng Y. *et al.* PCR-based markers for detection of different sources 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocation in wheat background // *Plant Breeding.* 2007. V. 126.

USE OF MOLECULAR MARKERS IN WHEAT BREEDING FOR RESISTANCE TO LEAF RUST AT THE LUKYANENKO RESEARCH INSTITUTE OF AGRICULTURE

**E.R. Davoyan, L.A. Bespalova, R.O. Davoyan, Yu.S. Zubanova,
D.S. Mikov, V.A. Filobok, J.N. Khudokormova**

Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia,
e-mail davayan@rambler.ru

Summary

Wheat accessions were genotyped with molecular markers linked to wheat leaf rust resistance genes *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, and *Lr37*. They included 1920 wheat plants and 46 commercial varieties bred at the Lukyanenko Institute. Basically, the analyzed varieties had the inefficient gene *Lr10*, poorly efficient *Lr26* and *Lr34*, or their combinations. The highly efficient genes *Lr9* and *Lr24* were not detected. The *Lr19* gene, effective in the Krasnodar region, was identified in varieties Pallada and Yara. The resistance gene *Lr37* was found in variety Morozko. Within a short time, F2 and F3 plants with introgression of genes *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr37* were obtained. Accessions with combinations *Lr24 + Lr37*, *Lr24 + Lr19*, *Lr24 + Lr9*, *Lr19 + Lr37*, *Lr37 + Lr9*, *Lr19 + Lr9* were identified. Seven plants with the combination of three genes *Lr37 + Lr19 + Lr9* and one with *Lr37 + Lr24 + Lr9* were selected.

Key words: common wheat, leaf rust resistance genes, molecular markers, marker-assisted selection.

УДК 577.11:633.11:632.4

ХАРАКТЕРИСТИКА УСТОЙЧИВОСТИ К ВОЗБУДИТЕЛЮ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ СОРТОВ И ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ ИЗ КОЛЛЕКЦИИ ВИР, НЕСУЩИХ ЧУЖЕРОДНЫЙ ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ

© 2014 г. А.С. Садовая¹, Е.И. Гульятеева¹, О.П. Митрофанова²,
Е.Л. Шайдаюк¹, А.Г. Хакимова², Е.В. Зуев²

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Россия, e-mail: gullena@rambler.ru;

² Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 26 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

Представлены результаты оценки устойчивости к возбудителю бурой ржавчины 83 образцов мягкой пшеницы коллекции ВИР, несущих чужеродный генетический материал. Выявлено 8 образцов с ювенильной устойчивостью и 27 образцов – с полевой. С использованием молекулярных маркеров показано наличие у изученного материала высоко- и частично эффективных в России генов *Lr24*, *Lr39*, *Lr37*, *Lr21* и ржаной транслокации 1AL.1RS. Образцы, содержащие эффективные *Lr*-гены, могут быть использованы в качестве доноров в селекционных программах России. Линии, созданные с участием *T. timopheevii*, были неоднородными по устойчивости, у них не выявлены молекулярные маркеры гена *Lr50*, известного для данного вида. Эти линии требуют дальнейшего изучения и проведения отборов.

Ключевые слова: мягкая пшеница, бурая ржавчина, устойчивость, молекулярные маркеры, *Lr*-гены, чужеродный генетический материал.

Бурая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erik.) – распространенное заболевание пшеницы во всех регионах России, которое может приводить к существенной потере урожая в годы эпифитотий. Экологически безопасным методом защиты от данного заболевания является возделывание устойчивых сортов. Результаты скрининга на устойчивость к бурой ржавчине районированных в РФ сортов мягкой пшеницы свидетельствуют об очевидном прогрессе в селекции в последние 10 лет (Новожилков и др., 1998; Гульятеева, 2014). Отмечено значительное возрастание в Государственном реестре селекционных достижений России озимых сортов с полевой устойчивостью и яровых – с ювенильной, при этом с использованием молекулярных маркеров показано, что многие из них защищены генами *Lr19* и *Lr9* (Гульятеева и др., 2009б, 2014). Широкое возделывание таких

сортов в Западной Сибири, на Урале и Поволжье привело к потере их устойчивости (Мешкова и др., 2008). В связи с этим актуальны расширение разнообразия по *Lr*-генам у отечественных сортов мягкой пшеницы и определение стратегии их размещения в регионах.

К настоящему времени во всем мире у пшеницы идентифицировано 67 *Lr*-генов и свыше 50 % из них – чужеродные (McIntosh *et al.*, 2012). Для идентификации большинства из них разработаны молекулярные маркеры, которые позволяют контролировать процесс переноса *Lr*-генов и значительно ускорить создание устойчивых сортов.

В коллекции пшеницы ВИР содержится большое число образцов, полученных с участием различных видов пшеницы, эгилопсов, ржи и пырея и включенных в коллекцию в разные годы. Эти образцы могут представлять

интерес для селекции как источники известных эффективных чужеродных *Lr*-генов, ранее не использованных в России, так и выявленных впервые.

Цель данной работы – характеристика сортов и линий мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих чужеродный генетический материал, по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины и идентификация у них *Lr*-генов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал исследований включал 83 сорта и линии мягкой пшеницы из коллекции ВИР (41 с озимым и 42 с яровым типом развития), полученные с участием *T. timopheevii* (Zhuk.) Zhuk. ($2n = 4x = 28$, GGAA), *Aegilops tauschii* Coss. ($2n = 2x = 14$, DD), *Ae. speltooides* Tausch ($2n = 2x = 14$, SS), *Ae. ventricosa* Tausch ($2n = 4x = 28$, $D^vD^vN^vN^v$), *Triticum timopheevii* ssp. *armenicum* (= *Triticum araraticum* Jakubz.) ($2n = 4x = 28$, GGAA), *Thinopyrum ponticum* (= *Agropyron elongatum*) и синтетического вида *T. migushovae* Zhir. ($2n = 6x = 42$, A^bA^bGGDD). Синтетический вид создан Е.Г. Жировым в Краснодарском НИИСХ путем скрещивания естественного голозерного мутанта *T. militinae* Zhuk. et Migusch., отобранного из популяции вида *T. timopheevii*, с *Ae. tauschii* (Дорофеев и др., 1987).

Изучаемые образцы оценивали по устойчивости к бурой ржавчине в фазе проростков и взрослых растений. Устойчивость в ювенильной стадии (фаза первого листа) изучали с использованием лабораторного метода ино-

куляции отрезков листьев (Михайлова и др., 2003) и при заражении интактных растений. Тип реакции учитывали на восьмые сутки после инокуляции по шкале Майнса и Джексона, где балл: 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом (R); 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом (MR); 3 – пустулы среднего размера без некроза (MS); 4 – пустулы большого размера без некроза (S); X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы (M).

Устойчивость взрослых растений изучали в 2013–2014 гг. на опытном поле ВИР (Санкт-Петербург–Пушкин) в условиях искусственного инфекционного фона, созданного путем опрыскивания опытных делянок суспензией изолятов гриба, выделенных из северо-западной популяции гриба *P. tritricina*. Степень поражения бурой ржавчиной оценивали по шкале Петерсона с соавт. (Peterson *et al.*, 1948), а тип реакции – по шкале Майнса и Джексона. В течение вегетационного сезона проводили несколько учетов: первый – при появлении первых симптомов заболевания, последующие – через каждые 7 дней. За основной показатель устойчивости принимали данные последнего учета, когда наблюдалось максимальное проявление болезни (Методы ..., 1988).

Идентификацию *Lr*-генов проводили с использованием фитопатологического теста и молекулярных маркеров. Для фитопатологических исследований было отобрано 7 изолятов бурой ржавчины. Характеристика данных тест-клонов

Таблица 1

Тип реакции тест-клонов *P. tritricina* при инокуляции изогенных Tc*Lr*-линий

Тест-клон	Тип реакции на Tc <i>Lr</i> -линиях, балл															
	1	2a	2b	2c	3a	3bg	3ka	9	14b	15	19	20	23	24	26	28
кLr9	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3	X	0–1	0	0
кLr19	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3	1	0	0
к43	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0	3	3	1–2	3	0
к18	0	0	3	3	3	3	3	0	3	3	0	0;	3	0–1	3	0
кП19	3	0	0	3	3	3	3	0	3	3	0	0;	1–2	0–1	3	0
к70	0	0	0	0	3	3	3	0	3	0	0	3	2–3	0–1	3	0
к60	3	3	3	3	0	0	0–1	0	3	3	0	3	3	0–1	0	0

гриба по вирулентности к 16 изогенным *TcLr*-линиям представлена в табл. 1. Изолят «кLr9» был выделен из омской популяции в 2010 г., «кLr19» – из нижегородской в 2012 г., «к43» – из омской в 2012 г., «к18» – из саратовской популяции в 2011 г., «кП19» – из нижегородской в 2011 г., «к70» – из тамбовской в 2012 г., «к-60» – из калининградской в 2012 г.

С помощью ПЦР-маркеров идентифицировали 12 высоко- и частично эффективных чужеродных генов – *Lr9*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr39/41*, *Lr47*, *Lr50*, *Lr66* и пшенично-ржаные транслокации 1BL.1RS (с генами *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*) и 1AL.1RS (табл. 2). Выделение ДНК проводили из листьев 7–10-дневных проростков по методике Дорохова и Клоке (1997). Амплификацию ДНК проводили по представленным в литературе протоколам (табл. 2) и при необходимости модифицировали. Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,5 %-м агарозном геле в 1×TBE-буфере, гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При изучении ювенильной устойчивости выявлено 8 образцов: Cutless (к-62517), KS90WGRC10 (к-62377), KS93U149 (к-62382), KS93U62 (к-63933), KS93U50 (к-63937), KS92WGRC22 (к-65156), KS96WGRC38 (к-65157) и KS96WGRC40 (к-65158) – все из США, иммунных к бурой ржавчине на протяжении всего периода вегетации (табл. 3). Все остальные исследованные образцы характеризовались различной степенью восприимчивости в фазе проростков и взрослых растений.

По результатам оценки в полевых условиях Северо-Запада к группе высокоустойчивых (отсутствие симптомов поражения) отнесены сорт Hadden (к-54855, США), линия ИТ-5 (к-50851, Россия), гибрид Cheyenne × *T. timopheevii* (к-45678, Канада) и сорт Brigadier (к-63322, Франция). К группе устойчивых (поражение до 5 %) отнесен сорт Восторг (к-64584, Россия), у которого отмечен умеренно восприимчивый тип реакции X (MS), а также образцы с восприимчивым типом (балл 3–4 (S)): Wisc. 245 (к-43577), ND600 (к-60781), IL-1/Chinese*2/

T. timopheevii (к-45165), Allard 52-1-1-17-1 (к-49928), KS86WGRC02 (к-62373) – все из США; AC Minto (к-62878, Канада), Alert (к-63901) и Beaufort (к-63920) из Великобритании. Умеренной устойчивостью (поражение до 15 %, тип реакции S) характеризовались образцы Archer (к-63300, Франция) и Steele (к-63031, США). Умеренная восприимчивость (поражение 20–30 %) выявлена у озимого сорта Centurion (к-62811, Франция) и пшенично-пырейной замещенной линии мягкой пшеницы Blue A (к-43091, Канада), при этом она имела более низкий тип реакции (M).

Высокая неоднородность по устойчивости к бурой ржавчине отмечена у 8 интрогрессивных линий, созданных в ВИР Н.А. Скурыгиной (1984) с привлечением вида *T. timopheevii*, и линии 36 (к-61518) из Эстонии. В составе этих линий выявлены растения как без симптомов болезни, так и в разной степени пораженные (табл. 3). В 2013–2014 гг. у пораженных растений линий ИТ-1 (к-50847), ИТ-6 (к-50852), ИТ-13а (к-50857), ИТ-15 (к-50858) максимальное развитие болезни составляло не более 5 %; у линии ИТ-3 (к-50849) – до 10–15 %, при этом в отличие от других линий у нее наблюдали умеренную устойчивость по типу реакции (2 балла); у линии 36 и ИТ-7 (к-50853) степень поражения не превышала 40 %, а у линий ИТ-4 (к-50850) и ИТ-8 (к-50854) – 70 % (табл. 3).

Все другие изученные образцы в полевых условиях показали высокую восприимчивость к бурой ржавчине. Поражение 50–60 % имели образцы KS86WGRC05 (к-62375), KS86WGRC07 (к-62376) из США и ППГ 64 (к-40230, Россия); 70–80 % – Wb.58633 (к-45164, Канада), Dipka (к-60340, ЮАР), Amidon (к-62515, США), Fleischman 481 (к-43231, Венгрия), а также пшенично-пырейные гибриды, созданные в России и Германии: ППГ 599 (к-38289), ППГ 1 (к-40229), ППГ 54/49 (к-40697), ППГ 60/49 (к-40859), ППГ 59/49 (к-40860), ППГ 56/49 (к-40870), ППГ 55/49 (к-40871), ППГ 29 (к-48704), ППГ 5 (к-54691), ППГ 113 (к-58539), ППГ 115 (к-58540); 90–100 % – Timstein (к-38498), Bledsoe (к-44405), Idaed 59C (к-44456), Idaed 59B, (к-45670) Molly (к-63555), KS86WGRC04 (к-62374), KS89WGRC03 (к-62715), KS89WGRC06 (к-63875), U1865-1-4-1 (к-63938) – все из США; Wb.60414 (к-45162) и Pewter

Таблица 2

ПЦР-маркеры, использованные для идентификации чужеродных *Lr*-генов

Ген, транслокация	Вид-источник	Праймеры	Нуклеотидная последовательность (5'-3')	Размер ампликона, п.о.	Литературный источник
<i>Lr9</i>	<i>Aegilops umbellulata</i>	SCS5F SCS5R	TGGCCCTTCAAGGAAG TGGCCCTTCTGAACGTAT	550	Gupta <i>et al.</i> , 2005
<i>Lr19</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	SCS265F SCS265R	GGCGGATAAGCAGAGCAGAG GGCGGATAAGTGGTTATGG	512	Gupta <i>et al.</i> , 2006
<i>Lr21</i>	<i>Aegilops tauschii</i>	Lr21F Lr21R	CGCTTTTACCAGATGGTC TCTGGTATCTCACGAAGCCTT	669	http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr21/index.htm
<i>Lr24</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	Sr24#12F Sr24#12L	CACCCGTGACATGCTCGTA AACAGGAAATGAGCAACGATGT	500	Mago <i>et al.</i> , 2005
		SCS73F SCS73R	TCGTCCAGATCAGAATGTG CTCGTCGATTAGCAGTGAG	719	Cherukuri <i>et al.</i> , 2003; Prabhu <i>et al.</i> , 2004
<i>Lr28</i>	<i>Aegilops speltoides</i>	SCS421F SCS421L	ACAAAGTAAGTCTCCACCCA AGTCGACCCGAGATTTAAC	570	Cherukuri <i>et al.</i> , 2005
<i>Lr29</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	Lr29F24 F Lr29F24 L	GTGACCTCAGGCAATGCACACAGT GTGACCTCAGAACCGATGTCCATC	900	Procunier <i>et al.</i> , 1995
<i>Lr35</i>	<i>Aegilops speltoides</i>	Sr39F2 Sr39R3	AGAGAGAGTAGAAGAGCT AGAGAGAGAGCATCCACC	900	Gold <i>et al.</i> , 1999
		BCD260F1 35R2	GAAAGTTAAAGAGGTCTTGAC TTTTGAGAAATCAGTCATCAC	931	Seyfarth <i>et al.</i> , 1999
<i>Lr37</i>	<i>Aegilops ventricosa</i>	Ventriup LN2	AGGGGCTACTGACCAAGGCT TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAA	259	Helguera <i>et al.</i> , 2003
<i>Lr39</i> (= <i>Lr41</i>)	<i>Aegilops tauschii</i>	GDM35-L GDM35-R	CCTGCTCTGCCCTAGATACG ATGTGAATGTGATGCATGCA	190	http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr39/index.htm
		PS10R PS10L	GCTGATGACCCCTGACCCGGT TCTTCATGCCCGGTCCGGT	282	Helguera <i>et al.</i> , 2000
<i>Lr50</i>	<i>Triticum timopheevii</i> ssp. <i>armeniicum</i>	GDM87-L GDM87-R	AATAATGTGGCAGACAGTCTTGG CCAAGCCCCAATCTCTCTCT	139	http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr50/index.htm
		WMS382-F WMS382-R	GTCAGATAACGCCGTCCAAAT CTACGTGCACCAATTTTG	110	
<i>Lr66</i>	<i>Aegilops speltoides</i>	I6-S13F I6-S13R	GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC CAACCTGGGAAGAATGCTGAG	695	Marais <i>et al.</i> , 2009
1BL.1RS/ 1AL.1RS	<i>Secale cereale</i>	SCM9F SCM9R	TGACAAACCC CCTTCCCTCGT TCATCGAGGCTAAGGAGGACCC	207/ 228	Weng <i>et al.</i> , 2007

Таблица 3

Характеристика образцов мягкой пшеницы по устойчивости к возбудителю бурой ржавчины в фазе проростков и взрослых растений (опытное поле ВИР, г. Пушкин, 2013, 2014 гг.)

№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Чужеродный вид в родословной	Тип реакции проростков при инокуляции тест-клонами						Развитие болезни в полевых условиях (%) и тип реакции		Идентифицированные Lr-гены и транслокации	Информация о наличии Lr-генов по GRIS***	
				кLr9	кLr19	к43	к18	кП19	к70	к60	2013 г.			2014 г.
Яровая пшеница														
62517	Cutless	США	<i>Ae. tauschii</i>	R	R	R	R	R	R	R	0	0	Lr21	Lr21
60781	ND 600	«	«	S	R	R	S	R	S	R	1S	1S	Lr21	Lr21
54855	Hadden	«	<i>T. timopheevii</i>	S	S	S	S	S	S	S	0	0	Lr13	Lr13
50851	Линия ИТ-5	Россия	«	MS	MS	MR	S	MR	MS	R	0	0	LrTt1LrTt2	LrTt1LrTt2
50847	Линия ИТ-1	«	«	S	S	S	S	S	S	S	0, 5S**	0, 5S**		
50852	Линия ИТ-6	«	«	MR	S	R	R	R	R	R	0, 5S**	0		
50857	Линия ИТ-13а	«	«	S	S	S	S	S	S	S	0, 1S**	0, 1S**		
50858	Линия ИТ-15	«	«	S	R	MS	S	S	MS	S	0	0, 1S**		
50849	Линия ИТ-3	«	«	S	S	S	S	S	S	S	1MR	1-5MR, 10-15MR**	LrTt1LrTt2	LrTt1LrTt2
50853	Линия ИТ-7	«	«	MR	MR	S	R	R	X	S	0, 5S**	0, 5S, 20-30S**		
50850	Линия ИТ-4	«	«	S	S	S	S	S	S	S	0, 70S**	0, 50-70S**		
50854	Линия ИТ-8	«	«	S	MS	S	S	S	S	S	10S	0, 30-50S**		
61518	Линия 36	Эстония	«	R	R	S	R	R	S	R	0, 5S, 30-40S**	0, 10S, 30-40S**		
62878	АС Minto	Канада	<i>Ae. tauschii</i>	R	MR	R	MR	R	R	MR	1S	5S	Lr11Lr13Lr22a	Lr11Lr13Lr22a
65264	–	Мексика	«	S	S	R	R	R	S	S	5S	5S		

Продолжение таблицы 3

№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Чужеродный вид в родословной	Тип реакции проростков при инокуляции тест-клонами						Развитие болезни в полевых условиях (%) и тип реакции		Идентифицированные Lr-гены и транслокации	Информация о наличии Lr-генов по GRIS***	
				кLr9	кLr19	к43	к18	кП19	к70	к60	2013 г.			2014 г.
Яровая пшеница														
43577	Wis. 245	США	<i>T. timopheevii</i>	S	-	S	S	S	S	S	S	0, 1S	5S	Lr12
45165	IL-1/Chinese*2/ <i>T. timopheevii</i>	Канада	«	S	R	S	R	S	S	S	S	5S	5MS	
49928	Allard 52-1-1-17-1	США	«	S	S	S	S	S	S	S	S	5S	5S	Lr12
43091	Blue A	Канада	<i>Ag. elongatum</i>	S	S	S	R	S	S	S	S	10MS	30M	
Озимая пшеница														
62377	KS90WGRC10	США	<i>Ae. tauschii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	Lr39 1AL.1RS
62382	KS93U149	«	<i>Ae. tauschii</i> <i>Ag. elongatum</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	-	0	Lr24 1AL.1RS
63933	KS93U62	«	«	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	Lr24, Lr39 1AL.1RS
63937	KS93U50	«	«	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	Lr24 1AL.1RS
65156	KS92WGRC 22	«	«	R	R	R	R	R	R	R	R	0	0	Lr24 1AL.1RS
65158	KS96WGRC 40	«	<i>Ae. tauschii</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	0	-	Lr39
65157	KS96WGRC38	«	<i>Ae. tauschii</i> <i>T. timopheevii</i> <i>ssp. armeniacum</i>	R	R	MR	R	R	R	R	MR	-	0	Lr41 Lr50 1AL.1RS

Окончание таблицы 3

№ по каталогу ВИР	Название образца	Происхождение	Чужеродный вид в родословной	Тип реакции проростков при инокуляции тест-клонами						Развитие болезни в полевых условиях (%) и тип реакции		Идентифицированные Lr-гены и транслокации	Информация о наличии Lr-генов по GRIS***	
				κLr9	κLr19	κ43	κ18	κП19	κ70	κ60	2013 г.			2014 г.
Озимая пшеница														
63322	Brigadier	Франция	<i>Ae. ventricosa</i>	R	R	R	S	S	S	R	0	–	IBL.1RS (Lr26) Lr 37	Lr13 Lr26 Lr37
45678	Hybrid (Cheyenne × <i>T. timopheevii</i>)	Канада	<i>T. timopheevii</i>	S	S	S	S	S	S	S	0	–		
64308	Фишт	Россия	<i>T. migushovae</i>	S	S	S	S	S	S	S	1S	0	IBL.1RS (Lr26)	
64584	Восторг	«	«	R	R	R	S	S	S	R	1S	5MR	Lr37	
63901	Alert	Велико-британия	<i>Ae. ventricosa</i>	R	S	R	R	S	S	R	0	5S		
63920	Beaufort	«	«	R	R	R	S	S	R	R	0	5S	IBL.1RS (Lr26) Lr37	Lr1 Lr26 Lr37
62373	KS86WGRC02	США	<i>Ae. tauschii</i>	S	S	S	S	R	S	R	5S	–	Lr21	Lr21 Lr 41
63300	Arche	Франция	<i>Ae. ventricosa</i>	R	R	S	S	S	S	S	1S	10S	Lr37	Lr13 Lr37
63031	Steele	США	<i>Ae. tauschii</i>	S	S	S	R	R	X	S	10S	15S		Lr2a, Lr10 Lr21
62811	Centurion	Франция	<i>Ae. ventricosa</i>	S	S	S	S	S	S	S	5S	20S	Lr37	

* Представлены результаты последнего учета; ** неоднородность образца по устойчивости к бурой ржавчине; *** GRIS – Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale (<http://www.wheatpedigree.net>); «←» – нет данных.

(к-49440, к-45182) из Канады; N43 (к-47033, Бразилия); South Africa 43 (к-45295) и Gouritz (к-64137) из ЮАР; 690 F4 Sel.D.I. (к-49432, Кения); Titan (к-58433, Австралия); УН 96 (к-60551, Чехословакия до 1992 г.); Livanjka (к-60991, Югославия до 1990 г.); Гартус 598 (к-59398), Саратовская 73 (к-64556), Жировка (к-63377), Л-500 (к-62903), линия ИТ-2 (к-50848), линия ИТ-11а (к-50855), линия ИЛ 6 (к-60773), ППГ 186 (к-40231) и ППГ 347 (к-58541) – все из России.

С использованием тест-клонов у изученных образцов мягкой пшеницы не выявлено частично эффективных чужеродных генов *Lr9* и *Lr19*, при этом показано наличие гена *Lr26* у озимых сортов Восторг, Brigadier и Beaufort.

При молекулярно-генетическом скрининге у интрогрессивных образцов не обнаружено маркеров генов *Lr9*, *Lr19*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr50* и *Lr66*. У линий KS90WGRC10 и KS93U62 выявлен маркер GDM35 гена *Lr39*; у линий KS93U149, KS93U62, KS93U50 и KS92WGRC22 – маркеры Sr24#12 и SCS73 гена *Lr24*; у образцов KS86WGRC02 и Cutless – маркер Lr21F/R гена *Lr21*; у сортов Brigadier, Alert, Beauford, Arche, Centurion – маркер Ventriup/LN2 гена *Lr37*. Продукт амплификации размером 207 п.о., полученный с использованием маркера SCM9 и указывающий на наличие 1BL.1RS с геном *Lr26*, наблюдали у сортов Brigadier, Восторг и Beaufort, а размером 228 п.о. (транслокация 1AL.1RS) – у линий KS90WGRC10, KS93U149, KS93U62, KS93U50, KS92WGRC22, KS96WGRC40, KS96WGRC38. У линии Blue A выявлен продукт амплификации, полученный при использовании маркера SCS421 гена *Lr28*, незначительно отличающийся по размеру от контрольной линии.

ОБСУЖДЕНИЕ

В современный период наиболее эффективными во всех регионах России являются гены *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr39* (= *Lr41*) и *Lr47*, однако ни один из них не идентифицирован в районированных отечественных сортах (Гульятеева и др., 2009а, б, 2014; Zhemchuzhina, Kurkova, 2010; Gulyaeva *et al.*, 2014). Среди изученных коллекционных образцов выявлены носители генов *Lr24* и *Lr39* по отдельности и в комбинации (табл. 3).

Источником гена *Lr39* для линий KS90WGRC10 и KS93U62 был образец *Ae. tauschii* TA2460, а пырейного гена *Lr24* для KS93U149, KS93U62, KS93U50 и KS92WGRC22 – озимые североамериканские сорта TAM200 и Century, которые, в свою очередь, получили его от сорта Amigo в составе сегмента хромосомы пырея 3Ae#1L. От сорта Amigo во все названные выше линии, а также в линии KS96WGRC40 и KS96WGRC38 была перенесена и пшенично-ржаная транслокация T1AL.1RS (Jiang *et al.*, 1994). Следует отметить, что маркер гена *Lr39* не выявлен у линии KS93U149, хотя одной из ее родительских форм был тот же самый образец *Ae. tauschii* TA2460.

Ген *Lr39* преимущественно встречается в североамериканских сортах, и сорт Thunderbolt был первым, в генотип которого был введен этот ген. Сорт выращивали на больших площадях в ряде штатов, и в 2002 г. впервые были отмечены вирулентные изоляты (<http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr39/index.htm>). Ген *Lr24* имеет широкое распространение в сортах пшеницы североамериканской и австралийской селекции, однако из-за несоблюдения оптимальных площадей, занятых сортами с этим геном, он частично утратил свою эффективность в этих странах (McIntosh *et al.*, 1995). До сих пор он остается эффективным в странах Западной Европы и России (Mesterházy *et al.*, 2000; Zhemchuzhina, Kurkova, 2010; Тырышкин и др., 2014; Gulyaeva *et al.*, 2014).

У пшенично-пырейной замещенной линии Blue A, у которой пара хромосом 4D замещена на 4Ael (Zeven, 1991), идентифицирован фрагмент ДНК, незначительно отличающийся по размеру от маркера гена *Lr28*, источником которого служит *Ae. speltoides*. В полевых условиях 2013–2014 гг. поражение этой линии варьировало от 10 до 30 % с типом реакции X, а линия TcLr28 была иммунной (0 %). В фазе проростков большинство изолятов *P. triticina* были авирулентными на листьях растений линии TcLr28, но вирулентными на линии Blue A, что подтверждает отсутствие у нее гена *Lr28*.

К группе генов, характеризующихся как частично эффективные в России, относятся *Lr9*, *Lr19*, *Lr25*, *Lr27+Lr31*, *Lr36*, *Lr38*, *Lr42*, *Lr45*, *Lr49* и *Lr50*. Вирулентность штаммов возбудителя к линиям с генами *Lr25*, *Lr36*, *Lr38*, *Lr42*,

Lr45, *Lr49* и *Lr50* проявляется спорадически, в разные годы и в различных регионах, и не превышает 15 %. Вирулентность к тестерным линиям *TcLr19* и *TcLr9* наблюдается в тех регионах, где массово сконцентрированы сорта-носители генов *Lr9* и *Lr19* (Мешкова и др., 2008). Фитопатологическим тестом и молекулярными маркерами в изученном наборе не выявлено образцов с этими генами. Согласно родословной, у образца KS96WGRC38 возможно присутствие гена *Lr50*, донором которого мог быть образец TA895 дикой арапатской пшеницы *T. araraticum* (Brown-Guedira *et al.*, 1999). Однако использование SSR-маркеров *GDM87* и *WMS382* не подтвердило наличия данного гена у KS96WGRC38. Ген *Lr50* характеризуется как частично эффективный на Североамериканском континенте и преимущественно используется в селекции в пирамидировании с другими *Lr*-генами (<http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr50/index.htm>).

Все названные выше идентифицированные *Lr*-гены относят к группе «ювенильных», действие которых проявляется во всех фазах онтогенеза пшеницы, начиная с первого листа. Гены *Lr21* и *Lr37*, выявленные у части образцов изученного набора, относятся к генам устойчивости взрослых растений, их эффект отмечен на более поздних этапах онтогенеза, например, после выхода в трубку. Согласно «Каталогу генных символов пшеницы» (McIntosh *et al.*, 2012), в данную группу входят также гены *Lr12*, *Lr13*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr46*, *Lr48* и *Lr67*.

Ген *Lr21* относится к группе высокоэффективных в США и Канаде (McIntosh *et al.*, 1995). В Западной Европе степень поражения линии *TcLr21* варьировала от 0 до 100 % в зависимости от года и страны (Mesterházy *et al.*, 2000; Hanzalová *et al.*, 2008). В фазе проростков ген *Lr21* описан как неэффективный к российской популяциям *P. triticina* (Гульгяева и др., 2009а, б; Zhemchuzhina, Kurkova, 2010), однако в фазе взрослых растений в условиях Северо-Запада в период с 2002 г. по 2014 г. линия *TcLr21* была умеренно устойчивой (поражение от 5 до 30 %), так же, как и линия KS89WGRC07, описанная ранее как донор гена *Lr40* (в настоящий период *Lr40* = *Lr21*) (McIntosh *et al.*, 1995). С использованием молекулярного маркера показано наличие у этой линии и у сорта Cutless гена *Lr21*, но

он не обнаружен у Steele и ND 600. По данным информационной базы «Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale» ND 600, – это синонимичное название сорта Cutless, в коллекции пшеницы ВИР эти образцы имеют разные каталожные номера. По устойчивости к бурой ржавчине выявлены их различия как в фазе проростков, так и у взрослых растений. Сорт Cutless относился к группе иммунных на протяжении всего вегетационного периода, а ND 600 оказался гетерогенным при инокуляции клонами в фазе проростков, в полевых условиях на листьях его растений наблюдали единичные пустулы гриба (развитие 1 %). При создании данного образца была использована почти изогенная линия сорта Thatcher RL-6043 – источник гена *Lr21* (McIntosh *et al.*, 1995), что получило подтверждение только для сорта Cutless.

До недавнего времени во всем мире ген *Lr37* был одним из высокоэффективных генов устойчивости взрослого растения (McIntosh *et al.*, 1995). Вирулентность к нему впервые была описана в Австралии в 2002 г. К настоящему времени ген утратил эффективность в Западной Европе в связи с массовым выращиванием сортов – его носителей (Serfling *et al.*, 2011). В России поражение линии *TcLr37* различается по регионам. В Северо-Западном регионе оно варьирует в зависимости от года от 5 до 30 %. Сорта озимой пшеницы Brigadier, Alert, Beaufort, Arche, Centurion, содержащие данный ген, имели поражение от 5 до 20 %, что, вероятно, обусловлено присутствием в их генотипах дополнительных *Lr*-генов (табл. 3).

Определенный интерес для селекции может представлять серия линий ИТ, полученная в ВИР в 1970-х годах от скрещивания мягкой пшеницы с видом *T. timopheevii* и описанная как устойчивая к бурой ржавчине (Скурыгина, 1984). Многие линии выделились в настоящем анализе (табл. 3). По данным Н.А. Скурыгиной (1984), все эти линии имеют два доминантных гена, *LrTi1* и *LrTi2*, и дополнительно, по данным R.A. McIntosh, ген *Lr18* (Скурыгина, 1989). Полевая оценка линий в условиях Северо-Западного региона в 2013–2014 гг. показала, что большинство линий – гетерогенные по устойчивости. Из них необходимо отобрать устойчивые растения и с использованием молекулярных и

цитологических методов провести у них идентификацию генов устойчивости.

При использовании универсального маркера SCM9, выявляющего транслокации 1BL.1RS от сорта Кавказ и 1AL.1RS от сорта Amigo, обнаружены образцы – носители этих транслокаций (табл. 3). Массовое использование гена *Lr26* в селекции в конце 60-х гг. прошлого века и последующее возделывание однородных по этому гену сортов на больших площадях привели к формированию мощного селективного фона для накопления вирулентных клонов. В настоящее время вирулентные к гену *Lr26* клоны гриба широко распространены во всех регионах России. Тем не менее следует отметить, что 1BL.1RS транслокация несет (кроме генов устойчивости) гены, повышающие урожайность зерна и засухоустойчивость за счет увеличения массы корней (Kim *et al.*, 2004). В связи с этим селекционеры ищут эффективные комбинации гена *Lr26* с другими *Lr*-генами. Одним из положительных примеров является использование комбинации *Lr19 + 26* (Сибикеев и др., 2011).

Несмотря на то что в транслокации 1AL.1RS не выявлено известных *Lr*-генов, несущие ее образцы характеризуются определенным уровнем устойчивости (Weng *et al.*, 2007). Это подтверждено и в настоящем анализе – большинство образцов с этой транслокацией были устойчивыми. Наличие транслокации 1AL.1RS выявлено среди районированных сортов только у сорта Богданка.

Таким образом, в результате проведенного скрининга по устойчивости к бурой ржавчине выявлены образцы – носители чужеродных генов, которые могут быть использованы в отечественной селекции. При этом следует разработать научно аргументированную стратегию их размещения в регионах РФ, чтобы не воспроизвести ситуацию, которая имела место с генами *Lr19* и *Lr9*.

Молекулярные исследования выполнены при частичной поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-26-00067).

ЛИТЕРАТУРА

Гультяева Е.И., Баранова О.А., Дмитриев А.П. Вирулентность и структура популяций *Puccinia triticina* в Российской Федерации в 2007 году // Вестн. защиты растений.

- 2009а. № 4. С. 33–38.
- Гультяева Е.И., Канюка И.А., Алпатьева Н.В., Баранова О.А., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. Молекулярные подходы в идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у российских сортов пшеницы // Докл. РАСХН. 2009б. № 5. С. 23–26.
- Гультяева Е.И., Садовая А.С., Шайдаук Е.Л. Молекулярно-генетический скрининг новых российских сортов мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине // Вестн. защиты растений. 2014. № 1. С. 26–29.
- Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В. и др. Пшеницы мира. Л.: Агропромиздат, 1987. 558 с.
- Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // Молекуляр. генетика. 1997. Т. 33. № 4. С. 443–450.
- Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к основным болезням в странах-членах СЭВ. Прага, 1988. С. 321.
- Мешкова Л.В., Росеева Л.П., Шрейдер Е.Р., Сидоров А.В. Вирулентность патотипов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к *ThLr9* в регионах Сибири и Урала // Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2008 г. СПб., 2008. С. 70–73.
- Михайлова Л.А., Гультяева Е.И., Мироненко Н.В. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. Санкт-Петербург, РАСХН, ВНИИЗР, Инновац. центр защиты растений. 2003. 24 с.
- Новожилов К.В., Левитин М.М., Михайлова Л.А., Гультяева Е.И. Принципы использования исходного материала в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине // Вестн. РАСХН. 1998. № 1. С. 61–64.
- 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 расе стеблевой ржавчины Ug99+Sr24 (ТТКСТ) // Докл. РАСХН. 2011. Т. 2. С. 3–5.
- Скурыгина Н.А. Высокоэффективные гены устойчивости к популяциям бурой ржавчины и мучнистой росы у линий мягкой пшеницы, производных *Triticum timopheevii* Zhuk., и их дифференциация // Селекционно-генетическая характеристика: Сб. науч. тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1984. Т. 85. С. 5–13.
- Скурыгина Н.А. Интрогрессия генов устойчивости к грибным болезням и генетическая структура *Triticum timopheevii* Zhuk. // Генетические исследования злаковых культур: Сб. науч. тр. по прикл. ботан., генет. и селекции. 1989. Т. 128. С. 21–33.
- Тырышкин Л.Г., Захаров В.Г., Сюков В.В. Сравнительная характеристика вирулентности *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. Syn. *Puccinia triticina* Erikss. в Среднем Поволжье // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014. Т. 18. № 2. С. 373–377.
- Brown-Guedira G., Singh S. Disease resistance. Leaf Rust. *Lr50*. <http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr50/index.htm>.
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A. *et al.* Identification of a molecular marker linked to an *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr19* for leaf rust resistance in wheat // Plant

- Breeding. 2003. V. 122. P. 204–208.
- Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A. *et al.* Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat // *Euphytica*. 2005. V. 143. P. 19–26.
- Gold J., Harder D., Townley-Smith F., Aung T., Procnier J. Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines // *Electron. J. Biotechnol.* 1999. V. 2. No. 1. P. 35–40.
- Gulyaeva E., Shaidayuk E., Baranova O., Sadovaya A., Khlopunova L. Diversity of *Puccinia triticina* fungus in Russia in 2002–2013 // 11th Conf. of the Eur. Foundation for Plant Pathology, Healthy plants – healthy people. 8–13 September 2014. Krakow, Poland. Book of abstracts. P. 199.
- Gupta S.K., Charpe A., Koul S. *et al.* Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust – resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat // *Genome*. 2005. V. 48. No. 5. P. 823–830.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.W., Haque O.M.R. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2006. V. 113. P. 1027–1036.
- Hanzalová A., Huszár J., Bartoš P., Herzová E. Occurrence of wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) races and virulence changes in Slovakia in 1994–2004 // *Biologia*. 2008. V. 63. No. 2. P. 1–4.
- Helguera M., Khan I.A., Dubcovsky J. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47* // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 101. No. 4. P. 625–631.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J. *et al.* PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // *Crop Sci.* 2003. V. 43. P. 1839–1847.
- Jiang J., Friebe B., Gill B.S. Chromosome painting of Amigo wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1994. V. 89. No. 7/8. P. 811–813.
- Kim W., Jonson P.S., Baenziger P.S. *et al.* Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources // *Crop Sci.* 2004. V. 44. P. 1254–1258.
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S. *et al.* Development of PCR markers for the selection of wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 496–504.
- Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., McCallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides* // *Euphytica*. 2009. V. 171. P. 71–85.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat rust: An atlas of resistance genes // *Csiro Publishing*. 1995. 200 p.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J. *et al.* Catalogue of gene symbols // Wheat genetic resources database KOMUGI. 2012. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>
- Mesterházy Á., Bartoš P., Goyeau G., Niks R. *et al.* European virulence survey for leaf rust in wheat // *Agronomie*. 2000. V. 20. P. 793–804.
- Peterson R.F., Cambell 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.
- Prabhu K.V., Gupta S.K., Charpe A., Koul S. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr24* in wheat: a revision // *Plant Breeding*. 2004. V. 123. P. 417–420.
- Procnier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S. *et al.* PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Genet. Breeding*. 1995. V. 49. P. 87–92.
- Serfling A., Krämer I., Lind V. *et al.* Diagnostic value of molecular markers for *Lr* genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance // *Eur. J. Plant Pathol.* 2011. V. 130. No. 4. P. 559–575.
- Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. 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.
- Zeven A.C. Wheats with purple and blue grains: a review // *Euphytica*. 1991. V. 56. P. 243–258.
- Zhemchuzhina A., Kurkova N. Structure of population of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006–2008 // *Proc. of the BGRI Technical Workshop*, May 30–31, 2010. St. Petersburg, Russia. P. 27.
- Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources 1AL. 1RS and 1BL. 1RS wheat-rye translocations in wheat background // *Plant Breeding*. 2007. V. 126. P. 482–486.

**LEAF RUST RESISTANCE IN COMMON WHEAT VARIETIES
AND LINES FROM THE COLLECTION
OF THE VAVILOV PLANT INDUSTRY INSTITUTE
CARRYING ALIEN GENETIC MATERIAL**

**A.S. Sadovaya¹, E.I. Gulyaeva¹, O.P. Mitrofanova², E.L. Shaidayuk¹,
A.G. Hakimova², E.V. Zuev²**

¹ All-Russia Institute of Plant Protection, St.-Petersburg, Russia,
e-mail: gullena@rambler.ru;

² Vavilov Institute of Plant Industry, St.-Petersburg, Russia

Summary

Leaf rust resistance was estimated in 83 common wheat accessions from the collection of the Vavilov Institute carrying alien genetic material. Eight accessions with seedling resistance and 27 accessions with adult plant resistance were found. Analysis with molecular markers revealed genes highly and moderately efficient in Russia – *Lr24*, *Lr39*, *Lr21*, and *Lr37* – and a rye translocation 1AL.1RS. The samples accessions effective *Lr* genes are promising donors in Russian breeding programs. Lines raised with the use of *T. timopheevii* were heterogeneous for resistance. No molecular markers of the *Lr50* gene known for this species were detected there. These lines demand further examination and selection.

Key words: common wheat, leaf rust, resistance, molecular markers, *Lr* genes, alien genetic material.

УДК 633.16:632.4:631.523

**КАРТИРОВАНИЕ ЛОКУСОВ,
КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ ЯЧМЕНЯ
К РАЗЛИЧНЫМ ИЗОЛЯТАМ *Pyrenophora teres f. teres*
И *Cochliobolus sativus***

© 2014 г. **О.С. Афанасенко¹, А.В. Козьяков¹, П. Хедлэй², Н.М. Лашина¹,
А.В. Анисимова¹, О. Маннинен³, М. Ялли⁴, Е.К. Потокина⁵**

¹ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
Санкт-Петербург, Пушкин, Россия, e-mail: olga.s.afan@gmail.com;

² Институт Джеймса Хаттона, Данди, Шотландия;

³ Центр сельскохозяйственных исследований Финляндии, Йокиоиннен, Финляндия;

⁴ Бореал, Йокиоиннен, Финляндия;

⁵ ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт растениеводства
им. Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г. Принята к публикации 29 сентября 2014 г.

Сетчатая пятнистость ячменя (*Hordeum vulgare* L.), вызываемая грибом *Pyrenophora teres f. teres*, и темно-бурая – возбудителем *Cochliobolus sativus*, относятся к числу наиболее распространенных и вредоносных болезней в ареале культуры. Селекция ячменя на устойчивость к этим болезням предполагает наличие генетического разнообразия устойчивости. В дигамплоидной популяции «А», полученной от скрещивания эфиопского образца к-23874, устойчивого к *P. teres f. teres*, с восприимчивым сортом Пиркка, выявлен SNP-маркер (11_11067, позиция 58 сМ) на хромосоме 6Н, который был достоверно ($p < 0,05$) сцеплен с устойчивостью к трем изолятам *P. teres f. teres*. В дигамплоидной популяции «В» (Зерноградский 813 × Ранний 1) обнаружено 11 QTLs, контролирующих устойчивость к 12 изолятам *P. teres f. teres* на всех хромосомах ячменя и 14 QTLs – к 12 изолятам *C. sativus* на всех хромосомах, кроме 4Н. Показана изолят-специфичность выявленных QTLs, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres f. teres* и *C. sativus*. Большинство выявленных локусов находятся в интервалах между SNP-маркерами, в которых другими исследователями уже были обнаружены QTL, контролирующие устойчивость к *P. teres f. teres* и *C. sativus*. На хромосомах 1Н, 4Н и 5Н выявлены 4 новых изолят-специфичных QTL, контролирующих устойчивость к *P. teres f. teres*. Пять новых QTL, ассоциированных с устойчивостью к *C. sativus*, были обнаружены на хромосомах 2Н, 3Н, 5Н и 6Н.

Ключевые слова: ячмень, устойчивость к болезням, дигамплоидные популяции, картирование QTL, SNP-маркеры, *Pyrenophora teres f. teres*, *Cochliobolus sativus*, молекулярные маркеры.

Мировое производство продукции растениеводства, в том числе и в России, ориентировано на ресурсосберегающие и экологически безопасные технологии. Базовой составляющей таких технологий является возделывание устойчивых к болезням сортов сельскохозяйственных культур. Все основные стратегии создания генетически защищенных сортов сельскохозяйственных культур базируются на наличии генетического разнообразия устойчивости, так как возделывание сортов с высокоэффективными

генами устойчивости на больших территориях неизбежно приводит к потере устойчивости вследствие микроэволюционных процессов в популяциях паразитов.

С появлением новых технологий молекулярного картирования и секвенирования значительно расширились возможности селекции растений на устойчивость к болезням, так как появился новый мощный инструмент контроля передаваемого признака устойчивости – молекулярные маркеры (ММ).

Маркер-вспомогательная селекция (marker assisted selection – MAS) растений на устойчивость к болезням в настоящее время широко используется в Европе, США, Канаде, Австралии. Ее преимущества очевидны, особенно при пирамидировании генов устойчивости, вовлечении в селекцию генов, которые экспрессируются только у взрослых растений, а также генетических детерминант количественной устойчивости растений к болезням. Особенную значимость приобретают ММ при создании сортов с длительной устойчивостью, так как позволяют объединять в одном генотипе гены устойчивости, обеспечивающие эффективную защиту от широкого спектра изолятов с различной вирулентностью.

Наибольшее количество ММ известно для генов устойчивости зерновых культур к возбудителям ржавчинных болезней. В России в последние годы используют разработанные за рубежом ММ для определения генетического разнообразия устойчивости пшеницы к бурой ржавчине (Тырышкин и др., 2006; Гультяева, Волкова, 2009; Гультяева и др., 2009; Лапочкина и др., 2009; Васильев, Беспалова, 2011; Крупин, 2011).

В последнее десятилетие как у нас в стране, так и за рубежом отмечено значительное нарастание вредоносности болезней зерновых культур, вызываемых гембиотрофными паразитами. Среди них наиболее вредоносными для ячменя во всех зонах его возделывания являются сетчатая пятнистость (возбудитель – гриб *Pyrenophora teres* Drechs f. *teres*) и темно-бурая пятнистость (возбудитель *Cochliobolus sativus* (Ito et Kurib.) Drechsler ex Dastur.), известные также как «гельминтоспориозные» пятнистости. Эпифитотии пятнистостей ячменя возникают с частотой 5 раз в 10 лет. Потери урожая восприимчивых сортов ячменя от этих болезней в годы эпифитотий составляют от 20 до 40 %. В связи с этим остро стоит проблема разработки генетического метода защиты ячменя от этих болезней.

Высокая гетерогенность популяций *P. teres* f. *teres* по признаку вирулентности и различия между географическими популяциями, обусловленные главным образом влиянием генотипов возделываемых сортов на формирование популяций патогена, указывают на необходимость

использования доноров устойчивости ячменя, эффективных против местных популяций паразита и адаптированных к условиям определенной агроклиматической зоны (Афанасенко *et al.*, 2009; Афанасенко и др., 2010).

В лаборатории иммунитета растений к болезням Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений в результате многолетней работы и активного сотрудничества с ВНИИ растениеводства им. Н.И. Вавилова и зарубежными институтами создана коллекция источников и доноров устойчивости ячменя к возбудителям гембиотрофных патогенов. Коллекция насчитывает более 400 образцов ячменя.

Целью настоящего исследования являлись идентификация и картирование генетических детерминант устойчивости ячменя к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей в дигаплоидных картирующих популяциях, полученных от скрещивания эфиопского образца к-23874 и сорта Пиркка, а также сортов Зерноградский 813 и Ранний 1 с использованием изолятов патогенов различного происхождения, а также проверка гипотезы изолят-специфичности локусов количественной устойчивости (QTL).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Родительские генотипы дигаплоидных популяций. Для инициации культуры пыльников использовали гибриды F₁ от скрещивания сортов Ранний 1 и Зерноградский 813, а также к-23874 и Пиркка (табл. 1). Характеристика родительских компонентов скрещивания приведена в табл. 1.

Следует заметить, что сорта Зерноградский 813 и Ранний 1 проявляли дифференцирующую реакцию к обоим возбудителям.

Дигаплоидные картирующие популяции. Дигаплоидные растения ячменя были получены в культуре пыльников от гибридов F₀ комбинаций к-23874 × Пиркка и Ранний 1 × Зерноградский 813 по методике О. Manninen (1997), в которой оптимизированы фаза растений и состав культуральных сред. Получено семенное потомство 42 дигаплоидных линий (ДЛ) в комбинации к-23874 × Пиркка (популяция «А») и 114 ДЛ в комбинации Зерноградский 813 × Ранний 1 (популяция «В»).

Таблица 1

Характеристика образцов ячменя, вовлеченных в скрещивания с целью получения популяций дигаплоидных линий

Образцы (№ по каталогу ВИР)	Происхождение	Сорт/ разновидность	Устойчивость
Популяция «А»			
к-18530	Финляндия	Пиркка / pallidum	Универсально восприимчивый сорт
к-23874	Эфиопия	WGA-148-3 / parallelum	Высокоустойчив к сетчатой пятнистости, устойчив к пыльной головне и мучнистой росе
Популяция «В»			
к-27737	Россия, Новосибирская область	Ранний 1 / Nutans	Среднеустойчив к сетчатой пятнистости
к-30453	Россия, Ростовская область	Зерноградский 813 / erectum	Среднеустойчив к темно-бурой пятнистости и ринхоспориозу

Изоляты патогенов. Листья ячменя с симптомами пятнистостей собирали на сортоучастках в Ленинградской, Новгородской, Псковской областях и Краснодарском крае. Изоляцию грибов *P. teres f. teres* и *C. sativus* и получение моноконидиальных изолятов проводили на модифицированной среде Чапека по общепринятым методикам (Афанасенко, Левитин, 1979). Определение устойчивости ДЛ к *P. teres f. teres* проводили двумя методами – инокуляцией вегетирующих растений в теплице и отсеченных листьев в лабораторных условиях.

Инокуляция в теплице. Оценку устойчивости дигаплоидных линий обеих картирующих популяций к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей проводили в условиях теплицы Центра сельскохозяйственных исследований Финляндии (Agrifood Research Finland, МТТ). Растения каждой дигаплоидной линии были высеяны в четырех повторностях по одному растению в каждый горшок с почвенно-торфяной смесью. Растения выращивали при температуре 18–22 °С и 12-часовом фотопериоде. Через 14 суток после посева относительную влажность воздуха в теплице поднимали до 100 % и растения в стадии 2–3 листьев опрыскивали конидиальной суспензией изолята *P. teres* V278 в концентрации 50 000 конидий /мл по 0,3 мл на растение. Тип реакции каждого растения и среднее значение по повторностям определяли на 10–14-е сутки по модифицированной

10-балльной шкале Текауза (Tekauz, 1985): типы реакции, оцененные в баллах в интервале от 1 до 5, относили к устойчивости, 5,1–10 – к восприимчивости.

Инокуляцию растений грибом *C. sativus* проводили суспензией моноконидиального изолята C_Fin в концентрации 10 000 конидий/мл. Для определения типов реакции растений к *C. sativus* использовали 9-балльную шкалу Фетча и Стеффенсона, в которой баллы 1–3 соответствуют устойчивости, 4–5 – промежуточной реакции и 6–9 – реакции восприимчивости (Fetch, Steffenson, 1999). При этом основным критерием для определения как промежуточного типа реакции, так и восприимчивости являлось наличие хлороза. При обработке данных средние по повторностям типы реакции от 1 до 4,5 относили к устойчивости, от 4,6 до 9 – к восприимчивости.

Инокуляция отсеченных листьев проростков. Инокуляцию отсеченных листьев проростков ДЛ, помещенных на фильтровальную бумагу, смоченную 0,004 %-м раствором бензимидазола, проводили путем опрыскивания суспензией моноконидиальных изолятов *Cochliobolus sativus* (10 000 конидий/мл) и *Pyrenophora teres f. teres* (5000 конидий/мл). (Афанасенко, 1977). Тип реакции каждого отрезка листа на инокуляцию изолятами *P. teres* учитывали на 4-е сутки по модифицированной шкале Текауза (Tekauz, 1985). Средние баллы от 1 до 5 соответствовали устойчивости, бал-

лы от 5,1 до 10 – восприимчивости. Высокая корреляция результатов заражения растений в теплице и отсеченных листьев проростков была показана в нескольких работах (Михайлова, Афанасенко, 2005; Tuohy *et al.*, 2006; Afanasenko *et al.*, 2009).

Выделение ДНК. ДНК была выделена из свежих листьев трехнедельных проростков по стандартной методике с использованием СТАВ-буфера (Saghai-Maroofoo *et al.*, 1984). Генотипирование проводили с использованием SNP-маркеров в лаборатории генетических технологий James Hutton Institute (Dundee, UK), с применением считывающего устройства BeadXpress (Illumina Inc.). Для генотипирования популяции был использован набор из 384 SNP-маркеров с известной генетической позицией на хромосомах ячменя (Rostoks *et al.*, 2006). Используемые SNP-маркеры относятся к первой из так называемых «панелей SNP-генотипирования ячменя» (barley oligonucleotide pool assays, BOPA1), разработанных на базе технологий Illumina GoldenGate assay (Illumina Inc., San Diego, CA).

Генетические расстояния на карте популяции «А» в связи с малой выборкой рекомбинантного потомства для данного скрещивания (42 рекомбинанта) не рассчитывались, вместо них использовались опубликованные ранее генетические расстояния между SNP-маркерами на карте референсной популяции ячменя Steptoe/Morex (Rostoks *et al.*, 2006). Для картирующей популяции «В» (114 рекомбинантов) генетические расстояния были рассчитаны по частоте рекомбинации между маркерами с помощью программного обеспечения MAPMAKER v.2 (Lander *et al.*, 1987) с использованием функции Косамби (Kosambi, 1944), минимального LOD = 3,0 (logarithm of odds, статистика отношения правдоподобия) и максимальной частоты рекомбинации 50 %.

Картирование QTLs для признака устойчивости. Картирование QTLs (Quantitative Trait Loci) осуществлялось с помощью программного обеспечения QTL Cartographer version 2,5, с применением алгоритма CIM (Compositive Interval Mapping). Минимальное пороговое значение LOD, достоверное при 95 %-м уровне значимости ($p = 0,05$), рассчитывалось для каждого изолята *P. teres* и *C. sativus* по результатам 1000 пермутаций.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Устойчивость родительских компонентов скрещивания и ДЛ. Для картирования генетических детерминант устойчивости был проведен отбор изолятов *P. teres* f. *teres* и *C. sativus* различного происхождения с учетом реакции сортов – родительских компонентов скрещивания (табл. 2). Типы реакции образца к-23874 и сорта Пиркка к трем изолятам возбудителя сетчатой пятнистости были одинаковыми: реакция образца к-23874 при инокуляции как интактных растений в теплице, так и отрезков листьев соответствовала баллам 1–2, сорта Пиркка – 8 (табл. 2, рис. 1) Выявлено единообразное расщепление по устойчивости у ДЛ популяции «А» к трем изученным изолятам. Корреляция между типами реакции интактных растений и отрезков листьев была высокой: коэффициент корреляции $r = 0,89$.

Устойчивость сорта Ранний 1 к отобранным изолятам возбудителя сетчатой пятнистости была выше по сравнению с сортом Зерноградский 813, но различия были не такие контрастные, как в популяции «А» (табл. 2, рис. 1). Для фенотипирования дигаплоидных популяций были использованы изоляты *P. teres* f. *teres* и *C. sativus*, при инокуляции которыми наблюдались контрастные реакции родительских компонентов скрещиваний (табл. 2).

Распределение линий по типам реакции на инокуляцию различными изолятами *P. teres* и *C. sativus* в популяции ДЛ «В» представлено на рис. 1 и 2. Для всех 12 изолятов *P. teres* и 10 из 12 изученных изолятов *C. sativus* наблюдается трансгрессивное расщепление в картирующей популяции: появляется класс линий, более устойчивых, чем устойчивый родитель.

Генотипирование дигаплоидных линий и картирование QTLs. Из 384 протестированных SNP маркеров 108 оказались полиморфными для популяции «А» и 164 для популяции «В». Полиморфные маркеры были использованы для установления гаплотипов рекомбинантного потомства, полученного от скрещивания родительских образцов. По результатам SNP-генотипирования были сконструированы генетические карты для двух популяций дигаплоидных линий «А» и «В», протяженность которых составила 1000 сМ и 992 сМ соответственно. Размеры по-

Таблица 2

Вирулентность изолятов
P. teres f. *teres* и *C. sativus* к родительским
компонентам скрещивания

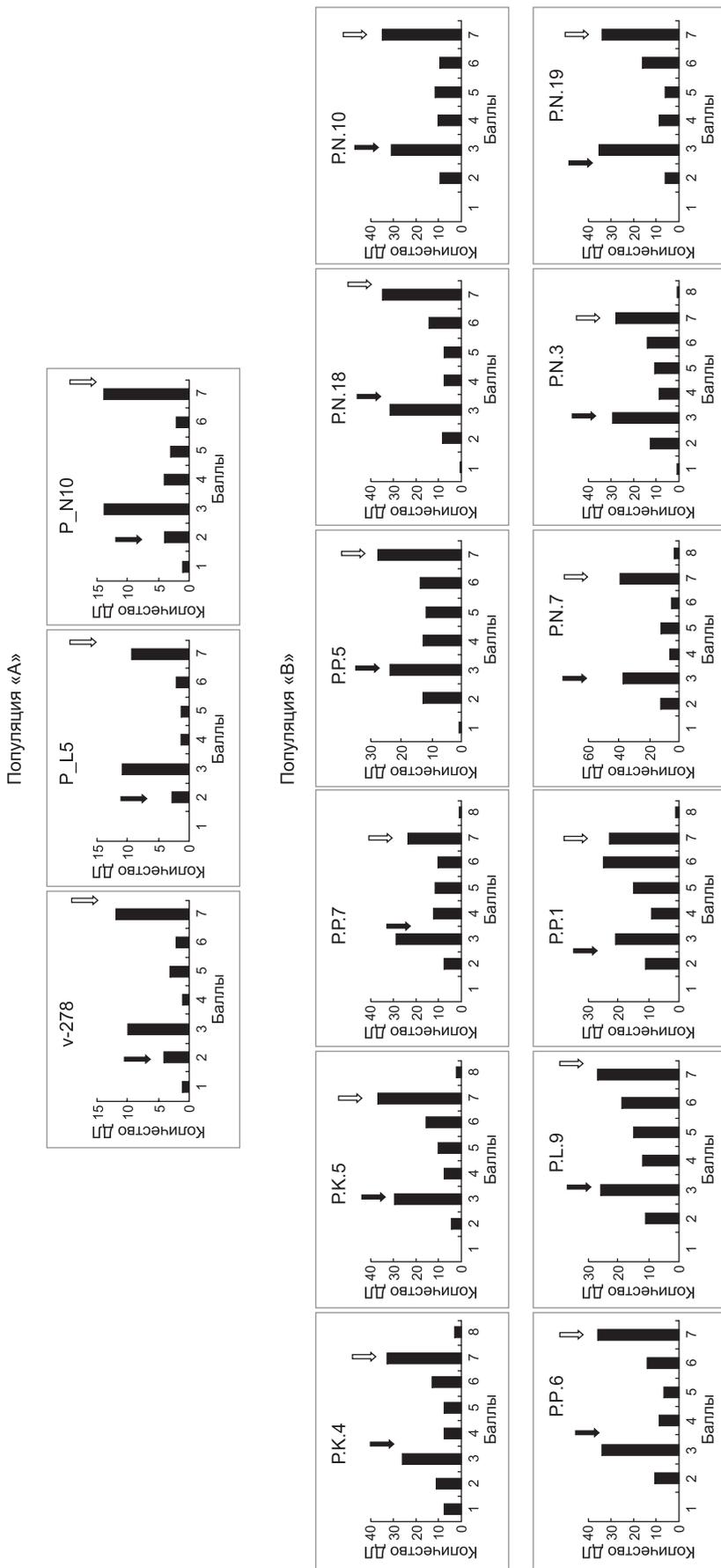
Изолят	Происхождение	Тип реакции сорта, баллы	
		Пиркка	к-23874
Популяция «А»			
<i>Pyrenophora teres</i>			
V_278	Финляндия	8	1–2
P_L5	Ленинградская область	8	1–2
P_N10	Новгородская область	8	1–2
Популяция «В»			
		Зерноградский 813	Ранний 1
<i>Pyrenophora teres</i>			
PL9	Ленинградская область	7,3	3
PN3	Новгородская область	7	3
PN7		7	3
PN10		7	3
PN18		7,3	3,2
PN19		7	2,5
PP1	Псковская область	7	2,5
PP5		7	3
PP6		7	3,5
PP7		7	3,2
PK4	Краснодарский край	7	3,5
PK5		7	3
<i>Cochliobolus sativus</i>			
CL1	Ленинградская область	3	7,2
CL8		3,2	7
CL12		2,5	7
CL18		2	7
CN1	Новгородская область	2	7
CN12		3,6	7
CN18		3	7
CP1	Псковская область	3	7,5
CP2		3	7
CP6		2,5	7
CP8		3	7
CK9	Краснодарский край	3	7,2
C_FIN	Финляндия	2	7

лученных генетических карт сопоставимы с таковыми, полученными ранее для скрещиваний Steptoe/Morex (1035 cM), Morex/Barke (1065 cM) и OWB Dominant/OWB Recessive (1215 cM) на основе генотипирования с использованием BOPA1 и BOPA2 (Close *et al.*, 2009).

При проведении QTL-анализа во внимание принимались только те изоляты, для которых пики QTL достигали порогового значения достоверности ($p = 0,05$), а также были картированы в одной и той же позиции для двух и более независимых биологических повторностей эксперимента (рис. 3).

Картирование генного локуса, детерминирующего высокую устойчивость к *P. teres* f. *teres* в популяции «А». В результате проведенного QTL-анализа для изолята V-278 был выявлен интервал 42–81 cM на хромосоме 6Н, в пределах которого была установлена максимальная ассоциация ($LOD = 3,9$) с картируемым признаком в четырех повторностях эксперимента. Ближайший SNP-маркер (11_11067, позиция 58 cM) на хромосоме 6Н демонстрировал сцепление с устойчивостью ($p < 0,05$, $LOD =$) и к двум другим изолятам *P. teres* f. *teres* (PL5 и PN10). Ранее в том же интервале хромосомы 6Н (75–78 cM) уже был описан локус устойчивости к изолятам *P. teres* f. *teres* (Grewal *et al.*, 2008).

Картирование QTL, контролирующих устойчивость к *P. teres* f. *teres* в популяции «В». QTL, контролирующие устойчивость к 12 изолятам *P. teres* f. *teres* в комбинации скрещивания «В», были идентифицированы на всех 7 хромосомах ячменя (табл. 3). В трех случаях сцепление признака устойчивости в одном и том же интервале между SNP-маркерами было определено более чем к одному изоляту. QTL (ближайший SNP-маркер 11_11189), достоверно сцепленный с устойчивостью к 6 изолятам *P. teres* f. *teres* из Краснодарского края (PK4, PK5), Псковской области (PP7, PP6 и PP5) и Новгородской области (PN18), был локализован в одном и том же интервале на длинном плече хромосомы 1Н (табл. 3). Также было выявлено совпадение позиций QTL, контролирующих устойчивость к изолятам PP1 и PP6 на длинном плече хромосомы 6Н и к изолятам PL9 и PN7 на хромосоме 7Н. Остальные выявленные QTL были изолят-специфичны. Для 5 изолятов (PP6, PP5, PN7, PP7 и PN18) выявлено по



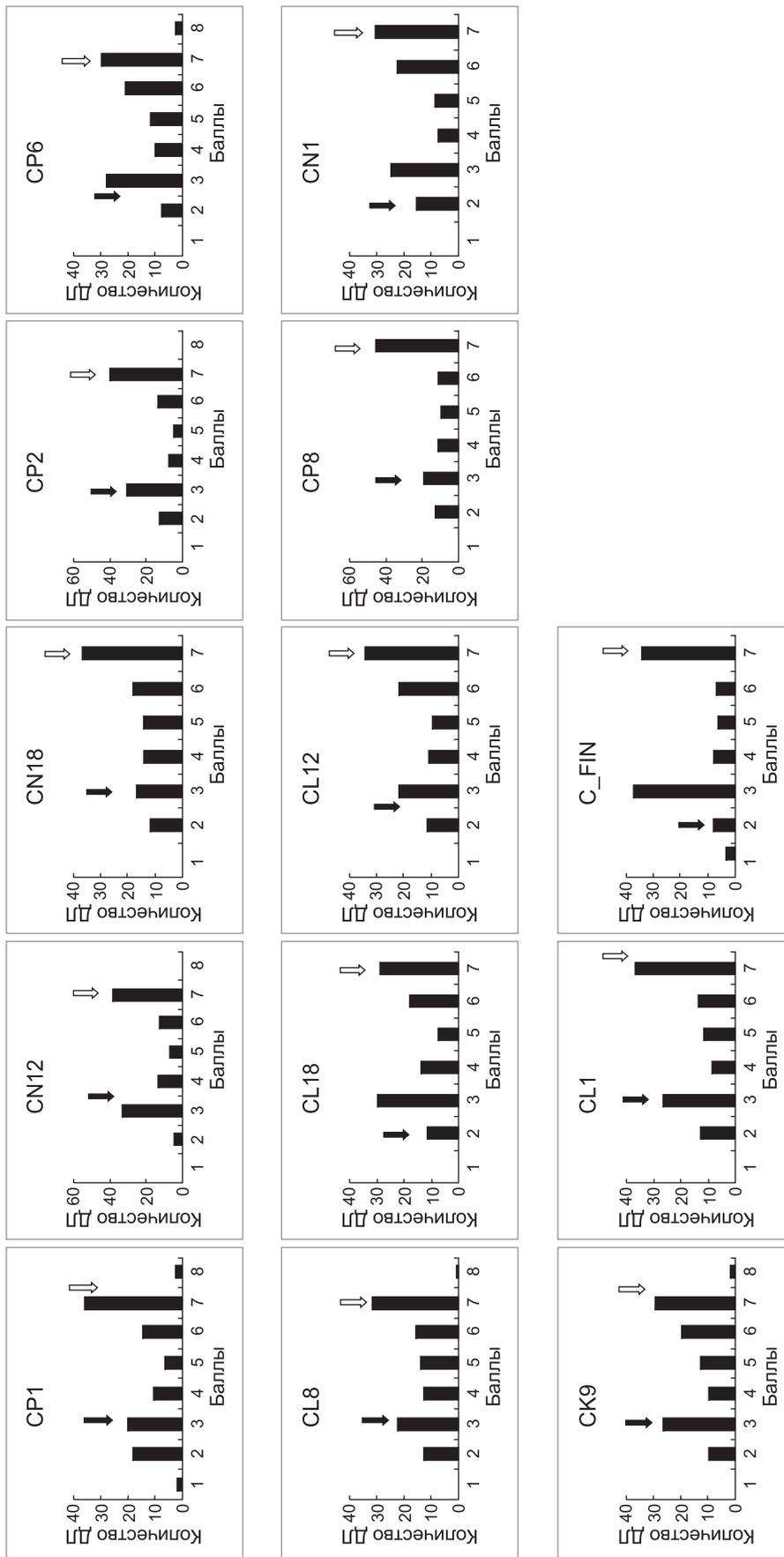


Рис. 2. Распределение дигаллоидных линий в картирующей популяции «В» по типам реакции на инокуляцию различными изолятами *C. sativus*.

Стрелками показаны реакции родительских компонентов: белая – восприимчивый родитель, черная – устойчивый.

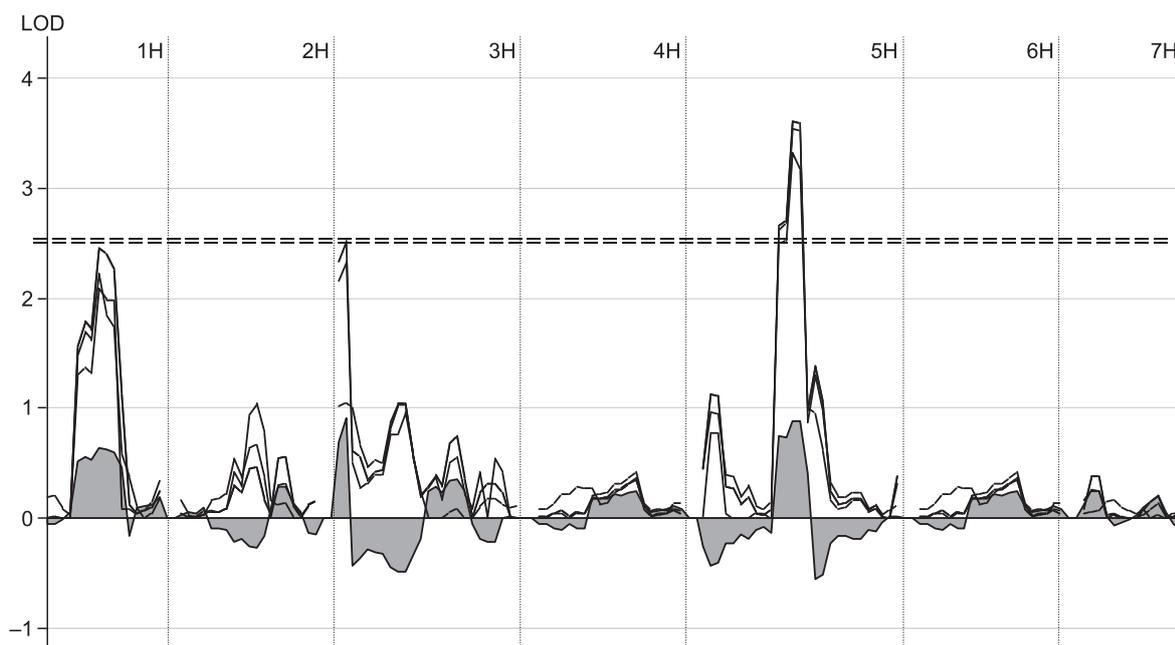


Рис. 3. Картирование QTL, контролирующих реакцию дигаплоидных линий популяции от скрещивания Зерноградский 813/Ранний 1 на заражение изолятом «PN3» *Pyrenophora teres* в четырех повторностях эксперимента.

1Н–7Н – семь хромосом ячменя. Горизонтальная – пороговый уровень достоверности LOD ($p = 0,05$). Сплошная заливка – аддитивный эффект родительских аллелей: выше нуля – более высокий балл по шкале Текауза соответствует родительским аллелям сорта Ранний 1; ниже нуля – более высокий балл соответствует аллелям сорта Зерноградский 813.

2 локуса, контролирующих устойчивость к каждому изоляту. Всего обнаружено 11 QTL, контролирующих устойчивость к 12 изолятам *P. teres f. teres*.

Картирование QTL, контролирующих устойчивость к *C. sativus* в популяции «В». Сцепление SNP-маркеров с признаком устойчивости у ДЛ комбинации «В» к 12 изолятам *C. sativus* было определено на всех хромосомах ячменя, кроме 4Н (табл. 4). Перекрывающиеся интервалы между SNP-маркерами в районе центromеры хромосомы 1Н, ассоциированные с устойчивостью как к изоляту CL 18, так и к изоляту CP 8, по-видимому, свидетельствуют о том, что один и тот же локус детерминирует устойчивость к этим изолятам. Перекрывающиеся интервалы SNP-маркеров, ко-сегрегирующих с устойчивостью к изолятам CN12 и CL1, выявлены на коротком плече хромосомы 2Н, к изолятам CP6 и CN1 – на длинном плече хромосомы 6Н. Одинаковые реакции интактных растений (изолят C_FIN) и отрезков листьев (изолят CN15) позволили выявить один и тот же QTL, контролирующий

устойчивость к этим изолятам, на длинном плече хромосомы 7Н, что свидетельствует о правомочности использования лабораторного метода инокуляции отрезков листьев.

В пяти случаях из двенадцати выявлено по 2 локуса, детерминирующих устойчивость к изолятам гриба. К 7 остальным изолятам *C. sativus* выявлены по одному изолят-специфичному QTL. Таким образом, обнаружено 14 QTL, контролирующих устойчивость к 12 изолятам *C. sativus*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известна высокая гетерогенность популяций *P. teres f. teres* по признаку вирулентности: на сегодняшний день выявлено от 45 до 119 патотипов гриба, в зависимости от числа использованных сортов-дифференциаторов (Khan, Tekauz, 1982; Steffenson, Webster, 1992; Serenius, 2006; Afanasenko *et al.*, 2009). В популяциях более широко специализированного патогена *C. sativus* также выявлены различные патотипы:

Таблица 3

QTL, ассоциированные с устойчивостью к изолятам *P. teres f. teres*, картированные в дигаплоидной популяции «В», полученной от скрещивания сортов Зерноградский 813 и Ранний 1

Хромосома	Изолят	Число повторностей	Интервал между SNP-маркерами, сМ	Ближайший SNP-маркер	LOD	R ²	Ранее выявленные QTL (сМ). Литературный источник
1Н	PK4	3	75–79	11_11189	3,9	0,13	Новый
	PP7	2			3,3	0,14	
	PN18	2			4,6	0,18	
	PP5	4			5,0	0,20	
	PP6	4	50–86	11_11189	4,0	0,15	(52,4–56,8 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2012
	PK5	3			3,0	0,17	
		PP5	4	96–107	11_20844	6,5	0,20
2Н	PN10	2	51–75	11_10909	3,0	0,13	(50–51 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2008; (62,7 сМ) Cakir <i>et al.</i> , 2011; (75–79 сМ) König <i>et al.</i> , 2014
3Н	PL9	4	112–150	11_20920	3,1	0,08	(115–119 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2008
4Н	PN19	2	52–59	11_11207	2,7	0,10	(50–54 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2008
	PK5	3	3–16	11_11345	2,8	0,11	Новый
5Н	PP7	3	108–163	11_10845	3,4	0,12	(109 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2008 (112,1–120,5 сМ) Grewal <i>et al.</i> , 2012 (125–129 сМ) König <i>et al.</i> , 2014
	PN3	4	56–92	11_21480	3,6	0,09	Новый
6Н	PP1	4	94–126	11_20531	3,0	0,21	(95,1–96,8 сМ) (60–65 сМ) König <i>et al.</i> , 2014
	PP6	4			3,3	0,17	
7Н	PL9	3	61–75	11_11098	4,0	0,11	

Примечание. R² – % вариации признака, ассоциированного с QTL.

из 36 изученных изолятов Северной Дакоты (США) на трех сортах-дифференциаторах выявлено 3 патотипа (Valjevec-Gratian, Steffenson, 1997); изучение 34 австралийских изолятов на 20 дифференциаторах позволило выявить 6 патотипов (Meldrum *et al.*, 2004). Гетерогенность популяций патогенов по признаку вирулентности являлась обоснованием использования нескольких изолятов для выявления генетических детерминант устойчивости.

Широкий сортимент возделываемых ячменей, быстрая ротация сортов на сортоучастках и привнесение инокулюма с непротравленными семенами от оригинаторов сортов из различных регионов России и из-за рубежа способствуют формированию высокогетерогенных популяций возбудителей. В связи с этим сбор инокулюма

для создания коллекции изолятов патогенов осуществлялся на сортоучастках Северо-Западного региона РФ и Краснодарского края.

Всего в мире для картирования генов устойчивости ячменя к болезням создано более 20 дигаплоидных популяций (Manninen *et al.*, 2006; Grewal *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2010; Cakir *et al.*, 2003), из них 14 – в Австралии (Cakir *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2010; Hickey *et al.*, 2011). Преимущество использования дигаплоидных картирующих популяций по сравнению с гибридными расщепляющимися популяциями для картирования QTL состоит в гомозиготности изучаемых признаков и в возможности неограниченного числа повторений экспериментов по определению устойчивости как к одному, так и к нескольким изолятам патогена.

Таблица 4

QTL устойчивости к изолятам *C. sativus*, картированные в дигиплоидной популяции «В», полученной от скрещивания сортов Зерноградский 813 и Ранний 1

Хромосома	Изолят	Число повторностей	Интервал между SNP-маркерами, сМ	Ближайший SNP-маркер	LOD	R ²	Ранее выявленный QTL (сМ). Литературный источник
1Н	CL18	4	57–96	11_10433	3,5	0,13	(90,7 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010
	CP8	4	40–60	11_10764	4,1	0,16	(59,7 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010; (41,0 сМ) Zhou <i>et al.</i> , 2013; (50 сМ, 45,5 сМ, 49,7 сМ) Gutierrez <i>et al.</i> , 2013
2Н	CK9	4	7–21	11_21377	3,5	0,15	(7,8 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010
	CL1	4	21–45	11_21261	5,5	0,18	Новый
	CN12	3	59–70	11_11015	3,0	0,11	Новый
	CL1	4			3,5	0,20	
3Н	CL8	3	75–122	11_10312	3,2	0,14	Новый
	CN1	4	59–86	11_20628	2,5	0,17	(66,2 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010
5Н	CL12	4	80–92	11_20850	3,3	0,13	Новый
	CP2	3			3,0	0,19	
	CL18	4	149–181	11_11216	2,7	0,13	(105,9 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010 (151,4 сМ) Gutierrez <i>et al.</i> , 2013
	CP8	4	57–92	11_21480	3,3	0,18	(82,9 сМ) Roy <i>et al.</i> , 2010 (80,6 сМ) Gutierrez <i>et al.</i> , 2013
6Н	CP6	4	87–119	11_20531	3,5	0,15	Новый
	CN1	4			3,5	0,19	
7Н	CP1	4	64–76	11_10153	3,6	0,12	Новый
	C_FIN	4	14–58	11_10920	5,0	0,16	(31,7 сМ) Zhou <i>et al.</i> , 2013
	CN15	4			4,4	0,11	(151,4 сМ) Gutierrez <i>et al.</i> , 2013; Roy <i>et al.</i> , 2010
	CK9	4	76–120	11_21229	3,0	0,22	Новый

Нами инициирована работа по созданию дигиплоидных картирующих популяций ячменя с целью картирования QTL и «главных» (major) генов, контролирующих устойчивость к возбудителям «гельминтоспориозных» пятнистостей. В данной работе представлены результаты по картированию признака устойчивости ячменя к возбудителям сетчатой и темно-бурой пятнистостей в двух дигиплоидных популяциях.

Для оценки реакции дигиплоидных линий на инокуляцию изолятами возбудителей сетчатой и темно-бурой пятнистостей были использованы методы инокуляции интактных растений в теплице и отрезков листьев, метаболизм которых поддерживался раствором бензимидазола.

Обнаружены одни и те же локусы, контролирующие устойчивость как интактных растений, так и отрезков листьев к трем изолятам *P. teres f. teres* и к двум изолятам *C. sativus*, что свидетельствует о возможности использования менее трудоемкого лабораторного метода в такого рода исследованиях. Метод инокуляции отсеченных листьев при картировании локусов устойчивости к *P. teres f. teres* был также использован в работе König с соавт. (2014).

В популяции «А» родительскими компонентами скрещивания являлись эфиопский образец к-23874, отличающийся высокой устойчивостью к большинству изолятов *P. teres f. teres* (тип реакции 1–2 балла), и универсально восприимчивый

финский сорт Пиркка. Качественное различие в реакции родителей позволило выявить «главный» ген в районе центромеры короткого плеча хромосомы 6Н. SNP-маркер 11_11067 (позиция 58 сМ) продемонстрировал сцепление с признаком устойчивости к изоляту V-278 *P. teres f. teres* во всех четырех повторностях эксперимента, а также к двум другим изолятам гриба.

Ранее на этом участке хромосомы 6Н уже был локализован ген, детерминирующий устойчивость к *P. teres f. teres* (Grewal *et al.*, 2008). Также в районе центромеры хромосомы 6Н у эфиопского образца CI 9819 был идентифицирован высокоэффективный ген устойчивости к сетчатой пятнистости *Rpt5* (Manninen *et al.*, 2006). В работах других исследователей на этом же участке хромосомы 6Н был локализован ген, детерминирующий устойчивость к *P. teres f. teres* у сортов Steptoe (Steffenson *et al.*, 1996), TR306 (Spaner *et al.*, 1998), Kaputar (Cakir *et al.*, 2003), Chevron (Ma *et al.*, 2004), ND11231*12 (Emebiri *et al.*, 2005) и Pompadour (Gupta *et al.*, 2010). Многие авторы склоняются к мнению, что в этом районе хромосомы 6Н имеется кластер из нескольких генов устойчивости к *P. teres f. teres* или речь идет о множественном аллелизме одного гена (Manninen *et al.*, 2006; Abu-Qamar *et al.*, 2008; Gupta *et al.*, 2011). Кроме того, в районе центромеры хромосомы ячменя 6Н определены также: QTL *Rphq3*, контролирующий устойчивость к *Puccinia hordei* (Marcel *et al.*, 2007), QTL *Triton^RRrs6H₂₇₁* – к *Rhynchosporium secalis* (Wagner *et al.*, 2008), *rym15* – к вирусам VaMMV/VaYMV (Le Gouis *et al.*, 2004). Кластеризация и множественный аллелизм генов устойчивости как к облигатным, так и гемибитрофным паразитам, являются распространенными явлениями, обусловленными внутри- или межмолекулярными обменами участков ДНК, имеющих прямые или инвертированные повторяющиеся последовательности, способствующие неравному кроссинговеру; дупликацию и последующие мутационные изменения предкового гена в процессе коэволюции хозяина и патогена (Дьяков и др., 2001).

Родители дигиплоидной популяции «В» отличались по устойчивости к двум возбудителям. Сорт Ранний 1 характеризовался ювенильной устойчивостью – к *P. teres f. teres*, сорт Зерноградский 813 – к *C. sativus*. При этом различия в типах реакции родителей к каждому патогену

были не столь значительны, как в популяции «А». Наличие изолятов *P. teres f. teres*, авирулентных к обоим сортам, свидетельствует о том, что сорт Зерноградский 813 также обладает определенной специфической устойчивостью к патогену. Это, по-видимому, является причиной трансгрессивного расщепления в дигиплоидной популяции «В», выявленного к большинству исследованных изолятов *P. teres f. teres*. Для обоих патогенов была показана изолят-специфичность выявленных QTL. Всего обнаружено 11 QTL, контролирующих устойчивость к 12 изолятам *P. teres f. teres* на всех хромосомах ячменя, и 14 QTL – к 12 изолятам *C. sativus*, на всех хромосомах, кроме 4Н.

Новизна идентифицированных для ячменя QTL определялась в соответствии с опубликованными данными по QTL устойчивости к сетчатой и темно-бурой пятнистостям. Как видно из табл. 3 и 4, большинство выявленных локусов находятся в интервале, в котором уже были обнаружены QTL, контролирующие устойчивость к *P. teres f. teres* и *C. sativus*. В дигиплоидной популяции «В» выявлено 4 новых изолят-специфичных QTL, контролирующих устойчивость к *P. teres f. teres*: на хромосоме 1Н в интервале 75–79 сМ и 96–107 сМ, на хромосоме 4Н в интервале 3–16 сМ и на хромосоме 5Н в интервале 56–92 сМ (табл. 3). Новые QTL, ассоциированные с устойчивостью к *C. sativus*, были выявлены на хромосомах 2Н в интервалах 21–45 сМ и 59–70 сМ; 3Н – 75–122 сМ; 5Н – 80–92 сМ и 6Н – 87–119 сМ (табл. 4).

Изолят-специфичность «минорных» генов устойчивости ячменя к *P. teres* была показана ранее (Ho *et al.*, 1996; Афанасенко и др., 1999; Manninen *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2010). По-видимому, характер взаимоотношений в патосистеме «хозяин с частичной (неполной) устойчивостью–патоген» определяется по типу «малый ген–на–малый ген». К такому же выводу пришли исследователи, изучавшие локализацию генетических детерминант устойчивости ячменя к близкородственному виду *Pyrenophora graminea* (Argu *et al.*, 2003).

Во всех исследованных патосистемах число выявленных QTL значительно превышает число «главных» генов устойчивости. Известны только два гена, детерминирующие высокую устойчивость к возбудителю темно-бурой пятни-

стости: *Rcs5*, локализованный на хромосоме 7Н (Steffenson *et al.*, 1996) и *QRcs1* – на хромосоме 1Н (Grewal *et al.*, 2012) и 12 QTL на всех хромосомах ячменя кроме 4Н и 6Н (Roy *et al.*, 2010; Grewal *et al.*, 2012). Использование в селекционной работе молекулярных маркеров генетических детерминант устойчивости значительно упростит процедуру объединения нескольких генов и QTL в одном генотипе растения. В этой связи особенно важным становится выявление наиболее полезных для селекции комбинаций генов устойчивости как к различным расам одного патогена, так и к разным видам возбудителей. Имеются примеры проявления эпистаза при объединении некоторых локусов, контролирующих устойчивость, в том числе и к *P. teres* f. *teres* (Gupta *et al.*, 2010). С другой стороны, нами выявлены комбинации генов устойчивости, к которым в природных популяциях возбудителя сетчатой пятнистости отсутствуют изоляты с соответствующей комбинацией комплементарных генов вирулентности (Афанасенко, Новожилов, 2009).

Наличие в лаборатории иммунитета растений к болезням ВИЗР источников и доноров устойчивости ячменя к «гельминтоспориозным» пятнистостям, охарактеризованных по эффективности в различных агроклиматических условиях, открывает перспективу для создания дигаплоидных популяций и выявления генетического разнообразия устойчивости путем картирования генов. Исследования в этом направлении будут способствовать не только реализации генетического потенциала устойчивости для защиты сельскохозяйственных культур от болезней, но и накоплению фундаментальных знаний по структурной и функциональной организации генетических детерминант устойчивости растений к болезням.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 14-04-00400 и № 12-04-01161.

ЛИТЕРАТУРА

- Афанасенко О.С. Лабораторный метод оценки устойчивости сортообразцов ячменя к возбудителю сетчатого гельминтоспориоза // С.-х. биология. 1977. Т. 12. № 2. С. 297–299.
- Афанасенко О.С., Зубкович А.А., Макарова И.Г. Генетический контроль устойчивости образцов ячменя к штаммам *Pyrenophora teres* Drechs. // Генетика. 1999. Т. 35. № 3. С. 336–340.
- Афанасенко О.С., Левитин М.М. Структура популяций возбудителя сетчатой пятнистости ячменя по признаку вирулентности. I. Идентификация рас // Микол. и фитопатология. 1979. Т. 13. Вып. 3. С. 230–234.
- Афанасенко О.С., Мироненко Н.В., Анисимова А.В., Лашина Н.М., Радюкевич Т.Н., Лоскутов И.Г., Новожилов К.В. Методологическое обеспечение селекции ячменя на устойчивость к пятнистостям листьев // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. 2010. С. 217–228.
- Афанасенко О.С., Новожилов К.В. Проблемы рационального использования генетических ресурсов устойчивости растений к болезням // Экол. генетика. 2009. Т. 7. № 2. С. 38–43.
- Васильев А.В., Беспалова Л.А. Первые шаги по применению маркер-опосредованного отбора в селекции сортов пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // XI Молодежная конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». 2011. С. 19–20.
- Гульязева Е.И., Волкова Г.В. Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине у сортов пшеницы с использованием молекулярных маркеров // Вестн. защиты растений. 2009. № 3. С. 32–36.
- Гульязева Е.И., Канюка И.А., Алпатьева Н.В., Баранова О.А., Дмитриев А.П., Павлюшин В.А. Молекулярные подходы в идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у российских сортов пшеницы // Докл. РАСХН. 2009. № 5. С. 23–26.
- Дьяков Ю.Т., Озерецковская О.Л., Джавахия В.Г., Багирова С.Ф. Общая и молекулярная фитопатология. М.: Об-во фитопатологов, 2001. 302 с.
- Крупин П.Ю. Молекулярно-цитогенетическая характеристика коллекции промежуточных пшенично-пырейных гибридов: Автореф. ... канд. наук. М.: Всерос. науч.-исслед. ин-т сельскохоз. биотехнологии РАСХН, 2011. 18 с.
- Лапочкина И.Ф., Гайнуллин Н.Р., Дженин С.В., Руденко М.И., Макарова И.Ю., Иорданская И.В., Кызласов В.Г., Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И. Использование молекулярных маркеров в передаче эффективных генов устойчивости от новых доноров в сорта мягкой пшеницы // Матер. конф. РАСХН-РФФИ. 2009. С. 70–73.
- Михайлова Л.А., Афанасенко О.С. Применение отсеченных листьев в исследованиях устойчивости злаков к болезням // Микология и фитопатология. 2005. № 6. С. 100–112.
- Тырышкин Л.Г., Гульязева Е.И., Алпатьева Н.В. Идентификация эффективных генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* к бурой ржавчине с помощью STS маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 812–817.
- Afanasenko O., Jalli M., Pinnschmidt H., Filatova O., Platz G. Development of an international standard set of barley differential genotypes for *Pyrenophora teres* f. *teres* // Plant Pathol. 2009. V. 58. P. 665–676.
- Abu Qamar M., Liu Z.H., Faris J.D., Chao S., Edwards M.C.,

- Lai Z., Franckowiak J.D., Friesen T.L. A region of barley chromosome 6H harbors multiple major genes associated with net type net blotch resistance // *Theor. Appl. Genet.* 2008. V. 117. No. 8. P. 1261–1270.
- Arru L., Francia E., Pecchioni N. Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the Steptoe × Morex spring barley cross // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 106. P. 668–675.
- Cakir M., Gupta S., Li C., Hayden M., Mather D.E., Ablett G.A., Platz G.J., Broughton S., Chalmers K.J., Loughman R., Jones M.G.K., Lance R.C.M. Genetic mapping and QTL analysis of disease resistance traits in the barley population Baudin × AC Metcalfe // *Crop and Pasture Science.* 2011. V. 62. No. 2. P. 152–161.
- Cakir M., Gupta S., Platz G.J., Ablett G.A., Loughman R., Embiri L.C., Poulsen D., Li C.D., Lance R.C.M., Galwey N.W., Jones M.G.K., Appels R. Mapping and validation of the genes for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Aust. J. Agric. Res.* 2003. V. 54. P. 1369–1377.
- Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Druka A., Stein N., Svensson J.T., Wanamaker S., Bozdog S., Roose M.L., Moscou M.J., Chao S., Varshney R.K., Szücs P., Sato K., Hayes P.M., Matthews D.E., Kleinhofs A., Muehlbauer G.J., DeYoung J., Marshall D.F., Madishetty K., Fenton R.D., Condamine P., Graner A., Waugh R. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley // *BMC Genomics.* 2009. V. 10. P. 582.
- Emebiri L.C., Platz G., Moody D.B. Disease resistance genes in a doubled haploid population of two-rowed barley segregating for malting quality attributes // *Aust. J. Agric. Res.* 2005. V. 56 (1). P. 49–56.
- Fetch T.G.J., Steffenson B.J. Rating scales for assessing infection responses of barley infected with *Cochliobolus sativus* // *Plant Disease.* 1999. V. 83. P. 213–217.
- Grewal T.S., Rosnagel B.G., Pozniak C.J., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance // *Theor. Appl. Genet.* 2008. V. 116. P. 529–539.
- Grewal T.S., Rosnagel B.G., Scoles G.J. Validation of molecular markers associated with net blotch resistance and their utilization in barley breeding // *Crop Sci.* 2010. V. 50. P. 177–184.
- Grewal T.S., Rosnagel B.G., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with spot blotch and net blotch resistance in a doubled-haploid barley population // *Mol. Breed.* 2012. V. 30. P. 267–279.
- Gupta S., Li C.D., Loughman R., Cakir M., Platz G., Westcott S., Bradley J., Broughton S., Lance R. Quantitative trait loci and epistatic interactions in barley conferring resistance to net type net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) isolates // *Plant Breed.* 2010. V. 4. P. 268–362.
- Gupta S., Li C., Loughman R., Cakir M., Westcott S., Lance R. Identifying genetic complexity of 6H locus in barley conferring resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* // *Plant Breed.* 2011. V. 130. P. 423–429.
- Gutiérrez L., Berberian N., Capetini F. *et al.* Genome-wide association mapping identifies disease-resistance QTLs in barley germplasm from Latin America // *Advance in Barley Sciences. Proc. of 11th Intern. Barley Genet. Symp.* 2013. P. 209–215.
- Hickey L.H., Lawson W., Platz G.J., Dieters M., Arief V.N., Germán S., Fletcher S., Park R.F., Singh D., Pereyra S., Franckowiak J. Mapping Rph20: A gene conferring adult plant resistance to *Puccinia hordei* in barley // *Theor. Appl. Genet.* 2011. V. 123. P. 1–25.
- Ho K.M., Tekauz A., Choo T.M., Martin R.A. Genetic studies on net blotch resistance in barley cross // *Can. J. Plant Sci.* 1996. V. 76. P. 715–719.
- Khan T.N., Tekauz A. Occurrence and pathogenicity of *Drechslera teres* isolates causing spot type symptoms on barley in Western Australia // *Plant Dis.* 1982. V. 66. P. 423–425.
- Kosambi D.D. The estimation of map distances from recombination values // *Ann. Eu-gen.* 1944. V. 12. P. 172–175.
- König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. Mapping seedling resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in barley using detached leaf assay // *Plant Breed.* 2014. V. 133. 3. P. 356–365.
- Lander E., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M., Lincoln S., Newburg L. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations // *Genomics.* 1987. No. 1. P. 174–181.
- Le Gouis J., Devaux P., Werner K., Hariri D., Bahrman N., Beghin D., Ordon F. Rym15 from the Japanese cultivar Chikurin Ibaraki 1 is a new barley mild mosaic virus (BaMMV) resistance gene mapped on chromosome 6H // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 108. No. 8. P. 1521–1525.
- Ma Z.Q., Lapitan N.L.V., Steffenson B. QTL mapping of net blotch resistance genes in a doubled-haploid population of six-rowed barley // *Euphytica.* 2004. V. 137. P. 291–296.
- Manninen O. Optimizing anther culture for barley breeding // *Agr. Food Sci. Finland.* 1997. V. 6. P. 389–398.
- Manninen O.M., Jalli M., Kalendar R., Schulman A., Afanassenko O., Robinson J. Mapping of major spot-type and net-type net blotch resistance genes in the Ethiopian barley (*Hordeum vulgare*) line CI 9819 // *Genome.* 2006. V. 49. P. 1564–1571.
- Marcel T., Aghnoum R., Durand J., Varshney R.K., Niks R.E. Dissection of the barley 2L1.0 region carrying the ‘Laevigatum’ quantitative resistance gene to leaf rust using near-isogenic lines (NIL) and subNIL // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007. V. 20. No. 12. P. 1604–1615.
- Meldrum S.I., Platz G., Ogle H.J. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia // *Aust. Plant Pathol.* 2004. V. 33. P. 109–114.
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* 1962. V. 15. No. 3. P. 473–497.
- Raman H., Venkatanagappa S., Rehman A., Rehman A., O’Bree B., Read B. Graphical genotyping of barley using molecular markers linked with malting quality, disease resistance and aluminium tolerance // *Barley Tech. Cereal Chem.* 2003. P. 246–249.
- Rostoks N., Ramsay L., MacKenzie K., Cardle L., Bhat P.R., Roose M.L., Svensson J.T., Stein N., Varshney R.K., Marshall D.F., Graner A., Clos T.J., Waugh R. Recent history of artificial outcrossing facilitates whole-genome association mapping in elite inbred crop varieties // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 18656–18661.

- Roy J.K., Smith K.P., Muehlbauer G.J., Chao S., Close T.J., Steffenson B.J. Associating mapping of spot blotch resistance in wild barley // *Mol. Breed.* 2010. V. 26. P. 243–256.
- Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgenson R.A., Jorgenson R.A., Allard R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 8014–8018.
- Serenius M. Population structure of *Pyrenophora teres* the causal agent of net blotch of barley // *Agrifood Res. Rep.* 2006. V. 78. 60 p.
- Spaner D.S.L., Falak T.M., Choo I., Legge K.G., Briggs W.G., Falk D.E., Ullrich S.E., Tinker N.A., Steffenson B.J., Mather D.E. Mapping of disease resistance loci in barley on the basis of visual assessment of naturally occurring symptoms // *Crop Sci.* 1998. V. 38. P. 843–850.
- Steffenson B.J., Webster R.K. Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley // *Phytopathology.* 1992. V. 82. P. 170–177.
- Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 552–558.
- Tekauz A. A numerical scale to classify reactions of barley to *Pyrenophora teres* // *Can. J. Plant Pathol.* 1985. V. 7. P. 181–183.
- Tuohy J.M., Jalli M., Cooke B.M., Sullivan E.O. Pathogenic variation in populations *Dreschlera teres* f. *teres* and *D. teres* f. *maculata* and differences in host cultivar responses // *Eur. J. Plant Pathol.* 2006. V. 116. No. 3. P. 177–185.
- Valjavec-Gratian M., Steffenson B.J. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota // *Plant Dis.* 1997. V. 81. P. 1275–1278.
- Wagner C., Schweizer G., Kramer M., Dhmer-Badani A.G., Ordon F., Friedt W. The complex quantitative barley – *Rhynchosporium secalis* interaction: newly identified QTL may represent already known resistance genes // *Theor. Appl. Genet.* 2008. V. 118. P. 113–122.
- Zhou H., Steffenson B.J. Association mapping of septoria speckled leaf blotch resistance in US barley breeding germplasm // *Phytopathology.* 2013. V. 103. P. 600–609.

MAPPING OF THE LOCI CONTROLLING THE RESISTANCE TO *PYRENOPHORA TERES* F. *TERES* AND *COCHLIOBOLUS SATIVUS* IN TWO DOUBLE HAPLOID BARLEY POPULATIONS

O.S. Afanasenko¹, A.V. Koziakov¹, P. Hedlay², N.M. Lashina¹,
A.V. Anisimova¹, O. Manninen³, M. Jalli⁴, E.K. Potokina⁵

¹ All-Russia Research Institute for Plant Protection, Saint Petersburg, Russia,
e-mail: olga.s.afan@gmail.com;

² The James Hutton Institute, Dundee, Scotland UK;

³ Boreal, Jokioinen, Finland;

⁴ MTT Agrifood Research Finland, Jokioinen;

⁵ Vavilov Institute of Plant Industry (VIR), St. Petersburg, Russia

Summary

Net blotch of barley (*Hordeum vulgare* L.), caused by *Pyrenophora teres* f. *teres*, and spot blotch, caused by *Cochliobolus sativus*, are the most widespread and harmful diseases in the geographic range of the crop. Barley breeding for resistance to these diseases should employ a large genetic diversity. The 11_11067 SNP marker was revealed on chromosome 6H position 58 cM in double haploid (DH) population A developed by crossing of the Ethiopian accession c-23874, highly resistant to *P. teres* f. *teres*, to the susceptible Pirkka cultivar. It was reliably ($p < 0.05$) associated with resistance to three *P. teres* f. *teres* isolates. In population B (Zernogradsky 813 (MR to *C. sativus*) × Ranniy 1 (MR to *P. teres* f. *teres*), 11 QTLs controlling resistance to 12 *P. teres* f. *teres* isolates were found on all barley chromosomes and 14 QTLs for resistance to 12 *C. sativus* isolates, on all chromosomes except for 4H. For both pathogens, the revealed QTLs were shown to be isolate-specific. The majority of the loci detected were mapped in the same intervals between SNP markers where QTLs controlling resistance to *P. teres* f. *teres* and *C. sativus* had been found by other scientists. Four novel QTLs controlling resistance to *P. teres* f. *teres* were found on chromosomes 1H, 4H, and 5H. Five novel QTLs associated with resistance to *C. sativus* were found on chromosomes 2H, 3H, 5H, and 6H in DH population B.

Key words: barley, disease resistance, double haploid populations, QTL mapping, SNP markers, *Pyrenophora teres* f. *teres*, *Cochliobolus sativus*, molecular markers.

УДК 577.214.625:615.371:602.6:581:004.65

ПРОМОТОРЫ ГЕНОВ РАСТЕНИЙ, УЧАСТВУЮЩИХ В ЗАЩИТЕ ОТ ПАТОГЕНОВ

© 2014 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;

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 1 сентября 2014 г. Принята к публикации 17 октября г.

Генные сети, контролирующие устойчивость растений к различным фитопатогенам, весьма сложны, в них могут принимать участие сотни генов. Инфекция вызывает существенные изменения на молекулярно-генетическом, биохимическом, физиологическом и морфологическом уровнях как локально, в месте инвазии, так и системно. Реконструкция генных сетей, отвечающих за защиту растений от патогенных бактерий, грибов и вирусов, необходима для выявления задействованных молекулярных механизмов, а также для разработки новых способов повышения устойчивости хозяйственно ценных растений. Транскрипционная активность генов, участвующих в защите от фитопатогенов, обычно возрастает в ответ на инфекцию, поэтому характеристика их промоторов является важным источником информации для выявления транскрипционных факторов, контролирующих их работу, и для поиска новых генов, участвующих в ответе на инфекцию. Данные о промоторах необходимы для создания устойчивых к фитопатогенам растений методами генной инженерии. В статье представлены данные о промоторах патоген-чувствительных генов с экспериментально проверенным паттерном экспрессии, аннотированных в базе TGP (TransGene Promoters). База TGP может быть использована в качестве источника информации для интерпретации транскриптомных данных и при планировании генно-инженерных экспериментов, направленных на повышение устойчивости растений к патогенам различного происхождения.

Ключевые слова: промотор, патоген, трансгенные растения, базы данных.

ВВЕДЕНИЕ

Инвазия патогена вызывает сложный многоуровневый комплекс защитных реакций, направленных на индукцию синтеза защитных белков, изоляцию патогена в месте проникновения с помощью программируемой клеточной смерти пораженных клеток, синтез вторичных метаболитов с защитными свойствами, индукцию РНК-интерференции (в случае вирусной инфекции) и т. д. В контроле защитных реакций важное значение имеет регуляция экспрессии генов на уровне транскрипции, что привлекает большое внимание к исследованию особенностей организации их промоторов, поскольку

структура промотора определяет, в каких клетках, на какой стадии развития и при каких воздействиях будет синтезироваться соответствующая мРНК.

Многие растения наряду с реакцией на химические вещества, продуцируемые патогенами, отвечают и на сопутствующее повреждение тканей, связанное с проникновением патогенов через раневые поверхности. В ответ на инфекцию изменяются уровни некоторых гормонов, регулирующих синтез защитных белков, поэтому направленное изменение в содержании таких гормонов рассматривается как один из вариантов стратегии повышения устойчивости. Например, салициловая кислота играет важ-

ную роль в ингибировании распространения PVY (Potato virus Y) в тканях паренхимы у картофеля. Отсутствие этого гормона ведет к задержке активации генов, участвующих в защитном ответе (Baebler *et al.*, 2014). Действие салициловой кислоты приводит к повышению активности семейств PR (pathogenesis-related) генов, за исключением PR10 у лекарственного растения *Withania somnifera* L., и повышенному накоплению у него вторичных метаболитов витанолидов, обладающих противоопухолевым и бактериостатическим действием (Ghosh Dasgupta *et al.*, 2014). Фитопатогены вызывают нарушение уровня гормонального баланса у растений, перестраивая работу транскриптома хозяина в выгодном для себя направлении. Поскольку в настоящее время достигнут значительный прогресс в понимании сигнальных путей гормональной регуляции у растений, появилась возможность использовать патоген-чувствительные промоторы для индукции гормон-зависимого иммунного ответа. Использование в генетической инженерии таких промоторов может быть одним из способов для снижения вирулентности некоторых фитопатогенов (Grant *et al.*, 2013).

Был проведен систематический поиск промоторов *Arabidopsis thaliana* L., транскрипционная активность которых изменялась при инвазии патогена, поскольку соответствующие гены и кодируемые ими белки могут быть задействованы в механизмах устойчивости. Для идентификации патоген-зависимых промоторов и изучения сайтов связывания соответствующих транскрипционных факторов была использована культура протопластов петрушки (Koschmann *et al.*, 2012). Функциональность многих идентифицированных *cis*-элементов, чувствительных к элиситору, была в дальнейшем подтверждена в экспериментах с растениями другого вида – *Nicotiana benthamiana*. На примере этой работы можно видеть успешность интеграции биоинформационных ресурсов для предсказания сайтов связывания регуляторных факторов и экспериментального анализа активности промоторов для изучения взаимодействия растений и патогенов. Серия промоторов, чувствительных к различным элиситорам в протопластах петрушки, представлена в базе TGP (Smirnova *et al.*, 2012). Создан новый веб-инструмент PathoPlant

для оценки иерархии чувствительности генов *A. thaliana* к биотическим и абиотическим стрессам на основе присутствия специфических *cis*-регуляторных последовательностей в промоторах их генов (Bolívar *et al.*, 2014).

β -1,3-глюконазы входят в семейство белков PR2 и играют важную роль в защите растений от патогенов. Промоторы генов этих белков часто проявляют чувствительность к патогенам. Использование глюконаз в качестве трансгенов как самостоятельно, так и в комбинации с хитиназами, пероксидазами, рибонуклеазами и другими защитными белками является перспективной стратегией для создания устойчивых растений с помощью методов генной инженерии и молекулярной генетики (Trifonova *et al.*, 2007; Balasubramanian *et al.*, 2012; Filipenko *et al.*, 2013). В целом инженерия защиты растений требует применения промоторов с хорошо охарактеризованным паттерном транскрипционной активности, индуцируемых при инвазии патогена и/или поранении тканей, для целевой экспрессии генов, белковые продукты которых усиливают защитные механизмы. В данной статье представлен обзор промоторов растений, аннотированных в базе TGP, которые могут быть использованы в генетической инженерии для получения устойчивых форм и сортов хозяйственно ценных видов растений. Приведены примеры целевого использования промоторов для повышения сопротивляемости таких трансгенных растений к патогенам.

ИНФОРМАЦИЯ О ПРОМОТОРАХ, ПРЕДСТАВЛЕННАЯ В БАЗЕ TGP

База TGP накапливает информацию о конститутивных, тканеспецифичных и индуцибельных промоторах, активность которых была охарактеризована в трансгенных растениях (Smirnova *et al.*, 2012). В базе содержится информация о размере промотора, его нуклеотидной последовательности, паттерне транскрипции и регуляторах, влияющих на активность промотора. В базе TGP представлены промоторы и делеционные варианты промоторов более чем 30 генов растений, чувствительных к действию патогенов. Интерфейс базы TGP позволяет находить промоторы с определенными характеристиками. Представление чувствительных к патогенам

промоторов в базе TGP дает возможность выбрать стадие-, ткане-, видоспецифичный, чувствительный к определенным регуляторам промотор, активность которого была изучена в определенном трансгенном организме. Исследователь может быстро получить нуклеотидную последовательность выбранного промотора, а также характеристику экспрессии исходного гена, которому принадлежит выбранный промотор. Эти данные могут быть использованы при проведении фундаментальных и биотехнологических исследований.

ПРОМОТОРЫ РАСТЕНИЙ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ИНВАЗИИ ПАТОГЕНА

Triticeae. Белки, переносящие липиды между мембранами, участвуют в защите от бактериальных и грибных инфекций. В качестве примера промотора, активность которого индуцируется при инвазии бактериального патогена *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*, может служить промотор *HvLTP4.3* (*Hordeum vulgare* lipid transfer protein 4.3), высокоактивный в листьях и колеоптиле ячменя. Вместе с тем заражение листьев ячменя патогенной бактерией *Pseudomonas syringae* pv. *japonica* вызывает понижение активности промотора (Molina *et al.*, 1996).

Белки пуриноидины определяют текстуру зерна пшеницы. У трансгенных пшениц *T. aestivum* и *T. durum* промотор *TaPinA* (*T. aestivum* puroidoline-a) активен только в эндосперме (Wiley *et al.*, 2007). В трансгенном рисе *TaPinA* промотор проявляет более широкий спектр активности и индуцируется после поранения и заражения листьев риса грибом *Magnaporthe grisea* (Evrard *et al.*, 2007) (табл.).

Solanaceae. У здоровых растений картофеля активность промотора *StGstI* (*Solanum tuberosum* Glutathione-S-transferase) наблюдалась только в корнях и стареющих листьях. Промотор *StGstI* локально активировался после инокуляции листьев картофеля патогеном *Phytophthora infestans* (Hahn, Strittmatter, 1994), вирусами PVY и PLRV (potato leaf roll virus), после заражения корней белой картофельной нематодой *Globodera pallida* (Strittmatter *et al.*, 1996). Активность промотора *StGstI* практически не менялась после заражения корней картофеля южной галловой нематодой

Meloidogyne incognita, что могло быть связано с отсутствием защитных реакций у растения-хозяина в связи с недеструктивной миграцией паразита. В отличие от патогенных организмов при микоризации корней симбиотическим грибом *Glomus mosseae* активность промотора *StGstI* наблюдалась только в колонизированных клетках (Strittmatter *et al.*, 1996). У яблони промотор *StGstI* активируется патогенной бактерией *Erwinia amylovora* и грибом *Venturia inaequalis* (Malnoy *et al.*, 2006). У апельсина после инокуляции патогеном *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* экспрессия гена *hrpN* из *Erwinia amylovora* под контролем *StGstI* промотора снижала вызванный патогеном некроз листьев (Barbosa-Mendes *et al.*, 2009).

В проростках картофеля и листьях табака активность промотора *StGluB* (*S. tuberosum* acidic β -glucanase) возрастала локально вокруг некротических пятен через 5–7 дней после инокуляции вирусом табачной мозаики (ВТМ) или *P. infestans* (Mac *et al.*, 2004). Уровень активности промотора *NpGNI* (*Nicotiana plumbaginifolia* β -glucanase) существенно возрастал после инокуляции листьев табака бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, *Pseudomonas fluorescens*. В здоровых растениях максимальная активность промотора наблюдается в корнях и старых листьях (Castresana *et al.*, 1990).

Промоторы *ScOSML13*, *ScOSML81* (*Solanum commersonii* osmotin-like proteins) способны повышать активность локально в месте инокуляции грибом *P. infestans* листьев трансгенного дикого картофеля *S. commersonii* (Zhu *et al.*, 1995).

Промоторы перца *CabPR1* (*Capsicum annuum* basic PR-1 protein), *CaChi2* (*C. annuum* class II basic chitinase), *CaLTPIII* (*C. annuum* lipid transfer protein III), *CaPIP2* (*C. annuum* pathogen-induced protein 2) положительно реагировали на инокуляцию листьев табака бактерией *P. syringae* pv. *tabaci* (Hong *et al.*, 2005, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Индукция промотора *CaSAR8.2A* (*C. annuum* SAR8.2A protein) в инокулированных патогеном листьях была в два раза выше, чем в неинокулированных системных листьях (Lee, Hwang, 2006).

При инокуляции табака конидиями гриба *Fusarium solani* f. sp. *pisi* происходит локальная индукция активности промоторов *LeTap1*

Таблица

Промоторы, индуцируемые патогенами в трансгенных растениях

Промотор и его источник	Трансгенное растение	Патоген, токсин	Дополнительный регулятор ^б	Литература
<i>AtPAL1</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i> phenylalanine ammonia-lyase 1)	табак, арабидопсис	<i>Peronospora parasitica</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>Phaseoli</i>	поранение, H ₂ O ₂ , митомицин С	Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Huang, McBeath, 1994; Choi <i>et al.</i> , 2001; Rookes, Cahill, 2003
<i>AtPDF1.2</i> (<i>A. thaliana</i> putative defensin)	табак, арабидопсис	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , ВТМ, <i>Phytophthora parasitica</i> , <i>Cercospora nicotianae</i>	поранение, ЖК, этилен, окислительный стресс	Manners <i>et al.</i> , 1998; Mitter <i>et al.</i> , 1998
<i>AtP85</i> (<i>A. thaliana</i> senescence-associated protein)	табак, арабидопсис	<i>Peronospora tabacina</i>	NaCl, холод	Banerjee <i>et al.</i> , 2013
<i>AtSAG12</i> (<i>A. thaliana</i> senescence-associated gene 12)	томат	<i>B. cinerea</i>	старение	Swartzberg <i>et al.</i> , 2008
<i>HvLTP4.3</i> (<i>Hordeum vulgare</i> lipid transfer protein 4.3)	ячмень	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>translucens</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Japonica</i>	АБК, холод	Molina <i>et al.</i> , 1996
<i>CabPR1</i> (<i>Capsicum annuum</i> basic PR-1 protein)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, ЖК, этилен, NO, маннитол	Hong <i>et al.</i> , 2005
<i>CaChi2</i> (<i>C. annuum</i> class II basic chitinase)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> ,	СК, NaCl, маннитол	Hong <i>et al.</i> , 2006
<i>CaLTPIII</i> (<i>C. annuum</i> lipid transfer protein III)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	СК, ЖК, АБК, этилен, H ₂ O ₂ , засуха, NaCl	Jung <i>et al.</i> , 2006
<i>CaPIP2</i> (<i>C. annuum</i> pathogen-induced protein 2)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, АБК, ЖК	Lee <i>et al.</i> , 2007
<i>CaSAR8.2A</i> (<i>C. annuum</i> SAR8.2A protein)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl, холод, СК, АБК, ЖК, этилен	Lee, Hwang, 2006
<i>GmCAM4</i> (<i>Glycine max</i> calmodulin isoform-4)	табак, арабидопсис	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , <i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	NaCl	Park <i>et al.</i> , 2004, 2009
<i>LeTap1</i> , <i>LeTap2</i> (<i>Lycopersicon esculentum</i> anionic peroxidase)	табак	<i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>pisi</i> , <i>Verticillium albo-atrum</i>	поранение	Mohan <i>et al.</i> , 1993a, b
<i>NpGNI</i> (<i>Nicotiana plumbaginifolia</i> β-glucanase)	табак	<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> , <i>Erwinia carotovora</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	СК	Castresana <i>et al.</i> , 1990
<i>NtPRIA</i> (<i>Nicotiana tabacum</i> pathogenesis-related protein 1a)	табак, томат	ВТМ	СК	Uknes <i>et al.</i> , 1993; Ma <i>et al.</i> , 2009
<i>NtPR2D</i> , <i>NtPR2B</i> (<i>N. tabacum</i> acidic β-glucanase)	табак	ВТМ	СК	Hennig <i>et al.</i> , 1993; van de Rhee <i>et al.</i> , 1993

Окончание таблицы

Промотор и его источник	Трансгенное растение	Патоген, токсин	Дополнительный регулятор ^б	Литература
<i>PcCMPG1b</i> (<i>Petroselinum crispum</i> immediate-early fungal elicitor protein)	арабидопсис, петрушка	<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> , флагеллин, <i>Peronospora parasitica</i> pv. <i>Cala2</i> , Pep25 элиситор из <i>Phytophthora sojae</i>		Kirsch <i>et al.</i> , 2001
<i>PsDRR206</i> (<i>Pisum sativum</i> disease resistance response protein 206)	табак, картофель, горох	<i>P. syringae</i> pv. <i>tabaci</i> , <i>Fusarium solani</i> f. sp. <i>phaseoli</i>	поранение, H ₂ O ₂ , митомицин С, актиномицин, этопозид	Choi <i>et al.</i> , 2001, 2004
<i>ScOSML13</i> , <i>ScOSML81</i> (<i>Solanum commersonii</i> osmotin-like proteins)	дикий картофель	<i>Phytophthora infestans</i>	поранение, АБК, СА, NaCl	Zhu <i>et al.</i> , 1995
<i>StGluB</i> (<i>S. tuberosum</i> acidic β-glucanase)	картофель, табак	<i>P. infestans</i> , ВТМ ^а		Mac <i>et al.</i> , 2004
<i>StGst1</i> (<i>S. tuberosum</i> Glutathione S transferase)	картофель, яблоня, апельсин	<i>P. infestans</i> , <i>Globodera pallida</i> , <i>Venturia inaequalis</i> , <i>Erwinia amylovora</i> , <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	поранение, СК	Hahn, Strittmatter, 1994; Strittmatter <i>et al.</i> , 1996; Malnoy <i>et al.</i> , 2006; Barbosa-Mendes <i>et al.</i> , 2009
<i>TaPinA</i> (<i>Triticum aestivum</i> puroindoline-a)	рис	<i>Magnaporthe grisea</i>	поранение	Evrard <i>et al.</i> , 2007

^а ВТМ – вирус табачной мозаики; ^б АБК – абсцизовая, ЖК – жасмоновая, СА – салициловая кислоты.

и *LeTap2* (*Lycopersicon esculentum* anionic peroxidase) (Mohan *et al.*, 1993a). Активность промотора *LeTap1* повышается в два раза после обработки протопластов табака элиситором из *Verticillium albo-atrum* (Mohan *et al.*, 1993b).

Активность промоторов табака *NtPR2D* и *NtPR2B* (*Nicotiana tabacum* acidic β-1,3-glucanase) существенно возрастает после инокуляции листьев табака ВТМ как локально, вокруг некротических пятен, так и системно, в неинкулированных листьях. Следует отметить, что у здоровых растений табака активность промотора *NtPR2B* отсутствует, а активность промотора *NtPR2D* наблюдается только на стадии проростков и в развивающихся органах цветка, но не в корнях, стеблях и листьях взрослых растений (Hennig *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 1993). Ген *NtPR-1a* (*N. tabacum* pathogenesis-related 1a) экспрессируется преимущественно в мезофилле и эпидермисе листовых пластин и в чашелистиках цветка. ВТМ активизирует *NtPR1a* промотор в табаке (Uknes *et al.*, 1993).

Fabaceae. Промотор *PsDRR206* (*Pisum sativum* disease resistance response protein 206) в трансгенном табаке активировался *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* (FspH), хитозаном и FspH DNase (DNase elicitor from *F. solani*) (Choi *et al.*, 2001). Ген *FspH DNase*, сшитый с промотором *PsDRR206*, обеспечивал устойчивость против *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* и *Alternaria alternata* у трансгенного табака. В трансгенном картофеле, несущем ту же генетическую конструкцию, наблюдалась меньшая степень защиты от *P. infestans*. Активность промотора была существенно выше в трансгенном табаке, чем в картофеле или горохе (Choi *et al.*, 2001, 2004).

Промотор *GmCAM4* (*Glycine max* calmodulin isoform-4) экспрессируется в первую очередь в апикальной меристеме и гипокотиле проростков арабидопсиса. Активность промотора в листьях взрослых растений арабидопсиса и табака существенно возрастает после действия бактерий *P. syringae* pv. *tomato* и *P. syringae* pv. *tabaci* (Park

et al., 2004, 2009). Транскрипционный фактор GmZF-HD1 участвует в индукции *GmCaM4* промотора патогенами (Park *et al.*, 2007).

***Petroselinum crispum*.** Информация о промоторах петрушки, индуцируемых элиситорами в протопластах, представлена в базе TGP (Smirnova *et al.*, 2012). Промотор *PcCMPG1b* (*Petroselinum crispum* immediate-early fungal elicitor protein) индуцируется в протопластах петрушки элиситором Pep25 из поверхностного гликопротеина фитопатогенного гриба *Phytophthora sojae*, бактериальным белком флагеллином и *P. syringae* pv. *tomato* в листьях арабидопсиса, грибом *Rhizoctonia solani* штамма AG2 в корнях арабидопсиса. В листьях арабидопсиса инокуляция оомицетом *Peronospora parasitica* pv. *Cala2* приводит к более высокой активности промотора вокруг сайтов инфицирования по сравнению с семядолями (Kirsch *et al.*, 2001).

***Arabidopsis thaliana*.** Промотор *AtPAL1* (*A. thaliana* phenylalanine ammonia-lyase 1) активен на стадии проростков, в сосудистых тканях корней и листьев, в чашелистиках, пыльниках и пестике, но не в лепестках. Промотор активируется в процессе несовместимого взаимодействия арабидопсиса с *Peronospora parasitica* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Rookes, Cahill, 2003). *P. syringae* pv. *tabaci*, *F. solani* f. sp. *Phaseoli*, FspHD-Nase, *Pseudomonas solanacearum* штамм K60 (совместимый) и B1 (несовместимый штамм) активируют промотор *AtPAL1* в табаке (Huang, McBeath, 1994; Choi *et al.*, 2001).

Инокуляция табака BTM, *P. parasitica*, *Cercospora nicotianae* и арабидопсиса патогенами *Alternaria brassicicola* или *Botrytis cinerea* существенно повышает активность промотора *AtPDF1.2* (*A. thaliana* defensin) (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998).

Гены арабидопсиса *At4g35985* (senescence associated gene) и *At4g35987* (methyl transferase) расположены рядом в разных цепях геномной ДНК и управляются двунаправленным промотором *AtP85-P87*. Биотический стресс, вызванный *Peronospora tabacina*, сопровождается повышением активности *AtP85* промотора в листьях табака *Nicotiana benthamiana* в 3 раза. Активность *AtP87* промотора в данном эксперименте не изучалась (Banerjee *et al.*, 2013).

Большая часть представленных выше промоторов выделена из генов, активность которых непосредственно связана с ответом на патогены. В некоторых случаях связь между действием патогена и индукцией промотора обусловлена более тонкими механизмами. Промоторы генов *AtSAG12* и *AtSAG13* (*A. thaliana* senescence-associated gene) индуцируются в процессе старения листьев трансгенных растений. Экспрессия гена *IPT* (*Agrobacterium tumefaciens* isopentenyltransferase) под контролем этих промоторов приводит к более позднему старению за счет авторегуляции продукции цитокинина. Инфекция *B. cinerea* индуцирует экспрессию *AtSAG12-GUS* и *AtSAG13-GUS* в листьях томата, подтверждая, что старение листа является частью действия этого патогена. Экспрессия гена *IPT* под контролем промоторов *AtSAG12* или *AtSAG13* в ответ на инокуляцию *B. cinerea* приводит к супрессии симптомов заболевания, индуцированных патогеном. Таким образом, отсрочка старения листьев, вызванная действием гена *IPT*, может снижать чувствительность к *B. cinerea* (Swartzberg *et al.*, 2008).

ВЛИЯНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ФАКТОРОВ НА ПРОМОТОРЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ПАТОГЕНАМ

Большая часть чувствительных к инфекции промоторов реагирует на другие факторы: поранение, холод, засуху, гормональные сигналы, окислительный и осмотический стресс. Поранение происходит на одном из начальных этапов взаимодействия патогена и организма-хозяина, поэтому неудивительно, что большая часть представленных промоторов чувствительна к механическим повреждениям (см. табл.). Некоторые промоторы, такие как *NpGNI*, *PcCMPG1b*, *CabPR1*, *CaSAR8.2A*, не реагируют на поранение (Castresana *et al.*, 1990; Kirsch *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2005; Lee, Hwang, 2006). Реакция промотора *AtPDF1.2* на поранение, а также на этилен зависела от вида растения, в котором экспрессировался ген-репортер: в клетках табака активность промотора повышалась, а у арабидопсиса оставалась без изменений (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998). Активность промотора *StGst1* в клетках картофеля не зависит от абиотических фак-

торов, таких как поранение, действие повышенной температуры и освещение. В геноме яблони промотор *StGst1* также не чувствителен к поранению, но активируется салициловой кислотой, а в геноме апельсина индуцируется после поранения. Данные примеры показывают зависимость индукции промотора от вида организма-хозяина (Strittmatter *et al.*, 1996; Malnoy *et al.*, 2006; Barbosa-Mendes *et al.*, 2009).

Чувствительные к патогенам промоторы активно реагируют на факторы внешней среды. Повышение концентрации соли приводит к повышению активности промоторов *ScOSML13*, *ScOSML81* в диком картофеле *S. commersonii*; *CaChi2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1* и *CaPIP2* в листьях табака; *GmCAM4* в листьях арабидопсиса и табака (Zhu *et al.*, 1995; Park *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2005, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009). Активность промотора *CaLTPIII* репрессировалась после действия соли и засухи (Jung *et al.*, 2006).

После холодового воздействия повышалась активность промоторов *HvLTP4.3*, *CabPR1*, *CaSAR8.2A*, *CaPIP2* (Molina *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2005; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Промотор *AtPAL1* активируется после обработки арабидопсиса хлоридом ртути и обработки табака перекисью водорода (Mauch-Mani, Slusarenko, 1996; Rookes, Cahill, 2003; Choi *et al.*, 2001). Промоторы *PsDRR206* и *CaLTPIII* также активируются перекисью водорода (Choi *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2006).

В зависимости от направления промотор *AtP85-P87* показывает различия в индуцированной экспрессии в трансгенных растениях арабидопсиса и табака (*Nicotiana benthamiana*). Промотор *AtP85* имеет более быструю реакцию на солевой стресс по сравнению с промотором *AtP87*. Промотор *AtP85* чувствителен к холоду, а промотор *AtP87* – к манниту, вызывающему осмотический стресс (Banerjee *et al.*, 2013).

Чувствительные к патогенам промоторы по-разному реагируют на растительные гормоны. Жасмоновая кислота, играющая важную роль в защитном ответе, положительно влияет на активность промоторов *AtPDF1.2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1*, *CaPIP2*, *CaLTPIII* (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998; Hong *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007).

Абсцизовая кислота регулирует ответ растений на абиотический стресс. Под действием абсцизовой кислоты активность промоторов *ScOSML13*, *ScOSML81* в листьях *S. commersonii*, промотора *HvLTP4.3* в ячмене, промоторов *CaPIP2*, *CaLTPIII* и *CaSAR8.2A* в листьях табака повышается (Zhu *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006).

Этилен повышает активность промоторов *CabPR1*, *CaLTPIII* и *CaSAR8.2A* (Hong *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006). Промотор *NpGNI* не реагирует на этилен (Castresana *et al.*, 1990).

Активность промоторов *NpGNI*, *NtPR2D*, *NtPR1a*, *NtPR2B*, *ScOSML13*, *ScOSML81*, *CaChi2*, *CaSAR8.2A*, *CabPR1*, *CaLTPIII*, *CaPIP2* возрастает после действия салициловой кислоты (Castresana *et al.*, 1990; Hennig *et al.*, 1993; Uknes *et al.*, 1993; Rhee *et al.*, 1993; Zhu *et al.*, 1995; Hong *et al.*, 2005, 2006; Jung *et al.*, 2006; Lee, Hwang, 2006; Lee *et al.*, 2007). В то же время промотор *AtPDF1.2* не реагирует на этот гормон в арабидопсисе и табаке (Manners *et al.*, 1998; Mitter *et al.*, 1998). Чувствительность промотора *NtPR1a* к салициловой кислоте была использована для продукции фитоалексина ресвератрола в трансгенных растениях томатов (Ma *et al.*, 2009).

Разная чувствительность промоторов к растительным гормонам может быть объяснена участием генов, соответствующих этим промоторам, в разных путях защитного ответа со своей спецификой гормональной регуляции.

Таким образом, в экспериментах с трансгенными растениями необходимо учитывать разную реакцию чувствительных к патогенам промоторов на факторы внешней среды и гормональные сигналы, а также возможность разнонаправленной реакции одного и того же промотора в разных видах растений.

ПРОМОТОРЫ ДЛЯ ЦЕЛЕВОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ УСТОЙЧИВОСТЬ К ФИТОПАТОГЕНАМ РАЗЛИЧНОЙ ПРИРОДЫ

В базе TGP представлены тканеспецифические промоторы, которые могут быть использованы для целевой экспрессии генов

устойчивости (Smirnova *et al.*, 2012; Smirnova, Kochetov, 2012). Тканеспецифический промотор *HvLem2* (*Hordeum vulgare* lectin-like protein) может быть использован для экспрессии противогрибковых генов в цветковых чешуях и эпикарпе, через которые происходит наиболее вероятное заражение ячменя грибом *Fusarium graminearum* (Abebe *et al.*, 2006). Промоторы генов *TdPRPI* (*Triticum durum* defensin) могут быть использованы для специфической экспрессии и накопления белков, придающих устойчивость к патогенам, в уязвимых тканях развивающихся и прорастающих зерновок (Kovalchuk *et al.*, 2010). Тканеспецифический промотор гена *TdGL9H1* (*Triticum durum* HD-Zip IV transcription factor GL9H1) может быть использован для защиты эмбриональной оси от патогенов во время запасания и высыхания зерновки (Kovalchuk *et al.*, 2012). Уровень транскрипции гена пшеницы *TaGstA1* (*Triticum aestivum* glutathione S-transferase 1) повышается в 20 раз после инфицирования листьев *Erysiphe graminis* f. sp. *Hordei*. Промотор *TaGstA1* не проявлял активности в листьях трансгенной пшеницы (Altpeter *et al.*, 2005), но обеспечивал высокую активность в эпидермисе листьев ячменя (Himmelbach *et al.*, 2007). В целях повышения устойчивости пшеницы к мучнистой росе, вызываемой грибом *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, был создан специфичный для эпидермиса промотор, состоящий из промотора *TaGstA1* и интрона гена *WIR1a* пшеницы (*TaGstA1i*). Инокуляция листьев пшеницы, бомбардированных *TaGstA1i-GUS*, не приводила к повышению GUS активности, несмотря на то что был использован промотор гена, индуцируемого патогеном (Altpeter *et al.*, 2005). Промотор *TaGstA1i* был использован для экспрессии генов защитного ответа *TaPrx103* (wheat peroxidase TaPERO) и *TaOXOX* (wheat oxalate oxidase). Экспрессия гена пероксидазы под контролем *TaGstA1i* промотора в эпидермисе пшеницы повышала устойчивость к *B. graminis* f. sp. *tritici*, в то время как экспрессия оксалат оксидазы не оказывала влияния на устойчивость (Altpeter *et al.*, 2005; Schweizer, 2008). Тканеспецифическая экспрессия во фруктах гена *LeTap1* под контролем промотора *LeE8* приводит к повышению общей пероксидазной активности, высокому накоплению

фенольных соединений в плодах трансгенных томатов, снижению реакции плодов на повреждение и грибную инфекцию (Kesanakurti *et al.*, 2012).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение структурно-функциональной организации промоторов генов, экспрессия которых изменяется в присутствии фитопатогенов, важно для решения нескольких задач генетики и биотехнологии растений. Во-первых, такие гены могут быть участниками генных сетей, контролирующими защитные механизмы, предотвращающие развитие патогенов или снижающие негативные последствия от инфекции. Во-вторых, современные методы генной инженерии растений являются одним из наиболее перспективных способов получения устойчивых к фитопатогенам форм хозяйственно ценных видов растений. Промоторы являются важным элементом структуры генетических конструкций, поэтому их изучение необходимо для эффективного планирования генно-инженерных экспериментов. Кроме этого, систематический анализ молекулярных механизмов транскрипционного контроля экспрессии генов необходим для понимания способов управления координированной экспрессией генов растений в составе ансамблей или больших генных сетей.

Работа поддержана грантами Министерства образования и науки РФ (соглашение № 14.604.21.0107 от 07.07.2014) и РФФИ № 14-04-01036.

ЛИТЕРАТУРА

- Abebe T., Skadsen R., Patel M., Kaeppler H. The *Lem2* gene promoter of barley directs cell- and development-specific expression of *gfp* in transgenic plants // Plant Biotechnol. J. 2006. V. 4. P. 35–44.
- 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.
- Balasubramanian V., Vashisht D., Cletus J., Sakthivel N. Plant β -1,3-glucanases: their biological functions and transgenic expression against phytopathogenic fungi // Biotechnol. Lett. 2012. V. 34. P. 1983–1990.
- Barbosa-Mendes J.M., de Assis Alves Mourão Filho F.,

- Filho A.B. *et al.* Genetic transformation of *Citrus sinensis* cv. Hamlin with *hrpN* gene from *Erwinia amylovora* and evaluation of the transgenic lines for resistance to citrus canker // *Sci. Hortic.* 2009. V. 122. P. 109–115.
- Baebler Š., Witek K., Petek M. *et al.* Salicylic acid is an indispensable component of the *Ny-1* resistance-gene-mediated response against *Potato virus Y* infection in potato // *J. Exp. Bot.* 2014. V. 65. P. 1095–1109.
- Banerjee J., Sahoo D.K., Dey N. *et al.* An intergenic region shared by *At4g35985* and *At4g35987* in *Arabidopsis thaliana* is a tissue specific and stress inducible bidirectional promoter analyzed in transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants // *PLoS One*. 2013. V. 8. e79622.
- Bolívar J.C., Machens F., Brill Y. *et al.* 'In silico expression analysis', a novel PathoPlant web tool to identify abiotic and biotic stress conditions associated with specific *cis*-regulatory sequences // *Database (Oxford)*. 2014. 2014(0): bau030.
- Castresana C., de Carvalho F., Gheysen G. *et al.* Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta-1,3-glucanase gene // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 1131–1143.
- Choi J.J., Klosterman S.J., Hadwiger L.A. A comparison of the effects of DNA-damaging agents and biotic elicitors on the induction of plant defense genes, nuclear distortion, and cell death // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 752–762.
- Choi J.J., Klosterman S.J., Hadwiger L.A. A promoter from pea gene *DRR206* is suitable to regulate an elicitor-coding gene and develop disease resistance // *Phytopathology*. 2004. V. 94. P. 651–660.
- 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.
- Filipenko E.A., Kochetov A.V., Kanayama Y. *et al.* PR-proteins with ribonuclease activity and plant resistance against pathogenic fungi // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2013. V. 3. P. 474–480.
- Ghosh Dasgupta M., George B.S., Bhatia A., Sidhu O.P. Characterization of *Withania somnifera* leaf transcriptome and expression analysis of pathogenesis-related genes during salicylic acid signaling // *PLoS One*. 2014. V. 9. e94803.
- Grant M.R., Kazan K., Manners J.M. Exploiting pathogens' tricks of the trade for engineering of plant disease resistance: challenges and opportunities // *Microb. Biotechnol.* 2013. V. 6. P. 212–222.
- Hahn K., Strittmatter G. Pathogen-defence gene *prp1-1* from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 226. P. 619–626.
- Hennig J., Dewey R.E., Cutt J.R., Klessig D.F. Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a beta-1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants // *Plant J.* 1993. V. 4. P. 481–493.
- 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.
- Hong J.K., Hwang B.K. Promoter activation of pepper class II basic chitinase gene, *CAC12*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CA12*-overexpressing *Arabidopsis* // *Planta*. 2006. V. 223. P. 433–448.
- Hong J.K., Lee S.C., Hwang B.K. Activation of pepper basic *PR-1* gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses // *Gene*. 2005. V. 356. P. 169–180.
- Huang Y., McBeath J.H. Bacterial induced activation of an *Arabidopsis* phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic tobacco plants // *Plant Sci.* 1994. V. 98. P. 25–35.
- Jung H.W., Lim C.W., Hwang B.K. Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (*CALTPIII*) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses // *Plant Sci.* 2006. V. 170. P. 258–266.
- Kesanakurti D., Kolattukudy P.E., Kirti P.B. Fruit-specific overexpression of wound-induced *tap1* under E8 promoter in tomato confers resistance to fungal pathogens at ripening stage // *Physiol. Plant*. 2012. V. 146. P. 136–148.
- Kirsch C., Logemann E., Lippok B., Schmelzer E., Hahlbrock K. A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated *CMPG1* gene in *Petroselinum crispum* // *Plant J.* 2001. V. 26. P. 217–227.
- Koschmann J., Machens F., Becker M. *et al.* Integration of bioinformatics and synthetic promoters leads to the discovery of novel elicitor-responsive *cis*-regulatory sequences in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2012. V. 160. P. 178–191.
- 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., Wu W., Eini O. *et al.* The scutellar vascular bundle-specific promoter of the wheat HD-Zip IV transcription factor shows similar spatial and temporal activity in transgenic wheat, barley and rice // *Plant Biotechnol. J.* 2012. V. 10. P. 43–53.
- Lee S.C., Hwang B.K. Identification and deletion analysis of the promoter of the pepper *SAR8.2* gene activated by bacterial infection and abiotic stresses // *Planta*. 2006. V. 224. P. 255–267.
- Lee S.C., Kim D.S., Kim N.H., Byung Kook Hwang B.K. Functional analysis of the promoter of the pepper pathogen-induced gene, *CAP12*, during bacterial infection and abiotic stresses // *Plant Sci.* 2007. V. 172. P. 236–245.
- Ma B.G., Duan X.Y., Niu J.X. *et al.* Expression of stilbene synthase gene in transgenic tomato using salicylic acid-inducible *Cre/loxP* recombination system with self-excision of selectable marker // *Biotechnol. Lett.* 2009. V. 31. P. 163–169.
- Mac A., Krzymowska M., Barabasz A., Hennig J. Transcriptional regulation of the *gluB* promoter during plant response to infection // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2004. V. 9. P. 843–853.
- Malnoy M., Reynoird J.P., Borejsza-Wysocka E.E., Aldwinckle H.S. Activation of the pathogen-inducible *Gst1* promoter of potato after elicitation by *Venturia inaequalis* and *Erwinia amylovora* in transgenic apple (*Malus × domestica*) // *Transgenic Res.* 2006. V. 15. P. 83–93.
- Manners J.M., Penninckx A.M.A.I., Vermaere K. *et al.* The promoter of the plant defensin gene *PDF1.2* from *Arabidopsis* is systemically activated by fungal pathogens and

- responds to methyl jasmonate but not to salicylic acid // *Plant Mol. Biol.* 1998. V. 38. P. 1071–1080.
- Mauch-Mani B., Slusarenko A.J. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica* // *Plant Cell.* 1996. V. 8. P. 203–212.
- Mitter N., Kazan K., Way M.H., Broekaert F.W., Manners J.M. Systemic induction of an *Arabidopsis* plant defensin gene promoter by tobacco mosaic virus and jasmonic acid in transgenic tobacco // *Plant Sci.* 1998. V. 136. P. 169–180.
- Mohan R., Bajar A.M., Kolattukudy P.E. Induction of a tomato anionic peroxidase gene (*tap1*) by wounding in transgenic tobacco and activation of *tap1/GUS* and *tap2/GUS* chimeric gene fusions in transgenic tobacco by wounding and pathogen attack // *Plant Mol. Biol.* 1993a. V. 21. P. 341–354.
- Mohan R., Vijayan P., Kolattukudy P.E. Developmental and tissue-specific expression of a tomato anionic peroxidase (*tap1*) gene by a minimal promoter, with wound and pathogen induction by an additional 5'-flanking region // *Plant Mol. Biol.* 1993b. V. 22. P. 475–490.
- Molina A., Diaz I., Vasil I.K., Carbonero P., Garcia-Olmedo F. Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 from barley show differential responses to bacterial pathogens // *Mol. Gen. Genet.* 1996. V. 252. P. 162–168.
- Park H.C., Kim M.L., Kang Y.H. *et al.* Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 Box that interacts with a GT-1-like transcription factor // *Plant Physiol.* 2004. V. 135. P. 2150–2161.
- Park H.C., Kim M.L., Kang Y.H. *et al.* Functional analysis of the stress-inducible soybean calmodulin isoform-4 (*GmCaM-4*) promoter in transgenic tobacco plants // *Mol. Cells.* 2009. V. 27. P. 475–480.
- Park H.C., Kim M.L., Lee S.M. *et al.* Pathogen-induced binding of the soybean zinc finger homeodomain proteins GmZF-HD1 and GmZF-HD2 to two repeats of ATTA homeodomain binding site in the calmodulin isoform 4 (*GmCaM4*) promoter // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 3612–3623.
- Rhee van de M.D., Lemmers R., Bol J.F. Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic beta-1,3-glucanase genes // *Plant Mol. Biol.* 1993. V. 21. P. 451–461.
- Rookes J.E., Cahill D.M. A *PAL1* gene promoter-green fluorescent protein reporter system to analyse defence responses in live cells of *Arabidopsis thaliana* // *Eur. J. Plant Pathol.* 2003. V. 109. P. 83–94.
- 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.* 2012. V. 21. P. 429–437.
- Smirnova O.G., Kochetov A.V. Wheat promoter sequences for transgene expression // *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2012. V. 2. P. 434–439.
- Strittmatter G., Gheysen G., Gianinazzi-Pearson V. *et al.* Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *gst1* gene // *Mol. Plant. Microbe Interact.* 1996. V. 9. P. 68–73.
- Swartzberg D., Kirshner B., Rav-David D., Elad Y., Granot D. *Botrytis cinerea* induces senescence and is inhibited by autoregulated expression of the *IPT* gene // *Eur. J. Plant Pathol.* 2008. V. 120. P. 289–297.
- Trifonova E.A., Sapotsky M.V., Komarova M.L. *et al.* Protection of transgenic tobacco plants expressing bovine pancreatic ribonuclease against tobacco mosaic virus // *Plant Cell Rep.* 2007. V. 26. P. 1121–1126.
- Uknes S., Dincher S., Friedrich L. *et al.* Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco // *Plant Cell.* 1993. V. 5. P. 159–169.
- Wiley P.R., Tosi P., Evrard A., Lovegrove A., Jones H.D., Shewry P.R. Promoter analysis and immunolocalisation show that puroindoline genes are exclusively expressed in starchy endosperm cells of wheat grain // *Plant Mol. Biol.* 2007. V. 64. P. 125–136.
- Zhu B., Chen T.H.H., Li P.H. Activation of two osmotin-like protein genes by abiotic stimuli and fungal pathogen in transgenic potato plants // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. P. 929–937.

PLANT GENE PROMOTERS RESPONSIVE TO PATHOGEN INVASION**O.G. Smirnova, A.V. Kochetov**

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: planta@bionet.nsc.ru;
Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

Gene networks controlling plant defense against pathogens are rather complex. They may involve hundreds of genes. Infection induces considerable changes at different levels: molecular-genetic, biochemical, physiological, and morphological. These changes manifest themselves locally (near the invasion site) or systemically. The reconstruction of particular gene networks responsible for defense against pathogenic bacteria, fungi, and viruses is an important step in the elucidation of the underlying molecular mechanisms as well as for the development of new approaches to crop improvement. The transcription levels of genes involved in the defense mechanisms commonly increase in response to pathogen invasion. Thus, investigation of their promoters is important for detection of new transcriptional factors controlling their activity and for search for new genes involved in pathogen response. It seems desirable to employ pathogen-responsive promoters to make plant cultivars resistant to various pathogens by gene engineering techniques. In this paper, we present data on promoters of pathogen-responsive genes with experimentally verified transcription patterns annotated in the TGP (TransGene Promoters) database. TGP may be used as a source of information for both interpretation of transcriptomic data and design of gene engineering constructs to obtain agricultural plants with improved resistance against various pathogens.

Key words: promoter, pathogen, transgenic plants, databases.

УДК 575.116/164

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ АНТОЦИАНОВОЙ ОКРАСКИ У РЖИ

© 2014 г. А.В. Войлоков^{1,2}, А.Н. Лыхолай^{1,2}, В.Г. Смирнов¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербург, Россия, e-mail: av_voylokov@mail.ru;

² Санкт-Петербургский филиал Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 5 сентября 2014 г. Принята к публикации 27 октября 2014 г.

В статье приводятся собственные и литературные данные по генетике антоциановой окраски у ржи. Сформулировано представление о норме в отношении признаков антоциановой окраски растений ржи. При анализе изменчивости этих признаков у инбредных линий озимой ржи установлена изменчивость по проявлению антоциановой окраски на различных органах растения, которая в значительной степени подвержена влиянию среды. По этой причине гибридологический анализ проводился только для признаков с надежным качественным проявлением. Установлено, что при гомозиготном состоянии по любому из 6 рецессивных генов (*vi1-vi6*) антоциановая окраска у растения отсутствует. Из них только один ген *vi1* локализован и картирован в хромосоме 7R. Доминантный ген фиолетовой окраски перикарпа *Vs* картирован в хромосоме 2R, а один из двух комплементарных генов окраски ушек *R₁* – в хромосоме 5R. Обсуждаются литературные данные по идентификации и локализации генов антоциановой окраски у ржи в связи с перспективами дальнейших исследований в этом направлении.

Ключевые слова: рожь, антоциановая окраска, изменчивость, генетический анализ, картирование генов.

ВВЕДЕНИЕ

Антоцианы являются пигментами, широко распространенными в растительном мире. Они принадлежат к флавоноидам, образующимся в разветвленном фенилпропаноидном пути биосинтеза, эволюционно возникшем в ходе адаптации растений к наземному образу жизни (Ferrer *et al.*, 2008). Биологическая роль флавоноидов заключается в привлечении животных как опылителей и распространителей семян, осуществлении взаимодействия растений между собой и с микроорганизмами, участии в стрессовых реакциях. Биологическая активность флавоноидов проявляется и в составе растительной пищи. В частности, доказана фармакологическая ценность антоцианов при профилактике и лечении сердечно-сосудистых заболеваний, некоторых видов рака, возрастного диабета, болезней глаз. Антоциановые пигменты в качестве природных красителей

активно внедряются в пищевую промышленность и косметику (Kong *et al.*, 2003).

Мутации в генах, контролирующих синтез антоцианов, нелетальны и легко регистрируются путем простого наблюдения. Их роль в развитии генетики общеизвестна (Инге-Вечтомов, 2010). Г. Мендель использовал окраску цветков гороха как один из признаков при установлении основных законов генетики. Кумулятивная полимерия в наследовании была обнаружена Г. Нильссон-Эле при изучении красной окраски зерновок у мягкой пшеницы. Открытие Б. Мак-Клинтон мобильных элементов было основано на учете мутационных событий в генах синтеза антоцианов, экспрессирующихся в зерновках кукурузы. Зависимость экспрессии родительских аллелей у гибридов от направления скрещивания была впервые описана у кукурузы в реципрокных скрещиваниях линий с окрашенным (*R*) и неокрашенным (*r*) эндоспермом (Emerson, 1918; Kempton, 1919) задолго до формулирования по-

нения «геномный импринтинг». Парамутации как другой эпигенетический феномен также были обнаружены при использовании этой модели (Brink, 1959). В опытах по трансформации окрашенных цветков петунии дополнительной копией гена халконсинтазы впервые была установлена косупрессия гомологов, проявляющаяся в отсутствии антоциановой окраски (Napoli *et al.*, 1990). В настоящее время мутации, нарушающие синтез флавоноидов у кукурузы, петунии, львиного зева, арабидопсиса и у многих других объектов, активно используются для изучения пространственно-временной организации и регуляции метаболизма в организме растений (Winkel-Shirley, 2001). Существенно расширяют возможности такого анализа генно-инженерные подходы, во многих случаях направленные на создание сортов у разных видов с измененным составом антоциановых пигментов.

Гены, контролирующие антоциановую окраску отдельных частей растения, традиционно разделяли на две группы – структурные и регуляторные. В настоящее время это разделение, носившее условный характер, получило обоснование, вытекающее из установления молекулярной функции генов биосинтеза антоцианов. Структурные гены кодируют аминокислотные последовательности ферментов, отвечающих за отдельные этапы биосинтеза. Регуляторные гены представляют собой последовательности, кодирующие структуру транскрипционных факторов, включающих или выключающих структурные гены в разных органах растения в ответ на внутренние или внешние сигналы. Самостоятельную группу генов составляют гены, обеспечивающие трансмембранный транспорт антоцианов в вакуоль растительных клеток. Сложность генетического контроля биосинтеза флавоноидов обуславливает и многокопийность ряда структурных генов. Исключением в этом плане считается арабидопсис, у которого 6 основных структурных генов в цепи биосинтеза представлены одной копией (Bowerman *et al.*, 2012).

Молекулярно-генетическое изучение антоциановой окраски у озимой ржи представляет самостоятельный интерес, поскольку этот объект характеризуется наибольшей устойчивостью к биотическим и абиотическим стрессам

среди родственных злаков. Эту устойчивость в определенной степени может обеспечивать видоспецифичная система генов, контролирующая биосинтез флавоноидов, сложившаяся в ходе эволюции ржи. Однако генетический контроль биосинтеза антоцианов у ржи изучен совершенно недостаточно. Установленные к настоящему времени гены синтеза антоцианов у ржи также можно разделить на две группы. Одну группу составляют гены, рецессивные мутации которых проявляются в отсутствии антоциановой окраски растения. В другую группу входят гены, контролирующие синтез антоцианов в отдельных органах растения.

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ОЗИМОЙ РЖИ ПО АНТОЦИАНОВОЙ ОКРАСКЕ

Популяционные сорта ржи являются генетически гетерогенными. Строгая система гаметофитной несовместимости, присущая ржи, обеспечивает поддержание высокого уровня гетерозиготности отдельных растений и разнообразие генотипов в пределах популяций за счет свободного комбинирования спонтанных мутаций. Генотип каждого растения в сортовых популяциях ржи уникален. Однако изменчивость озимой ржи по признакам антоциановой окраски нельзя рассматривать без представления о норме (диком типе) в отношении этих признаков. Большинство сортов-популяций у ржи фенотипически однородны и включают преимущественно один тип растений – растения с антоцианом на колеоптиле, первых зимующих листьях, узлах и междоузлиях стебля, чешуях колоса, остях, тычинках и зерновках. Интенсивность антоциановой окраски варьирует от растения к растению и в значительной степени зависит от температуры, освещенности и влагообеспеченности в момент ее формирования в отдельных частях растения. Окраска подвержена и онтогенетической изменчивости. Так, активный синтез антоциана в листьях прекращается после перезимовки растений, узлы приобретают окраску в фазе колошения и постепенно теряют ее в дальнейшем, окраска междоузлий, напротив, формируется при созревании. Окраска чешуй и остей появляется при выколашивании и исчезает в ходе созревания, отчего колосья ржи приобретают белесый оттенок. Очевидно, что

преходящее проявление антоциановой окраски затрудняет выделение контрастных форм и проведение генетического анализа признаков окраски у ржи. В популяциях культурной и сорнополевой ржи встречаются растения, которые резко отличаются от растений с нормально варьирующей окраской. Это растения, которые не содержат антоциана во всех обычно окрашенных частях (безантоциановая рожь), или, напротив, растения с антоциановой окраской частей, которые в норме не окрашены или окрашены слабо. Жесткая система самонесовместимости препятствует у ржи самоопылению и получению на этой основе константных форм. Поэтому выделение форм с разной окраской в ранних исследованиях было основано на переопылении предполагаемых мутантов в потомстве отличающихся по окраске растений. Таким путем можно выделить гомозиготы по рецессивным мутациям. В потомстве от переопыления гетерозигот и гомозигот по доминантным мутациям полиморфизм сохраняется. Эффективность обнаружения мутантов, в том числе и по антоциановой окраске, значительно повысилась при использовании автофертильных линий (Смирнов, Соснихина, 1984). Гибриды этих линий с самонесовместимыми растениями также обладают способностью завязывать семена при самоопылении, что позволяет выявлять и фиксировать в гомозиготном состоянии мутации, находящиеся у исходного растения популяции в гетерозиготном состоянии. С помощью обоих подходов была создана Петергофская генетическая коллекция ржи, позволившая изучить генетику антоциановой окраски и сохранить выделенные мутанты для их дальнейшего молекулярно-генетического изучения (Смирнов, Соснихина, 1984). Большинство литературных данных по генетике антоциановой окраски ржи было получено на материале, который к настоящему времени не сохранился.

ГЕНЕТИКА БЕЗАНТОЦИАНОВОЙ РЖИ

Проявление рецессивных мутаций, результатом которых является отсутствие антоциановой окраски у растения (безантоциановость), легко учитывать при анализе окраски колеоптиля в условиях интенсивного освещения. Отсутствие

антоциана в колеоптиле как моногибридный рецессивный признак впервые описал Требо (Treboux, 1925). Затем к аналогичным выводам пришли другие авторы (Агеев, 1929; Dumon, 1938, 1947; Суриков, 1960; Федоров, 1961). В.С. Федоров установленному им гену безантоциановости (Федоров, 1964) присвоил символ *Vi/vi* от латинского названия безантоциановой разновидности ржи – *var. viride*, в свое время введенного Н.И. Вавиловым. Ген (*Vi/vi*) картирован в хромосоме 7R (Войлоков, 2008). В настоящее время помимо гена *vi(vi1)* идентифицировано еще 5 неаллельных генов *vi2–vi6*, гомозиготное состояние по рецессивным аллелям которых проявляется в отсутствии антоциановой окраски у растения (Лыхолай и др., 2014). Тест на аллелизм среди независимо выделенных безантоциановых мутантов показал, что 13 образцов Петергофской генетической коллекции мутантны по гену *vi1*, в то время как мутации *vi2–vi6* обнаружены в одном образце каждая. Число неаллельных генов безантоциановости, установленных в наших исследованиях, совпадает с числом генов, о существовании которых сообщается на основании изучения генетики окраски колеоптиля с помощью трисомного анализа (Melz, 1988). Работа проводилась с помощью неполной серии трисомиков (трисомик по хромосоме 7R отсутствовал), полученной на основе триплоидного растения безантоциановой ржи сорта Эсто. Отсутствие антоциана на растениях этого сорта, согласно нашим данным (Смирнов, Соснихина, 1984; Лыхолай и др., 2014), объясняется их гомозиготностью по рецессивному аллелю одного гена, а именно *vi1*. Поэтому сообщение о 5 дополнительных генах требует обсуждения возможностей трисомного анализа в отношении установления числа генов, отвечающих за различия скрещиваемых форм по анализируемому признаку. Обычно трисомный анализ используют для хромосомной локализации генов, предварительно идентифицированных путем проведения канонического сегрегационного анализа, и установления на этой основе независимых групп сцепления (генов, расположенных в одной и той же хромосоме). Расщепление по анализируемой мутации зависит от того, в какой из хромосом находится локализуемый ген. Если ген находится в хромосоме, представленной у исходного гибрида F₁

двумя гомологами, то расщепление по этому гену в F_2 соответствует каноническому 3 : 1. В случае гетерозиготности по гену, локализованному в хромосоме, представленной у гибрида F_1 тремя гомологами, расщепление отличается от этого соотношения. Как правило, наблюдаемые соотношения редко соответствуют теоретически рассчитанным (Hermsen, 1970) и вывод о хромосомной локализации гена делают на основе отклонения от 3 : 1 в направлении, ожидаемом для трисомного расщепления. Отклонение от соотношения 3 : 1 в потомстве трисомика по определенной хромосоме G. Melz (1988) объяснял присутствием в этой хромосоме доминантного аллеля гена, ответственного за антоциановую окраску колеоптиля. Наблюдаемое в F_2 расщепление в подавляющем большинстве комбинаций скрещивания (безантоциановый трисомик по конкретной хромосоме) \times (форма с антоцианом) соответствовало моногибридному 3 : 1. Только у отдельных гибридов в комбинациях с участием разных форм с антоцианом оно отклонялось в ожидаемом направлении и интерпретировалось как «критическое». Шесть генов, выявленных через обнаружение «критических» скрещиваний у отдельных гибридов с шестью окрашенными формами ржи, были отнесены к разным хромосомам (Melz, Thiele, 1990). Полученные результаты могут объясняться по-другому, а именно: у всех изученных гибридов идет расщепление по одному и тому же гену. Это расщепление у большинства гибридов реализуется как ожидаемое дисомное в соотношении 3 : 1. Отклонение от этого соотношения в потомстве некоторых гибридных трисомиков может объясняться как случайными причинами, так и влиянием селективного фактора, сцепленного с геном безантоциановости *an* у конкретного гибрида и полиморфизм по которому присущ формам с антоцианом. Таким образом, можно заключить, что различия по антоциановой окраске между растениями сорта Эсто и рожью с антоциановой окраской объясняются аллельными различиями по одному гену. Это ген *vi1*, локализованный в хромосоме 7R и обозначенный другими авторами как *an* (Vries, Sybenga, 1984). Еще пять мутаций, *vi2-vi6*, в неаллельных генах определяют отсутствие антоциановой окраски в растениях ржи, гомозиготных по любой из этих мутаций.

ОКРАСКА ОТДЕЛЬНЫХ ЧАСТЕЙ РАСТЕНИЙ РЖИ

Несмотря на значительную изменчивость, описанную в отношении окраски отдельных частей у растений ржи (Смирнов, Соснихина, 1984), генетический контроль детально изучен только для окраски зерна и ушек. Плейотропный характер действия генов безантоциановости определяет их взаимодействие с генами окраски отдельных частей растения. Гены окраски отдельных тканей проявляют свое действие только на фоне доминантных аллелей основных генов. Варьирование окраски зрелых зерновок объясняется синтезом антоцианов или родственных флавоноидов в плодовых или семенных оболочках, а также в алейроновом слое. Выделяют белые, желтые, зеленые, коричневые и фиолетовые зерновки, между которыми существуют переходные варианты. Чермак (Tschermak, 1906) и Рюмкер (Rümker, 1911) при анализе проявления антоциана в алейроновом слое зерновки у гибридов между желтозерными (*aa*) и зеленозерными (*AA*) растениями ржи установили ксенийный характер наследования зеленой окраски зерна. Ксенийность наследования заключается в проявлении отцовского аллеля гена антоциановой окраски *A* в алейроновом слое гибридных зерновок. Подобное проявление генов позволяет учитывать расщепление по окраске зерновок (зеленые vs. желтые семена) непосредственно на зерновках, собранных с растений первого гибридного поколения. Помимо безантоциановых в сортах ржи встречаются желтозерные формы с антоциановой окраской колеоптиля и других частей растений. Дюмон (Dumon, 1947) проводил скрещивания растений обоих типов, выделенных из сорта Court des Flandres, с растениями дикого типа. На основе результатов этого анализа он впервые предложил схему наследования антоциановой окраски растения (колеоптиля) и алейрона, исходящую из комплементарного взаимодействия доминантных аллелей двух несцепленных генов *A* и *B*. Доминантный аллель гена *A* необходим для проявления антоциановой окраски на всем растении, включая колеоптиль и алейроновый слой. Доминантный аллель другого гена, *B*, необходим для появления голубого пигмента только в алейроне. Эта схема наследования

подтверждена и в масштабных экспериментах В.С. Федорова (1961, 1964). В отношении окраски зерна В.С. Федоров выделял не только зеленозерные (*A-B-*) и желтозерные (*A-bb*), но и белозерные формы (*aaB-*, *aabb*). Два последних фенотипа другие авторы не разделяли и описывали как желтозерные. В более поздних публикациях символ *B/b* был заменен на *C/c* (Смирнов, Соснихина, 1984). Привлечение в генетический анализ новых форм, различающихся по окраске частей растения, позволило дополнить дигенную схему (*A-B*) третьим геном *R* (Watkins, White, 1964). Согласно данным этих авторов, окраска колеоптиля, узлов и в разной степени других частей растения, но не первых листьев, определяется комплементарным взаимодействием доминантных аллелей в локусах *A* и *R*. Таким образом, ген *R*, как и ген *B*, может быть отнесен к регуляторным генам, а ген *A* должен считаться основным структурным геном. Авторы исследования отмечают, что у растений, отнесенных к генотипам *A-rr*, наблюдается варьирование по окраске первых листьев, не связанное с проявлением антоциановой окраски на других частях растения. Однако темно-зеленый фон хлорофилл-содержащей ткани маскировал антоциановую окраску и не позволил провести объективный учет расщепления по окраске первых листьев у расщепляющихся гибридов. Авторами этой работы в отличие от других исследователей было установлено тесное сцепление ($5,6 \pm 1,2$ %) между локусами *A* и *B* и, кроме того, выявлено слабое сцепление между *A* и *R* ($45,0 \pm 2,1$ %) наряду с тенденцией к сцеплению между *B* и *R*. Это дало основание выстроить эти локусы в следующем порядке: *B-A-R*. Очевидно, что несоответствие в сцеплении между локусами, обозначенными разными авторами одинаково, как *A* и *B*, может объясняться различиями в генетической природе изученного материала. К сожалению, прямой тест на аллелизм для генов, установленных разными авторами, в настоящее время провести невозможно ввиду утраты соответствующих образцов ржи. Желтозерные и белозерные сорта самонесовместимой ржи воспроизводятся во многих селекционных учреждениях, включая ВИР им. Н.И. Вавилова, однако их генетическая основа не изучена или о ней не сообщается. Оригинальные формы с

идентифицированными генами сохраняются только в Петергофской генетической коллекции, основанной В.С. Федоровым.

Фиолетовая (пурпурная) окраска перикарпа контролируется у ржи доминантным геном *Vs* (синоним *Ps*), локализованным с помощью транслокаций в хромосоме 2R (Vries, Sybenga, 1984) и картированным сначала относительно ряда морфологических (Смирнов, Соснихина, 1984; Vries, Sybenga, 1984), а затем изозимных маркеров этой хромосомы (Войлоков, 2008). Установленная схема наследования окраски хорошо согласуется с данными по идентификации антоцианов в разных тканях растений ржи. В алейроне зеленозерных форм обнаружен дельфинидин-3-рутинозид, в колеоптиле – цианидин-3-рутинозид, а в первых листьях – цианидин-3-глюкозид (Dedio *et al.*, 1972). Перикарп фиолетовозерной ржи содержит цианидин-3-глюкозид, пеонидин-3-глюкозид и ацилированные формы этих гликозидов, при этом состав антоцианов в колеоптиле, листьях и алейроне совпадает с таковым у зеленозерной ржи. В таком случае роль генов *B*, *R* и, по-видимому, *Vs(Ps)* может заключаться в контроле над синтезом тканеспецифичных соединений в алейроне, колеоптиле и перикарпе соответственно, а ген *A* должен контролировать предшественники этих соединений на более ранних этапах биосинтеза. Антоциановая окраска ушек определяется двумя комплементарными несцепленными генами – *R₁* и *R₂* (Федоров, Смирнов, 1967). Один из них (условно *R₁*) сцеплен с двумя другими доминантными маркерами хромосомы 5R – *Hp* (опушение стебля под колосом) и *Ddw* (доминантная короткостебельность). Рecessивное состояние по гену *Vil* блокирует развитие антоциана на ушках, как и на других частях растения.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Картировать гены антоциановой окраски, установленные у ржи, можно, ориентируясь на данные по сравнительной генетике и геномике у хорошо изученных родственных злаков, в первую очередь пшеницы и ячменя. По сравнению с геномами этих видов геном ржи в ходе эволюции претерпел серию перестроек, всего в геномах ржи и ячменя идентифицировано 17

синтенных блоков (Martis *et al.*, 2013). Только хромосома 1R полностью коллинеарна хромосоме 1H. Остальные хромосомы ржи являются мозаиками, включающими от двух до пяти синтенных блоков, входящих в разные хромосомы ячменя. Поскольку эти блоки построены на основании последовательностей экспрессирующихся генов, а структура генов биосинтеза высококонсервативна (Holton, Cornish, 1995), анализ баз данных позволяет предсказать положение генов биосинтеза антоцианов в хромосомах ржи и разработать молекулярные маркеры для их дальнейшего картирования. Примером подобного анализа является работа по локализации структурных генов биосинтеза антоцианов у ржи и их экспрессии у пшенично-ржаных гибридов (Khlestkina *et al.*, 2009). Установлена хромосомная локализация четырех генов, активных в окрашенном колеоптиле ржи, и у пшенично-ржаных дополненных линий с хромосомой 4R. Это гены, контролирующие структуру халконфлаванонизомеразы (*Chi*), флаванон-3-гидроксилазы (*F3h*), антоцианидинсинтазы (*Ans*) и антоцианидин-3-глюкозилтрансферазы (*3Rt*). Гены *Ans* и *3Rt* картированы относительно микросателлитных локусов на хромосомах 6RL и 5RL, гены *Chi* и *F3h* локализованы на хромосомах 5RL и 2RL соответственно (Khlestkina *et al.*, 2009). Очевидно, что структурные гены, представленные в геноме ржи одной копией, являются наиболее вероятными кандидатами на роль генов безантоциановости. Именно такой фенотипический эффект описан для многочисленных мутантов по шести основным генам биосинтеза антоцианов у арабидопсиса (Bowerman *et al.*, 2012) и других видов растений. Так, у ячменя идентифицировано 9 генов (*Ant1*, 2, 5, 13, 17, 18, 21, 22, 30), рецессивные мутации которых определяют отсутствие антоциановой окраски у растения в нормальных условиях выращивания (Jende-Strid, 1993). Семь из этих генов локализованы в хромосомах. Предполагается, что большинство из 9 генов кодируют структуру ферментов биосинтеза антоцианов, а ген *Ant 13* является транскрипционным фактором, контролирующим активность по крайней мере трех генов биосинтеза флавоноидов. Значительно сложнее использовать для сравнительного анализа данные по генетическому контролю признаков

окраски вследствие видовой специфики в отношении числа и характера взаимодействия соответствующих генов. Так, ксенийное проявление окраски алейрона у ячменя в отличие от ржи объясняется взаимодействием двух или пяти доминантных комплементарных генов (Jende-Strid, 1993). Напротив, окраску ушек ячменя определяет один доминантный ген *Paui* в хромосоме 1H, тогда как у ржи – два комплементарных доминантных гена, один из которых надежно локализован в хромосоме 5R. Только в отношении гена фиолетовой (пурпурной) окраски перикарпа *Vs(Ps)* можно говорить о его предполагаемой гомеологии генам красной окраски перикарпа и нижней цветковой чешуи у ячменя (*Pre2*) и гену окраски перикарпа (*Pp3*) у пшеницы (Хлесткина, 2012). Этот вывод основан на локализации генов окраски перикарпа в синтенных участках хромосом второй гомеологической группы. Однако для проявления пурпурной окраски зерна у аллополиплоидных пшениц в отличие от ячменя и ржи необходимо присутствие второго доминантного гена из 7B или 7D хромосом (Хлесткина, 2012).

У мягкой пшеницы кластер генов или один ген с плейотропным эффектом на окраску колеоптиля, листьев, стебля и тычинок локализован в участке коротких плеч хромосом седьмой гомеологической группы, соответствующем фрагменту длинного плеча хромосомы 4R (Хлесткина, 2012). Предполагается, что в этом участке хромосомы 4R локализованы ортологи генов (гена) окраски пшеницы, поскольку присутствие хромосомы 4R или ее длинного плеча у пшенично-ржаных дополненных линий ведет к появлению окраски на колеоптиле, узлах и междоузлиях (Miller, 1984). С другой стороны, у ржи ген антоциановой окраски с аналогичными множественными эффектами локализован в плече 7RL (Войлоков, 2008). Этот ген сцеплен с изозимным локусом *Got2* и, согласно предварительным данным, с микросателлитным маркером *Xrems1135*, который в другой комбинации скрещивания косегрегирует с *Xrems1188* и локусом *Got2*. Следовательно, *Got2* может служить маркером *vil* при сравнительно-генетическом анализе. Установлено, что гены, контролирующие изозимы глутаматоксалоацетаттрансаминазы (GOT) у мягкой пшеницы, локализованы в длинных и коротких

плечах хромосом шестой гомеологической группы и длинных плечах хромосом третьей гомеологической группы (McIntosh *et al.*, 2008). Таким образом, на геном приходится по три структурных гена. У ржи обнаружено не три, а четыре гена, *Got1*, *Got2*, *Got3* и *Got4*, картированных относительно других изомимных локусов соответственно в хромосомах 4RL, 7RL, 6RS и 3RL (Войлоков, 2008). Однако у пшеницы эти локусы не картированы. Этот пример показывает, что установить ортологию генов антоциановой окраски у пшеницы и ржи можно только на основе их молекулярного картирования и анализа коллинеарности генов и маркеров. Подтверждением сделанного вывода служат данные по сравнению максимально плотных генных карт у ржи и ячменя как объекта с минимальными геномными перестройками относительно пшеницы. Так, установлено, что хромосома 4R включает синтенный перичентромерный фрагмент хромосомы 4Н и фрагменты коротких плеч 6Н и 7Н. Хромосома 7R состоит из пяти блоков, гомеологических фрагментам 2HS, 4HL, 5HL, 7HL и 7HS (Martis *et al.*, 2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данные по генетическому контролю антоциановой окраски у разных видов растений позволяют сделать вывод о наличии видовой специфики в отношении числа копий функционально активных структурных и регуляторных генов, их взаимодействия между собой. Очевидно, что эта специфика может быть связана с биологическими особенностями разных видов и ролью антоцианов в адаптации растений к специфической среде. Полученные данные и дальнейшее молекулярно-генетическое изучение биосинтеза антоцианов у ржи представляют интерес с разных точек зрения: эволюции генов биосинтеза, их роли в адаптации, практической значимости. В последнем случае можно получить «белую» муку грубого помола на основе белозерной ржи с разным составом флавоноидов, благодаря блокированию биосинтеза антоцианов на разных стадиях с помощью мутантных генов. Учитывая пищевую ценность собственно антоцианов, перспективно использование фиолетовозерной ржи для производства хлеба с резаным зерном. Разработка

маркеров для отдельных генов биосинтеза антоцианов позволит эффективно проводить отбор по отдельным генам и получать их разные сочетания.

Экспериментальная часть работы выполнена при поддержке программой Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

ЛИТЕРАТУРА

- Агеев Н.П. Inzucht у ржи // Изв. с.-х. акад. им. К.А. Тимирязева. 1929. Кн. 4. С. 143–175.
- Войлоков А.В. Генетическое картирование у ржи *Secale cereale* L.: Дис. ... д-ра биол. наук. СПб.: Изд-во СПбГУ, 2008. 269 с.
- Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции. СПб.: ООО «Изд-во Н-Л», 2010. 720 с.
- Смирнов В.Г., Соснихина С.П. Генетика ржи. Л.: Изд-во ЛГУ, 1984. 264 с.
- Суриков И.М. Расщепление при скрещивании безантоциановой и безвосковой форм яровой ржи // Бюл. ин-та биологии АН БССР. 1960. Вып. 4. С. 179–182.
- Лыхолай А.Н., Владимиров И.А., Андреева Е.А., Смирнов В.Г., Войлоков А.В. Генетика безантоциановости у ржи // Генетика. 2014. Т. 50. № 10. С. 1245–1249.
- Федоров В.С. Генетика ржи (*Secale cereale* L.). Ксени // Исследования по генетике. Изд-во ЛГУ, 1961. Вып. 1. С. 116–121.
- Федоров В.С. Генетика ржи (*Secale cereale* L.). Наследование антоциановой окраски, воскового налета и ветвистокосости у ржи // Исследования по генетике. Изд-во ЛГУ. 1964. Вып. 2. С. 100–110.
- Федоров В.С., Смирнов В.Г. Генетика ржи (*Secale cereale* L.). Сообщ. IV. К генетике антоциановой окраски // Генетика. 1967. Т. 3. С. 94–102.
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. С. 202–216.
- Bowerman P.A., Ramirez M.V., Price M.B., Helm R.F., Winkler B.S.J. Analysis of T-DNA alleles of flavonoid biosynthesis genes in *Arabidopsis* ecotype Columbia // BMC Res. Notes. 2012. V. 5. P. 485–493.
- Brink R.A. Paramutation at the R locus in maize plants trisomic for chromosome 10* // Genetics. 1959. V. 45. P. 819–827.
- Dedio W., Hill R.D., Evans L.E. Anthocyanins in the pericarp and coleoptiles of purple-seeded rye // Can. J. Plant Sci. 1972. V. 52. P. 981–983.
- Dumon A.G. Een geval van dominant en recessief bruin bij *Secale cereale* // Agricultura. 1938. V. 41. P. 190–196.
- Dumon A.G. Contribution à la génétique et à l'amélioration du seigle (*Secale cereale* L.) // Agricultura (Louvain). 1947. V. 45. P. 213–223.
- Emerson R.A. A fifth pair of factors, *Aa*, for aleurone color in maize, and its relation to *Cc* and *Rr* pairs // Cornell Univ. Agric. Esp. Sta. Memoir. 1918. V. 16. P. 231–289.
- Ferrer J.L., Austin M.B., Stewart C., Noel J.P. Structure and

- function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids // *Plant Physiol. Biochem.* 2008. V. 46. P. 356–370.
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley // *Hereditas.* 1993. V. 119. P. 187–204.
- Hermesen J.G. Basic information for the use of primary trisomics in genetic and breeding research // *Euphytica.* 1970. V. 19. P. 125–140.
- Holton T.A., Cornish E.C. Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis // *Plant Cell.* 1995. V. 7. P. 1071–1083.
- Kempton J.H. Inheritance of spotted aleurone color in hybrids of chinese maize // *Genetics.* 1919. V. 4. P. 261–274.
- Khlestkina E.K., Tereshchenko O.Y., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids // *Mol. Genet. Genom.* 2009. V. 282. P. 475–485.
- Kong J.-M., Chia L.-S., Goh N.-K. *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins // *Phytochemistry.* 2003. V. 64. P. 923–933.
- Martis M.M., Zhou R., Haseneyer G., Stein N. *et al.* Reticulate evolution of the rye genome // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 3685–3698.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat. 2008. available at <http://www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>
- Melz G. Beiträge zur Genetic des Roggens (*Secale cereale* L.): Diss. B. AdL der DDR. Berlin, 1988. 173 p.
- Melz G., Thiele V. Chromosome locations of genes controlling «purple leaf base» in rye and wheat // *Euphytica.* 1990. V. 49. P. 155–159.
- Miller T.E. The homoeologous relationship between the chromosomes of rye and wheat. Current status // *Can. J. Genet. Cytol.* 1984. V. 26. P. 578–89.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans* // *Plant Cell.* 1990. V. 2. P. 279–289.
- Rümker K. Etude sur le coloris des grains chez le seigle // *IVE Cong. Génét. Paris*, 1911. P. 332–335.
- Treboux O. Beobachtungen über vererbung von kornfarbe und anthocyan beim rogggen // *Z. Pflanzenzücht.* 1925. V. X. P. 288–291.
- Tschermak E. Über Züchtung neuer Getreiderassen mittels künstlicher Kreuzung. II. Kreuzungsstudien am Roggen // *Zeitschrift für das landwirtschaftliche Versuchswesen in Österreich.* 1906. V. 9. P. 699–743.
- Vries de J.N., Sybenga J. Chromosomal location of 17 monogenically inherited morphological markers in rye (*Secale cereale* L.) using the translocation tester set // *Z. Pflanzenzücht.* 1984. V. 92. P. 117–139.
- Watkins R., White W.J. The inheritance of anthocyanins in rye (*Secale cereale* L.) // *Can. J. Genet. Cytol.* 1964. V. 6. P. 403–410.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. Colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology // *Plant Physiol.* 2001. V. 126. P. 485–493.

GENETIC CONTROL OF ANTHOCYANIN COLORATION IN RYE

A.V. Voylokov^{1,2}, A.N. Lykholay^{1,2}, V.G. Smirnov¹

¹ St. Petersburg State University, Department of Genetics and Biotechnology,
St. Petersburg, Russia, e-mail: av_voylokov@mail.ru;

² St. Petersburg Branch of the Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences,
St. Petersburg, Russia

Summary

The authors present their own and literature data on the genetic control of anthocyanin coloration in rye. The concept of the norm for traits of anthocyanin coloration of rye plants is formulated. The analysis of the variability of these traits in inbred lines of winter rye revealed variability in the expression of anthocyanin color in different organs of the plant, which is largely influenced by the environment. For this reason, genetic analysis was performed only for traits with stable manifestation. Six recessive genes *vi1–vi6* were identified, whose homozygous state led to the absence of anthocyanin from the whole plant. Of them, only *vi1* was localized and mapped on chromosome 7R. The dominant *Vs* gene for purple pericarp was mapped on chromosome 2R, and one of two complementary genes for red leaf auricle *R₁*, on chromosome 5R. Data from the literature on the identification and localization of anthocyanin coloration genes in rye are discussed in connection with the prospects for further research in this direction.

Key words: rye, anthocyanin coloration, variability, genetic analysis, gene mapping.

УДК 575.1:577.15:633.111

ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ ПШЕНИЦЫ

© 2014 г. Е.К. Хлесткина, О.Ю. Шоева, Е.И. Гордеева

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 9 октября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

Биосинтез флавоноидных соединений – один из наиболее хорошо изученных метаболических путей растений. Внимание исследователей к биохимическим, физиологическим и генетическим аспектам биосинтеза флавоноидов связано в первую очередь с широким спектром их биологических свойств. Кроме того, система генов биосинтеза флавоноидов является отличной генетической моделью. Благодаря развитию методов молекулярной генетики и геномики в течение последних лет удалось существенно продвинуться в понимании молекулярно-генетических механизмов, контролирующих биосинтез флавоноидов у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). В настоящей статье проводится краткий обзор результатов работ, посвященных анализу структурной и функциональной организации генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и ее сородичей.

Ключевые слова: вторичные метаболиты, фенольные соединения, флавоноиды, антоцианы, проантоцианидины, регуляторные гены, структурные гены, клонирование генов, секвенирование, картирование, экспрессия генов.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ФЛАВОНОИДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ

Флавоноиды занимают важное место среди огромного числа соединений растительного происхождения, обозначаемых вторичными метаболитами. Система генов биосинтеза флавоноидов, и в частности флавоноидных пигментов, сыграла неопределимую роль при открытии ряда биологических закономерностей: с ее помощью были описаны основные законы наследования, открыты мобильные элементы и парамутации, выявлены особенности организации метаболических путей и регуляции экспрессии генов растений, обнаружено явление генного сайленсинга (McClintock, 1956; Brink, 1956, 1973; Napoli *et al.*, 1990; Krol *et al.*, 1990; Hollick *et al.*, 1995, 1997; Stam, Scheid, 2005; Hale *et al.*, 2007; Quattrocchio *et al.*, 2008; Winkel, 2008).

Будучи постоянными и универсальными компонентами растительных тканей, флавоноиды несут значительную функциональную нагрузку, а именно играют важную роль в раз-

витии растений, защите их от патогенов и неблагоприятных климатических факторов, а также выполняют сигнальные функции (Новотельнов, Ежов, 1954; Freed *et al.*, 1976; Debeaujon *et al.*, 2000; Peer, Murphy, 2008).

Значительное повышение концентрации флавоноидов может свидетельствовать о наличии негативного воздействия среды на организм растения (Chalker-Scott, 1999; Farrant, 2000; Nozzolillo *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2002; Lachman *et al.*, 2005; Nagata *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2009; Gordeeva *et al.*, 2013; Khlestkina, 2013). Влияние неблагоприятных условий окружающей среды приводит к развитию окислительного стресса в клетках растений, а флавоноидные соединения способны противодействовать окислительному стрессу или предупреждать его развитие, защищая тем самым различные клеточные структуры от разрушения. Кроме того, некоторые флавоноиды обладают антимикробными свойствами (см. обзор Khlestkina, 2013).

Огромное разнообразие флавоноидных соединений достигается с помощью согласованного действия свыше 20 ферментов, которые,

действуя поочередно, сначала синтезируют халконы, а затем дают начало различным классам и различным представителям внутри каждого класса (Jende-Strid, 1993; Winkel-Shirley, 2001a, 2002; Winkel, 2008).

Из 12 основных классов флавоноидов 8 (флавоны, флавонолы, ауроны, халконы, флаван-4-олы, катехины, лейкоантоцианидины, проантоцианидины) являются или пигментами, или предшественниками других флавоноидных пигментов. Желтой и/или оранжевой окраской обладают флавоны, гликозиды флавонолов, ауроны и халконы. Красно-коричневые пигменты представлены флорафенами (производными флаван-4-олов) или проантоцианидинами (производными катехинов и лейкоантоцианидинов). Широкую гамму пигментов от розового до красного, синего и фиолетового обеспечивают антоцианидины и их производные антоцианы (Запрометов, 1974, Бриттон, 1986, Winkel-Shirley, 2001a).

У пшеницы накопление флавоноидных пигментов в отдельных тканях влияет на хозяйственно ценные признаки. Например, красная окраска зерна, связанная с высоким содержанием продуктов окисления танинов, создающих водонепроницаемый барьер, препятствует прорастанию зерна на корню (Freed *et al.*, 1976), а сорта пшеницы с красной окраской колоса отличаются большей приспособленностью в регионах с недостаточной теплообеспеченностью вегетационного периода по сравнению с белоколосыми сортами пшеницы (Darwin, 1883; Синская, 1925; Якубцинер, Савицкий, 1947; Мартынов, Добротворская, 1997). Продукты зерновых злаков, содержащих флавоноидные пигменты, в настоящее время все чаще рассматриваются как дополнительные источники антиоксидантных соединений, употребляемых в пищу и необходимых для здоровья человека (Kniewel *et al.*, 2009).

КЛАССИФИКАЦИЯ ГЕНОВ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ РАСТЕНИЙ

В биосинтезе флавоноидов участвуют две основные группы генов: структурные гены, кодирующие необходимые для биосинтеза ферменты, и регуляторные гены, контролирующие

тканеспецифичную экспрессию структурных генов (Winkel-Shirley, 2001b; Jaakola *et al.*, 2002). У многих видов растений описаны мутантные линии, например у ячменя (Jende-Strid, 1993), кукурузы (Dooner *et al.*, 1991), арабидопсиса (Koorneef, 1990; Shirley *et al.*, 1992, 1995; Kubo *et al.*, 1999), в которых биосинтез флавоноидных пигментов блокирован из-за повреждений генов биосинтеза флавоноидов. Наличие таких мутантных линий позволило существенно ускорить выделение нуклеотидных последовательностей структурных и регуляторных генов биосинтеза. Кроме структурных и регуляторных генов, участвующих в биосинтезе флавоноидов, выявлены гены, кодирующие белки-транспортеры, обеспечивающие внутриклеточный транспорт флавоноидных соединений, в частности транспортеры, необходимые для перемещения молекул антоцианов в вакуоли (Chopra *et al.*, 2008).

В отличие от диплоидных видов растений у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) так и не были выделены мутантные линии, в которых был бы полностью блокирован биосинтез флавоноидных пигментов. Это обусловлено аллополиплоидной (гексаплоидной) природой мягкой пшеницы ($2n = 6x = 42$, ВВААDD), в связи с чем каждый ген в геноме пшеницы представлен как минимум тремя ортологичными (гомеологичными) копиями. Функциональная мутация в одной или даже двух гомеологичных копиях одного и того же гена не может иметь проявления на фенотипическом уровне, благодаря полноценной работе другой (других) копии данного гена. Это справедливо в отношении медленно эволюционирующих структурных генов биосинтеза флавоноидов. В отличие от структурных генов регуляторные гены эволюционируют с большей скоростью (Rauscher, 2008), что объясняет более высокую встречаемость мутантных аллелей регуляторных генов. Различные сочетания аллелей регуляторных генов лежат в основе наблюдаемого разнообразия сортов мягкой пшеницы по признакам окраски. Большинство известных на данный момент генов, определяющих фенотип пшеницы по признакам окраски, представлены в виде гомеологичных копий в субгеномах А, В и D (табл. 1).

Развитие методов структурно-функциональной геномики позволило в настоящее время выйти на новый уровень изучения генов био-

Таблица 1

Гены, определяющие фенотип пшеницы по признакам окраски, их геномная и хромосомная локализация (в скобках) у разных видов

Обозначение признака на русском/английском языке	Геном А	Геномы В или S	Геном D
Красная окраска зерна/Red grain	<i>R-A1</i> (3A) ^{Ta, Td}	<i>R-B1</i> (3B) ^{Ta, Td}	<i>R-D1</i> (3D) ^{Ta, At}
Красная, черная или серо-дымчатая окраска колоса/ Red, black or smokey-grey glume	<i>Rg-A1</i> (1A) ^{Ta, Td, Tt, Tm}	<i>Rg-B1</i> (1B) ^{Ta, Td}	<i>Rg-D1</i> (1D) ^{Ta, At}
Красная или черная окраска остей/ Red or black awns	<i>QRaw.ipk-1A</i> (1A) ^{Td} и <i>Bla1</i> (1A) ^{Td}	<i>QRaw.ipk-1B</i> (1B) ^{Td}	<i>QRaw.ipk-1D</i> (1D) ^{At}
Красная окраска coleoptile/ Red coleoptile	<i>Rc-A1</i> (7A) ^{Ta, Td, Tb}	<i>Rc-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Rc-S1</i>	<i>Rc-D1</i> (7D) ^{Ta, At}
Пурпурная окраска стебля/ Purple culm	<i>Pc-A1</i> (7A) ^{Ta}	<i>Pc-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Pc-S1</i> (7S) ^{As}	<i>Pc-D1</i> (7D) ^{Ta}
Пурпурная окраска пыльников/ Purple anther	<i>Pan-A1</i> (7A) ^{Td}	<i>Pan-S1</i> (7S) ^{As}	<i>Pan-D1</i> (7D) ^{Ta}
Пурпурная окраска листовых пластинок/ Purple leaf blade	<i>Plb-A1</i> (7A) ^{Ta}	<i>Plb-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Plb-S1</i> (7S) ^{As}	<i>Plb-D1</i> (7D) ^{Ta}
Пурпурная окраска листовых влагалищ/ Purple leaf sheath	<i>Pls-A1</i> (7A) ^{Ta}	<i>Pls-B1</i> (7B) ^{Ta, Td} и <i>Pls-S1</i> (7S) ^{As}	<i>Pls-D1</i> (7D) ^{Ta}
Пурпурная окраска перикарпа/ Purple pericarp	* <i>Pp-A1</i> (7A) ^{Ta} и <i>Pp3</i> (2A) ^{Ta, Td, Tt}	<i>Pp-B1</i> (7B) ^{Td} и <i>Pp-S1</i> (7S) ^{As}	<i>Pp-D1</i> (7D) ^{Ta}
Пурпурная окраска колоса/Purple glume	<i>Pg</i> (2A) ^{Td}	Нет	Нет
Красная окраска ушек листового влагалища/Red auricle	Нет	<i>Ra2</i> (4B) ^{Ta} и <i>Ra3</i> (6B) ^{Ta}	** <i>Ra-D1</i> (7D) ^{Ta}
Голубая окраска алейронового слоя зерна/ Blue aleurone	<i>Ba</i> (4A) ^{Tb}	Нет	Нет

Примечание. Модифицировано по: Хлесткина (2012). * Gordeeva *et al.* (2014); ** Khlestkina *et al.* (2014).
^{Ta} – *T. aestivum*, ^{Tb} – *T. boeoticum*, ^{Td} – *T. durum*, Tm – *T. monococcum*, ^{Tt} – *T. timopheevii*, ^{Tu} – *T. urartu*, ^{As} – *Ae. speltoides*,
^{At} – *Ae. tauschii*.

синтеза флавоноидов: выделены нуклеотидные последовательности некоторых структурных и регуляторных генов, изучена их структурно-функциональная организация, показано, что регуляция биосинтеза флавоноидов у пшеницы имеет свои специфические особенности по сравнению с ранее изученными модельными видами растений.

СТРУКТУРНЫЕ ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ ПШЕНИЦЫ

Pal, *C4h*, *4Cl*, *Chs*. Предшественниками всех флавоноидных соединений являются халконы, синтез которых начинается с фенилаланина и происходит при участии четырех структурных

генов, *Pal*, *C4h*, *4Cl* и *Chs*, кодирующих ферменты фенилаланинаммиаклиазу (PAL), циннамат 4-гидроксилазу (C4H), 4-кумарат:КоА лигазу (4CL) и халконсинтазу (CHS) соответственно (рис.). У пшеницы идентифицировано по 6 копий каждого из двух генов, *Pal* и *Chs*, выделены частичные последовательности отдельных копий (табл. 2). Гены *C4h* и *4Cl* остаются у пшеницы неизученными.

Из халконов образуются все остальные классы флавоноидных соединений (рис.), среди них относительно хорошо изучены с генетической точки зрения пути биосинтеза антоцианов и проантоцианидинов. Начальные этапы синтеза этих соединений проходят при участии одних и тех же основных генов: *Chi*, *F3h*, *Dfr*.

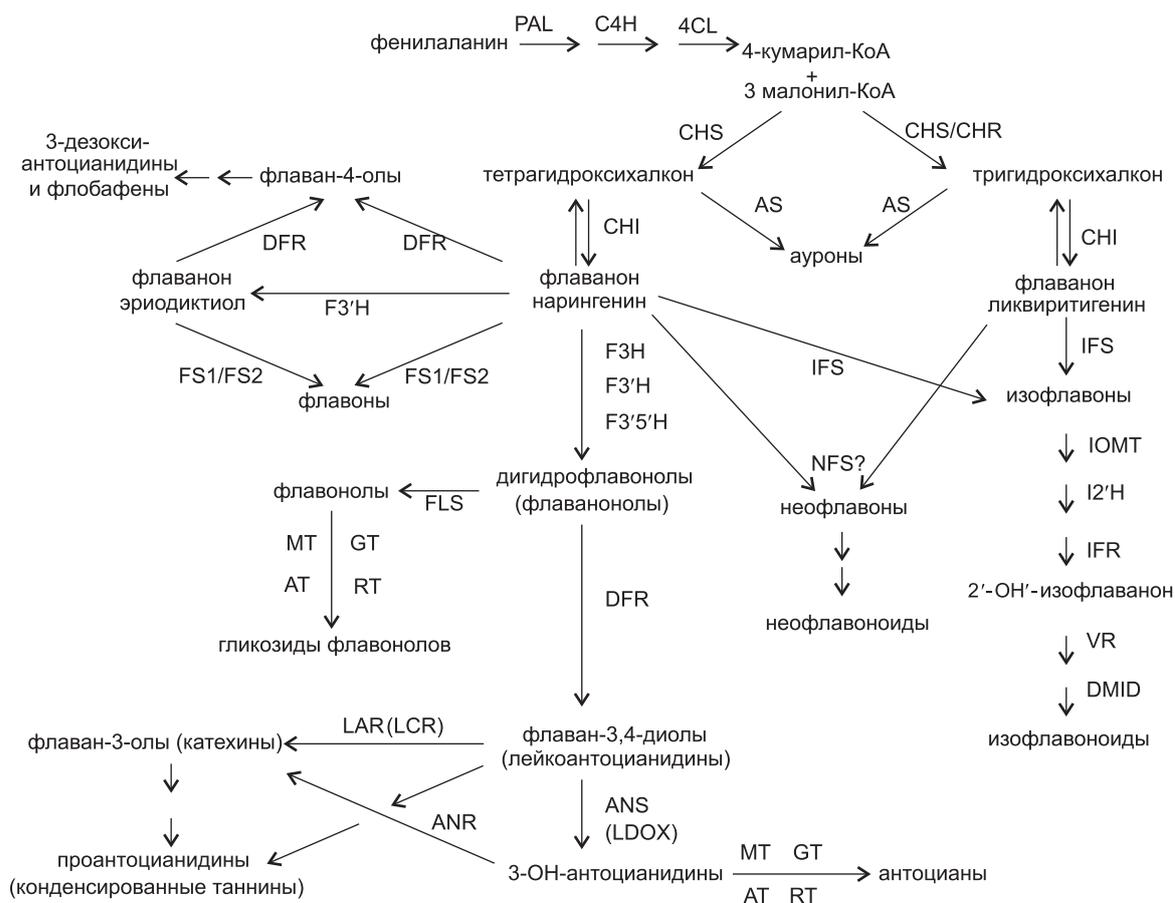


Рис. Схема биосинтеза флавоноидных соединений.

4CL – 4-кумарат:КоА лигаза; ANR – антоцианидинредуктаза; ANS (LDOX) – антоцианидинсинтаза (лейкоантоцианидиндиоксигеназа); AS (AUS) – ауреузидинсинтаза; AT – ацетилтрансфераза; CHI – халконфлаванонизомераза; CHR – халконредуктаза; C4H – циннамат-4-гидроксилаза; CHS – халконсинтаза; DFR – дигидрофлавонол-4-редуктаза; DMID – 7,2'-дигидрокси-4'-метоксиизофлаванолдегидратаза; F3H – флаванон-3-гидроксилаза; F3'H – флавоноид-3'-гидроксилаза; F3'5'H – флавоноид-3',5'-гидроксилаза; FLS – флавонолсинтаза; FS (FNS) – флавоносинтаза; GT – гликозилтрансфераза; I2'H – изофлаван-2'-гидроксилаза; IFR – изофлаванредуктаза; IFS – изофлавоносинтаза; IOMT – изофлаван-О-метилтрансфераза; LAR (LCR) – лейкоантоцианидинредуктаза; MT – метилтрансфераза; NFS – нефлавоносинтаза; PAL – фенилаланинаммиакилаза; RT – рамнозилтрансфераза; VR – веститонредуктаза. Схема построена при использовании данных Бриттон (1986), Jende-Strid (1993), Winkel-Shirley (2002), Winkel (2008), Flavonoid pharmacokinetics (2013).

Chi. Для превращения халконов в флаваноны необходима экспрессия гена *Chi*, кодирующего фермент халконфлаванонизомеразу (CHI) (рис.). В геноме мягкой пшеницы выявлено три копии гена *Chi*, локализованные в хромосомах 5A, 5B и 5D (Li *et al.*, 1999). Недавно из генома пшеницы были выделены полноразмерные нуклеотидные последовательности трех копий гена *Chi* (Shoeva *et al.*, 2014a). Выделенные гены *Chi-A1*, *Chi-B1*, *Chi-D1* картированы в ортологичных районах длинных плеч хромосом 5A, 5B, 5D мягкой пшеницы. Показано, что каждая из выделенных копий является функционально

активной, но в некоторых случаях наблюдаются геном-специфичные особенности регуляции *Chi-1* в ответ на стресс, в частности в ответ на солевой стресс в корнях пшеницы активно экспрессируется *Chi-D1*. Кроме того, наблюдается умеренная активность А-геномной копии этого гена, тогда как третья копия, *Chi-B1*, не экспрессируется (Shoeva *et al.*, 2014a).

Помимо генов *Chi* мягкой пшеницы, выделены и картированы ортологичные гены ее сородичей: *Chi-A1* диплоидной пшеницы *T. urartu*, *Chi-G1* тетраплоидной пшеницы *T. timopheevii*, *Chi-S1* донора В-генома пшеницы

Таблица 2

Клонированные и/или картированные к настоящему времени структурные и регуляторные гены биосинтеза флавоноидов пшеницы

Обозначение гена	Число локусов в геноме пшеницы	Хромосомная/внутрихромосомная локализация	Полностью или частично секвенированные копии (номер в базе данных NCBI)
Структурные гены			
<i>Pal</i>	6	3A, 3B, 3D, 6A, 6B, 6D (Li <i>et al.</i> , 1999)	X99705 (Liao <i>et al.</i> , 1996; Li, Liao, 2003)
<i>Chs</i>	6	1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2D (Li <i>et al.</i> , 1999)	AY286093, AY286095, AY286096, AY286097 (Yang <i>et al.</i> , 2004)
<i>Chi</i>	3	5A, 5B, 5D (Li <i>et al.</i> , 1999) 5AL-7, 5BL-9, 5DL-5 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014a)	JN 039037, JN 039038, JN 039039 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014a)
<i>F3h</i>	4	2A/2AL-3, 2B/2BL-6 (2 копии), 2D/2DL-6 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2008)	EF463100, DQ233636, EU402957, JN384122 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2008, 2013)
<i>F3'5'h</i>	Точное число неизвестно	–	AY519468; (Yang <i>et al.</i> , 2004)
<i>Dfr</i> (<i>TaDfr</i>)	3	3A/3AL-3, 3B/3BL-4, 3D/3DL-1 (Himi, Noda, 2004; Munkvold <i>et al.</i> , 2004)	AB162138, AB162139, AB162140; (Himi, Noda, 2004)
<i>Ans</i>	Не менее 5	6A (2 локуса), 6B (2 локуса), 6D (Himi <i>et al.</i> , 2006)	AB247917, AB247918, AB247919, AB247920, AB247921 (Himi <i>et al.</i> , 2006)
<i>Mt</i> (<i>Fmt</i>)	3	1A, 1B, 1D (Li <i>et al.</i> , 1999)	–
<i>Rt</i> (<i>3Rt</i>)	Точное число неизвестно	5B, 5D (Khlestkina <i>et al.</i> , 2009a)	EU815627 (Khlestkina <i>et al.</i> , 2009a)
Регуляторные гены			
<i>Myc</i> (<i>TaMyc</i>)	Не менее 4	2A (2 копии), 2B, 2D (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c)	KJ747954 (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c)
<i>Myb10</i> (<i>Tamyb10</i>)	3	3A, 3B, 3D (Himi <i>et al.</i> , 2011)	AB191458, AB191459, AB191460 (Himi <i>et al.</i> , 2011)
<i>Mpc1</i>	6	5A, 4B, 4D, 7A, 7B, 7D (Li <i>et al.</i> , 1999)	–

Aegilops speltoides и *Chi-D1* донора D-генома пшеницы *Ae. tauschii* (Shoeva *et al.*, 2014a, b), а также ген *Chi-RI* ржи посевной *Secale cereale* (Khlestkina, Shoeva, 2014).

Обнаружены некоторые особенности эволюции гена *Chi* у злаков. В отличие от большинства однодольных и двудольных видов растений, имеющих 4 экзона и 3 интрона, у злаков трибы Triticeae наблюдается отсутствие третьего интрона гена *Chi*. Вероятно, элиминация данного интрона произошла на начальном этапе эволюции злаков Triticeae. Кроме этого, у ржи утерян

еще и первый интрон (Khlestkina, Shoeva, 2014; Shoeva *et al.*, 2014a). Причина потери интронов гена *Chi* остается невыясненной. По одной из гипотез, элиминация интронов может быть связана с оптимизацией времени, затрачиваемого на транскрипцию и процессинг генов, участвующих в адаптации организмов к экстремальным условиям внешней среды (Shoeva *et al.*, 2014a).

***F3h*, *F3'h*, *F3'5'h*.** Из флаванона при участии гена *F3h*, кодирующего флаванон-3-гидроксилазу (F3H), образуются дигидрофлавонолы (рис.). В образовании различных представителей

дигидрофлавонолов участвуют также гены *F3h* (кодирует флавоноид-3'-гидроксилазу, F3'H) и *F3'5'h* (кодирует флавоноид-3'5'-гидроксилазу, F3'5'H). Эти гены в отличие от *F3h* остаются у пшеницы практически неизученными – выделена лишь одна нуклеотидная последовательность, соответствующая *F3'5'h* (табл. 2).

Из генома пшеницы выделены четыре копии гена *F3h*: три гомеологичные копии, картированные в длинных плечах хромосом 2A (*F3h-A1*), 2B (*F3h-B1*) и 2D (*F3h-D1*), для которых характерны высокая идентичность структурной организации и схожая регуляция экспрессии, и одна паралогичная копия в хромосоме 2B (*F3h-B2*), локализованная в 40 сМ от *F3h-B1* и имеющая существенные отличия от генов *F3h-1* в структурно-функциональной организации (Khlestkina *et al.*, 2008, 2011, 2013). Кроме того, выделены нуклеотидные последовательности из геномов следующих сородичей пшеницы: *T. urartu* (*F3h-A1*), *Ae. speltoides* (*F3h-S1* и *F3h-S2*), *Ae. tauschii* (*F3h-D1*), *T. timopheevii* (*F3h-G2*) и *S. cereale* (*F3h-R1* и *F3h-R2*) (Khlestkina *et al.*, 2008, 2009a, 2011, 2013).

У большинства видов растений ген, кодирующий фермент F3H, присутствует в виде единичной копии. Однако в геномах В и G различных полиплоидных видов пшеницы и у предка геномов В и G *Ae. speltoides*, а также в геноме R ржи посевной выявлено по 2 копии данного гена (Khlestkina *et al.*, 2013). Кластерный анализ дублированных генов *F3h* в различных геномах злаков, а также скрининг около 100 образцов 24 видов трибы Triticeae позволил заключить, что паралог *F3h-2* появился у общего предка данной трибы, а затем у большинства видов подвергся псевдогенизации, сохранившись лишь в геномах В, G, S и R (Khlestkina *et al.*, 2013). Установлено, что у растений, имеющих один из данных геномов, дублированный ген *F3h-2* специфически транскрибируется в корнях и неактивен в перикарпе зерновки, стебле, coleoptile и листе, где экспрессируется основной ген *F3h-1*, который наоборот неактивен в корнях. *F3h-2* мало отличается от исходной последовательности *F3h-1* в области экзонов и кодирует функциональный фермент F3H. Гораздо более существенные отличия выявлены в структуре промоторов *F3h-1* и *F3h-2*. Возможно, именно тканевая специализация поз-

волила паралогичной копии *F3h-2* сохраниться в геномах В, G, R и S, тогда как у многих других видов Triticeae дублированный ген подвергся псевдогенизации (Шоева, Хлесткина, 2013; Khlestkina *et al.*, 2013).

Dfr. При участии гена *Dfr*, кодирующего дигидрофлавонол-4-редуктазу (DFR), происходит восстановление дигидрофлавонолов до образования лейкоантоцианидинов (рис. 1), которые, в свою очередь, преобразуются в антоцианидины (предшественники антоцианов) или флаван-3-олы (предшественники проантоцианидинов). Ген *Dfr* представлен в геноме пшеницы тремя копиями, локализованными в длинных плечах хромосом 3A, 3B и 3D (Himi, Noda, 2004; Munkvold *et al.*, 2004). Были выделены полно-размерные нуклеотидные последовательности данных генов пшеницы (Himi, Noda, 2004), показаны тканеспецифичные особенности регуляции каждой из копий (Himi, Noda, 2004) и выявлена взаимосвязь некоторых аллелей генов *Dfr* с устойчивостью пшеницы к прорастанию на корню (Bi *et al.*, 2014).

Ans, Anr, Lar. Преобразование лейкоантоцианидинов в антоцианидины осуществляется при участии гена *Ans* (рис.), кодирующего антоцианидинсинтазу (ANS). Установлено, что в геноме мягкой пшеницы присутствуют не менее пяти копий гена *Ans*, выделены их нуклеотидные последовательности, локализованные в хромосомах 6A (2 локуса), 6B (2 локуса) и 6D (1 локус) (табл. 2). Детальный анализ структурно-функциональной организации каждой копии данного гена не проводился, однако изучена общая экспрессия гена *Ans* в различных тканях пшеницы и выявлено увеличение уровня транскрипции в тканях, окрашенных антоцианами (Tereshchenko *et al.*, 2013). Частичная последовательность гена *Ans* выделена также из генома ржи, установлена ее локализация в длинном плече хромосомы 6R (Khlestkina *et al.*, 2009a).

Проантоцианидины являются продуктами полимеризации и окисления флаван-3-олов (рис.), которые, в свою очередь, образуются либо из лейкоантоцианидинов, благодаря экспрессии гена *Lar*, кодирующего лейкоантоцианидинредуктазу (LAR), либо из антоцианидинов при участии гена *Anr*, кодирующего антоцианидинредуктазу (ANR). О числе копий данных генов в геноме пшеницы, их локализа-

ции и структурно-функциональной организации пока ничего не сообщалось.

Mt, Gt, At, Rt. Антоцианы являются продуктами модификации (метиляции, гликозилирования, ацетилирования и/или рамнозилирования) антоцианидинов при участии генов *Mt*, *Gt*, *At* и *Rt*, кодирующих ферменты метилтрансферазы (MT), гликозилтрансферазы (GT), ацетилтрансферазы (AT) и рамнозилтрансферазы (RT) соответственно (рис.). В отношении перечисленных генов некоторые сведения накоплены лишь о *Mt* (*Fmt*) и *Rt* (*3Rt*) (табл. 2). В частности, ортологичные копии гена *3Rt* картированы в длинных плечах хромосом 5 у пшеницы и ржи и выявлено близкое расположение двух структурных генов биосинтеза флавоноидов *3Rt* и *Chi* (Khlestkina *et al.*, 2009a; Shoeva *et al.*, 2014a, b). Известно, что гены эукариот, отвечающие за последовательные стадии метаболического пути, могут находиться в самых разных участках генома, на разных хромосомах, но могут располагаться и рядом. Однако даже гены, локализованные рядом, как правило, регулируются независимо (Campbell *et al.*, 2005).

Несмотря на то что еще не все структурные гены биосинтеза флавоноидов пшеницы в полной мере изучены, имеющихся данных оказалось достаточно для исследования тканеспецифичной экспрессии некоторых генов в различных частях растений, отличающихся по окраске, что сыграло ключевую роль в установлении особенностей организации регуляторной сети биосинтеза флавоноидов.

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ГЕНЫ БИОСИНТЕЗА ФЛАВОНОИДОВ

Наиболее хорошо изученными регуляторными генами биосинтеза флавоноидов являются гены, контролирующие биосинтез пигментов (антоцианов, проантоцианидинов, флорафенов). В регуляции биосинтеза пигментов принимают участие три группы регуляторных факторов: MYB, MYC и WD40. Функциональная роль и взаимодействие этих факторов лучше всего описаны на примере биосинтеза антоцианов (табл. 3).

MYB. Первые MYB-подобные факторы транскрипции, регулирующие биосинтез антоцианов, были открыты в 1987 г. у кукурузы. К

ним относятся факторы, кодируемые генами *C1* (*Colorless 1*), *P1* (*Purple 1*) и *P11* (*Purple leaf 1*) (Paz-Ares *et al.*, 1987; Chandler *et al.*, 1989; Goff *et al.*, 1990; Petroni *et al.*, 2000). У растений в геноме присутствует около 200 различных MYB-подобных генов (Quattrocchio *et al.*, 2008; Dubos *et al.*, 2010). Выделяют четыре класса MYB-подобных факторов транскрипции – 1R (или MYB-родственные), 2R (R2R3-MYB), 3R (R1R2R3-MYB) и 4R (смешанный). Показано, что в биосинтезе антоцианов участвуют R2R3-MYB-факторы (Stracke *et al.*, 2001). На основании гомологии с генами *C1* и *P11* кукурузы были выделены R2R3-MYB-кодирующие гены биосинтеза антоцианов из геномов других растений (табл. 3). Из генома пшеницы гомологичные нуклеотидные последовательности еще не выделены, однако путем гибридизации ДНК гена *C1* кукурузы с геномной ДНК нуллитетрасомных линий пшеницы установлено присутствие высокогомологичных последовательностей, обозначенных *Mpc1*, в хромосомах 4B, 4D, 5A, 7A, 7B, 7D (Li *et al.*, 1999). Данные последовательности, очевидно, соответствуют двум паралогичным генам, представленным в виде трех гомеологичных копий каждый. При этом копия в хромосоме 7D была картирована в коротком плече (Li *et al.*, 1999) в районе, совпадающем с местом локализации кластера генов, детерминирующих антоциановую окраску различных органов пшеницы (листа, *P1b-D1* и *P1s-D1*, стебля, *Pc-D1*, колеоптиле, *Rc-D1*, перикарпа, *Pp-1*, ушек, *Ra-D1*, пыльников, *Pan-D1*) (Khlestkina *et al.*, 2009b, 2010a, 2014; Tereshchenko *et al.*, 2012). Кроме того, показано, что гены, детерминирующие окраску, определяют активность структурных генов биосинтеза антоцианов в соответствующих органах (Khlestkina *et al.*, 2008, 2009a, 2010b, 2014; Tereshchenko *et al.*, 2013). В совокупности имеющиеся данные позволяют отнести гены *P1b-1*, *P1s-1*, *Pc-1*, *Rc-1*, *Pp-1*, *Ra-1*, *Pan-1* пшеницы к семейству R2R3-MYB-кодирующих регуляторных генов биосинтеза антоцианов.

Также установлено, что другой фактор, принадлежащий семейству MYB, участвует в регуляции биосинтеза проантоцианидинов в семенной оболочке пшеницы и кодируется генами *R-A1*, *R-B1* и *R-D1*, локализованными в хромосомах 3A, 3B и 3D (Himi *et al.*, 2005; Himi,

Таблица 3

Характеристики регуляторных факторов, участвующих в биосинтезе антоцианов и кодирующие их гены в геномах основных модельных видов растений, а также в геноме пшеницы

Тип регуляторных факторов	MYC (bHLH)		MYB		WD40	
Роль фактора в регуляции биосинтеза	Определение тканеспецифичности биосинтеза антоцианов (Taylor, Briggs, 1990)		Светозависимая регуляция биосинтеза (Taylor, Briggs, 1990)		Стабилизация комплекса MYB-bHLH (de Vetten <i>et al.</i> , 1997)	
Структурный элемент и его функциональное значение	N-конец (а.о. 1–200)	Взаимодействие с MYB (Goff <i>et al.</i> , 1992)	N-конец (а.о. 1–52, повторы R2R3)	Связывание ДНК и димеризация (Romero <i>et al.</i> , 1998)	N-конец (повтор GH)	Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker, Ludwig, 2003)
	N-конец (а.о. 201–400)	Взаимодействие с WD40 и/или комплексом RNApolIII (Férré-d'Amaré <i>et al.</i> , 1994)				
	bHLH-домен	Связывание ДНК и димеризация (Heim <i>et al.</i> , 2003)	С-конец	Регуляция экспрессии генамишени (Stracke <i>et al.</i> , 2001)	С-конец (повтор WD)	Связывание ДНК и белков мишеней (Van Nocker, Ludwig, 2003)
	С-конец	Димеризация (Payne <i>et al.</i> , 2000)				
Вид	Гены, кодирующие перечисленные факторы у разных видов растений					
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heinh.	<i>TT8</i> (Nesi <i>et al.</i> , 2000) <i>GL3/EGL3</i> (Bernhardt <i>et al.</i> , 2003; Heim <i>et al.</i> , 2003; Zhang <i>et al.</i> , 2003)		<i>TT2</i> , <i>CPC</i> (Borevitz <i>et al.</i> , 2000; Gonzalez <i>et al.</i> , 2008) <i>MYBL2</i> (Dubos <i>et al.</i> , 2008; Matsui <i>et al.</i> , 2008)		<i>TTG1</i> (Walker <i>et al.</i> , 1999)	
<i>Petunia hybrida</i> L.	<i>AN1</i> , <i>JAF13</i> (Llyod <i>et al.</i> , 1992; Quattrocchio <i>et al.</i> , 1998; Spelt <i>et al.</i> , 2000)		<i>AN2</i> , <i>AN4</i> (Quattrocchio <i>et al.</i> , 1999, 2006)		<i>AN11</i> (de Vetten <i>et al.</i> , 1997)	
<i>Zea mays</i> L.	<i>B</i> , <i>R</i> , <i>Lc</i> , <i>Sn</i> , <i>In1</i> (Burr <i>et al.</i> , 1996; Chandler <i>et al.</i> , 1989; Goff <i>et al.</i> , 1990; Consonni <i>et al.</i> , 1993; Petroni <i>et al.</i> , 2000)		<i>C1</i> , <i>P11</i> , <i>P1</i> (Paz-Ares <i>et al.</i> , 1987; Chandler <i>et al.</i> , 1989; Goff <i>et al.</i> , 1990; Petroni <i>et al.</i> , 2000)		<i>PAC1</i> (Selinger, Chandler, 1999)	
<i>Triticum aestivum</i> L.	<i>TaMycl</i> (Shoeva <i>et al.</i> , 2014c)		<i>Mpcl</i> (Li <i>et al.</i> , 1999)		–	

Примечание. а.о. – аминокислотные остатки.

Noda, 2005). Показана взаимосвязь между присутствием рецессивного аллеля в локусе *R-B1* и наличием 19-нуклеотидной делеции в последовательности MYB-фактора (*Tamyb10-B1*), приводящей к сдвигу рамки считывания (Himi, Noda, 2005; Himi *et al.*, 2011).

MYC. Другая большая группа регуляторных факторов, контролирующих биосинтез антоцианов, относится к MYC-подобным регуляторным факторам, которые принадлежат к группе регу-

ляторных факторов с bHLH доменом (основным спираль-петля-спираль доменом), распознающим ДНК. Первые MYC-подобные факторы транскрипции, участвующие в биосинтезе антоцианов, были открыты в 1989 г. у кукурузы и представляют собой члены В/Р семейства. Позже на основании гомологии были выделены другие члены данного семейства из геномов кукурузы и других растений (табл. 3). Исследование данных факторов *in vitro* показало, что они способны

активировать транскрипцию генов-мишеней самостоятельно либо в комплексе с MYB-подобными факторами, что зависит от промотора гена-мишени (Mol *et al.*, 1998).

Недавно была впервые выделена и отсекуирована полноразмерная геномная нуклеотидная последовательность гена мягкой пшеницы *TaMyc1*, кодирующая MYC-подобный регуляторный фактор. Установлено, что транскрипционная активность гена *TaMyc1* повышена в тканях пшеницы, окрашенных антоцианами, причем наиболее высокий уровень экспрессии наблюдается в пигментированном перикарпе зерна. В геноме мягкой пшеницы данный ген имеет не менее четырех копий, картированных в длинных плечах хромосом второй гомеологической группы, однако в перикарпе экспрессируется только *TaMyc1*, который локализуется с одним из генов, детерминирующих антоциановую окраску перикарпа, *Pp3* (Shoeva *et al.*, 2014c). Сравнение экспрессии *TaMyc1* в перикарпе изогенных линий, несущих различные комбинации аллелей *Pp*, показало, что MYB-кодирующий ген *Pp-D1* частично супрессирует ген *TaMyc1* (Shoeva *et al.*, 2014c). Таким образом, впервые у растений показано, что между регуляторными генами биосинтеза антоцианов существует взаимная регуляция: MYB-кодирующий ген может вызывать частичную супрессию MYC-кодирующего гена. При этом для биосинтеза антоцианов в перикарпе пшеницы требуется комплементарное взаимодействие продуктов генов *Pp-D1* и *Pp3* (Tereshchenko *et al.*, 2012).

WD40. Третья группа факторов, регулирующих биосинтез антоцианов, WD40, содержит белковые повторы, консервативные для животных, растений и дрожжей (Smith *et al.*, 1999). Первый представитель данной группы у растений, *An11*, был описан у петунии. Данный ген кодирует небольшой полипептид с 5–6 консервативными WD-повторами (de Vetten *et al.*, 1997). Мутации в данном гене связаны с отсутствием пигментации. Позднее на основании гомологии были описаны регуляторные гены семейства WD40 у других растений (табл. 3). Из генома пшеницы гомологичные нуклеотидные последовательности пока еще не выделены.

Существенную роль в изучении регуляторных генов пшеницы играет сравнительное исследование генетически и цитологически

маркированных линий (Khlestkina, 2014). В частности, для идентификации и изучения структурно-функциональной организации регуляторных генов биосинтеза флавоноидов *TaMyb10* (Himi, Noda, 2005; Himi *et al.*, 2011) и *TaMyc1* (Shoeva *et al.*, 2014c) важную роль сыграло использование почти изогенных линий пшеницы, различающихся по окраске семенной оболочки и перикарпа соответственно.

В связи со сложной организацией генома пшеницы изучение ее регуляторных генов до настоящего момента происходило с использованием методов прямой генетики: «от признака к гену». В данное время реализуется проект по секвенированию полного генома пшеницы (<http://www.wheatgenome.org/>), бурно развивается приборно-аналитическая база для автоматизированного анализа метаболитов и расширяется спектр эффективных методов направленного изменения нуклеотидных последовательностей *in vivo* (Christian *et al.*, 2010; Cermak *et al.*, 2011; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). В обозримом будущем все это обеспечит возможность широкого использования подходов не только прямой, но и обратной генетики для выделения и детального анализа других регуляторных генов биосинтеза флавоноидов пшеницы и реконструкции регуляторной сети данного метаболического пути с учетом ее видоспецифичных особенностей.

БЛАГОДАРНОСТИ

Статья подготовлена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ гранта 14-04-31637), программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», гранта Президента Российской Федерации для молодых докторов наук (МД_2615.2013.4) и государственной бюджетной программы VI.53.1.5.

ЛИТЕРАТУРА

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов: Пер. с англ. М.: Мир, 1986. 422 с.
- Запрометов М.Н. Основы биохимии фенольных соединений. М.: Высш. шк., 1974. 214 с.
- Мартынов С.П., Добротворская Т.В. Особенности распространения морфологических признаков колоса мягкой пшеницы на территории бывшего СССР // Генетика. 1997. Т. 33. С. 350–357.
- Новотельнов Н.В., Ежов И.С. Об антибиотических и ан-

- тиокислительных свойствах желтых пигментов зерна // Докл. АН СССР. 1954. Т. 99. С. 297–300.
- Синская Е. О полевых культурах Алтая (краткий отчет о поездке летом 1924 г.) // Тр. прикл. ботан. селекции. 1925. Т. 14. С. 359–376.
- Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. С. 202–216.
- Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. Экспрессия гена *F3h* в различных органах пшеницы // Молекуляр. биология. 2013. Т. 47. С. 1028–1030.
- Якубцинер М.М., Савицкий М.С. Зерновые культуры // Руководство по апробации с.-х. культур. М.: Сельхозгиз, 1947. С. 20.
- Bernhardt C., Lee M.M., Gonzalez A., Zhang F., Lloyd A., Schiefelbein J. The bHLH genes *GLABRA3* (*GL3*) and *ENHANCER OF GLABRA3* (*EGL3*) specify epidermal cell fate in the *Arabidopsis* root // *Development*. 2003. V. 130. P. 6431–6439.
- Bi H.H., Sun Y.W., Xiao Y.G., Xia L.Q. Characterization of *DFR* allelic variations and their associations with pre-harvest sprouting resistance in a set of red-grained Chinese wheat germplasm // *Euphytica*. 2014. V. 195. P. 197–207.
- Borevitz J.O., Xia Y., Blount J., Dixon R.A., Lamb C. Activation tagging identified a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 2383–2393.
- Brink R.A. A genetic change associated with the R locus in maize which is directed and potentially reversible // *Genetics*. 1956. V. 41. P. 872–889.
- Brink R.A. Paramutation // *Annu. Rev. Genet.* 1973. V. 7. P. 129–152.
- Burr F.A., Burr B., Scheffler B.E., Blewitt M., Wienand U., Matz E.C. The maize repressor-like gene *intensifier 1* shares homology with the r1/b7 multigene family of transcription factors and exhibits missplicing // *Plant Cell*. 1996. V. 8. P. 1249–1259.
- Campbell P.N., Smith A.D., Peters T.J. Biochemistry illustrated: Biochemistry and Molecular Biology in the Post-Genomic Era. Edinburgh; N.Y.: Elsevier Churchill Livingstone, 2005. 264 p.
- Cermak T., Doyle E.L., Christian M., Wang L., Zhang Y., Schmidt C., Baller J.A., Somia N.V., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting // *Nucl. Acids Res.* 2011. 39. P. e82.
- Chalker-Scott L. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses // *Photochem. Photobiol.* 1999. V. 70. P. 1–9.
- Chandler V.L., Radicella J.P., Robbins T.P., Chen J., Turks D. Two regulatory genes of the maize anthocyanin pathway are homologous: isolation of B utilizing R genomic sequences // *Plant Cell*. 1989. V. 1. P. 1175–1183.
- Chopra S., Hoshino A., Boddu J., Iida S. Flavonoid pigments as tools in molecular genetics // *The Science of Flavonoids* / Ed. E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 147–173.
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases // *Genetics*. 2010. V. 186. P. 757–761.
- Cong L., Ran A.F., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science*. 2013. V. 339. P. 819–823.
- Consonni G., Geuna F., Gavazzi G., Tonelli C. Molecular homology among members of the R gene family in maize // *Plant J*. 1993. V. 3. P. 335–346.
- Darwin C. The variation of animals and plants under domestication. N.Y.: D.Appelton & Co, 1883. 495 p.
- Debeaujon I., Léon-Kloosterziel K.M., Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 403–414.
- 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.
- Dooner H.K., Robbins T.P., Jorgensen R.A. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis // *Annu. Rev. Genet.* 1991. V. 25. P. 173–179.
- Dubos C., Le Gourrierc J., Baudry A., Lanet E., Debeaujon I., Routaboul J.-M., Alboresi A., Weisshaar B., Lepiniec L. MYBL2 is a new regulator of flavonoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J*. 2008. V. 55. P. 940–953.
- Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L. MYB transcription factors in *Arabidopsis* // *Trends Plant Sci.* 2010. V. 15. P. 573–581.
- Farrant J.M. A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species // *Plant Ecol.* 2000. V. 151. P. 29–39.
- Ferré-D'Amaré A.R., Pognonec P., Rüder R.G., Burley S.K. Structure and function of the b/HLH/Z domain of USF // *EMBO J*. 1994. V. 13. P. 180–189.
- Flavonoid Pharmacokinetics / Eds N.M. Davies, J.A. Yanez. Hoboken; New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013. P. 7.
- 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.
- Goff S.A., Cone K.C., Chandler V.L. Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 864–875.
- Gonzalez A., Zhao M., Leavitt J.M., Llyod A.M. Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings // *Plant J*. 2008. V. 53. P. 814–827.
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., E.K. Khlestkina E.K. Cold stress response of wheat genotypes having different *Rc* alleles // *Cereal Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 519–526.
- Gordeeva E.I., Shoeva O.Y., Khlestkina E.K. Marker-assisted development of bread wheat near-isogenic lines carrying various combinations of *Pp* (*purple pericarp*) alleles // *Euphytica*. 2014. DOI: 10.1007/s10681-014-1317-8.
- Hale C.J., Stonaker J.L., Gross S.M., Hollick J.B. A novel Snf2 protein maintains trans-generational regulatory states established by paramutation in maize // *PLoS Biol.* 2007. V. 5. P. e275.
- Heim M.A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P.C. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20.

- P. 735–747.
- 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. 11 p. ID 369460.
- 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., Noda K. Isolation and location of three homoeologous dihydroflavonol-4-reductase (DFR) genes of wheat and their tissue-dependent expression // *J. Exp. Bot.* 2004. V. 55. P. 365–375.
- 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., Osaka T., Noda K. 2006. Isolation and characterization of wheat *ANS* genes. GenBank 2006, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?term=himi%20osaka%20noda&cmd=Search&db=nucore&QueryKey=4]
- Hollick J. B., Dorweiler J.E., Chandler V.L. Paramutation and related allelic interactions // *Trends Genet.* 1997. V. 13. P. 302–308.
- Hollick J.B., Patterson G.I., Coe E.H., Cone K.C., Chandler V.L. Allelic interactions heritably influence the activity of a metastable maize *pl* allele // *Genetics.* 1995. V. 141. P. 709–719.
- Jaakola L., Määttä K., Pirtillä A.M., Törrönen R., Kärenlampi S., Hohtola A. Expression of genes involved in anthocyanin biosynthesis in relation to anthocyanin, proanthocyanidin, and flavonol levels during bilberry fruit development // *Plant Physiol.* 2002. V. 130. P. 729–739.
- Jende-Strid B. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley // *Hereditas.* 1993. V. 119. P. 187–204.
- Khlestkina E.K. The adaptive role of flavonoids: emphasis on cereals // *Cereal Res. Commun.* 2013. V. 41. P. 185–198.
- Khlestkina E.K. Current applications of wheat and wheat-alien precise genetic stocks // *Mol. Breed.* 2014. V. 34. P. 273–281.
- Khlestkina E.K., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A. Diversification of the duplicated *F3h* genes in Triticeae // *J. Mol. Evol.* 2013. V. 76. P. 261–266.
- Khlestkina E.K., Gordееva E.I., Arбузова V.S. Molecular and functional characterization of wheat near-isogenic line ‘i:S29Ra’ having intensive anthocyanin pigmentation of the coleoptile, culm, leaves and auricles // *Plant Breed.* 2014. V. 133. P. 454–458.
- 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. 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., 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.* 2008. V. 8. P. 88.
- Khlestkina E.K., Salina E.A., Matthies I., Leonova I.N., Börner A., Röder M.S. Comparative molecular marker-based genetic mapping of flavanone 3-hydroxylase genes in wheat, rye and barley // *Euphytica.* 2011. V. 179. P. 333–341.
- Khlestkina E.K., Shоеva O.Y. Intron loss in the chalcone-flavanone isomerase gene of rye // *Mol. Breed.* 2014. V. 33. P. 953–959.
- Khlestkina E.K., Tereshchenko O. Yu., Salina E.A. Anthocyanin biosynthesis genes location and expression in wheat-rye hybrids // *Mol. Genet. Genom.* 2009a. V. 282. P. 475–485.
- Kniewel D.C., Abdel-Aal E.M., Rabalski I., Nakamura T., Hucl P. Grain color development and the inheritance of high anthocyanin blue aleurone and purple pericarp in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // *J. Cereal Sci.* 2009. V. 50. P. 113–120.
- Koornneef M. Mutations affecting the testa colour in *Arabidopsis* // *Arabidopsis Inf. Serv.* 1990. V. 27. P. 1–4.
- Krol van der A.R., Mur L.A., de Lange P., Mol J.N., Stuitje A.R. Inhibition of flower pigmentation by antisense *CHS* genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect // *Plant Mol. Biol.* 1990. V. 14. P. 457–466.
- Kubo H., Peeters A.J.M., Aarts M.G.M., Pereira A., Koornneef M. ANTHOCYANINLESS2, a homeobox gene affecting anthocyanin distribution and root development in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1217–1226.
- Lachman J., Dudjak J., Miholová D., Kolihová D., Pivec V. Effect of cadmium on flavonoid content in young barley (*Hordeum sativum* L.) plants // *Plant Soil Environ.* 2005. V. 51. P. 513–516.
- Li W.L., Faris J.D., Chittoor J.M., Leach J.E., Hulbert S.H., Liu D.J., Chen P.D., Gill B.S. Genomic mapping of defense response genes in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V. 98. P. 226–233.
- Li H.P., Liao Y.C. Isolation and characterization of two closely linked phenylalanine ammonia-lyase genes from wheat // *Yi. Chuan. Xue. Bao.* 2003. V. 30. P. 907–912.
- Liao Y.C., Li H.P., Kreuzaler F., Fischer R. Nucleotide sequence of one of two tandem genes encoding phenylalanine ammonia-lyase in *Triticum aestivum* // *Plant Physiol.* 1996. V. 112. No. 3. P. 1398–1398.
- Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W. *Arabidopsis* and *Nicotiana* anthocyanin production activated by maize regulators *R* and *Cl* // *Science.* 1992. V. 258. P. 1773–1775.
- Mali P., Esvelt K.M., Churej G.M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology // *Nature Methods.* 2013. V. 10. P. 957–963.
- Matsui K., Umemura Y., Ohme-Takagi M. AtMYBL2, a protein with a single MYB domain, acts as a negative regulator of anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis* // *Plant J.* 2008. V. 55. P. 954–967.
- McClintock B. Controlling elements and the gene // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1956. V. 21. P. 197–216.
- Mol J., Grotewold E., Koes R. How genes paint flowers and seeds // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 212–217.
- Munkvold J.D., Greene R.A., Bermudez-Kandianis C.E., LaRota C.M., Edwards H., Sorrells S.F., Dake T., Benschler D., Kantety R., Linkiewicz A.M., Dubcovsky J., Akhunov E.D., Dvorak J., Miftahudin, Gustafson J.P., Pathan M.S., Nguyen H.T., Matthews D.E., Chao S., Lazo G.R., Hummel D.D., Anderson O.D., Anderson J.A., Gonzalez-Hernandez J.L., Peng J.H., Lapitan N., Qi L.L., Echalié B.,

- Gill B.S., Hossain K.G., Kalavacharla V., Kianian S.F., Sandhu D., Erayman M., Gill K.S., McGuire P.E., Qualset C.O., Sorrells M.E. Group 3 chromosome bin maps of wheat and their relationship to rice chromosome 1 // *Genetics*. 2004. V. 168. P. 639–650.
- Nagata T., Yamada H., Du Z., Todoriki S., Kikuchi S. Microarray analysis of genes that respond to gamma-irradiation in *Arabidopsis* // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 1022–1030.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 279–289.
- Nesi N., Debeaujon I., Jond C., Pelletier G., Caboche M., Lepiniec L. The *TT8* gene encodes a basic helix-loop-helix domain protein required for expression of *DFR* and *BAN* genes in *Arabidopsis siliques* // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1863–1878.
- Nozzolillo C., Isabelle P., Andersen O.M., Abou-Zaid M. Anthocyanins of jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings // *Can. J. Bot.* 2002. V. 80. P. 796–801.
- Payne C.T., Zhang F., Lloyd A.M. GL3 encodes a bHLH protein that regulates trichome development in *Arabidopsis* through interaction with GL1 and TTG1 // *Genetics*. 2000. V. 156. P. 1349–1362.
- Paz-Ares J., Ghosal D., Wienand U., Peterson P.A., Saedler H. The regulatory *c1* locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to myb proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators // *EMBO J.* 1987. V. 6. P. 3553–3558.
- Peer W.A., Murphy A.S. Flavonoids as signal molecules // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 239–268.
- Petroni K., Cominelli E., Consonni G., Gusmaroli G., Gavazzi G., Tonelli C. The developmental expression of the maize regulatory gene *Hopi* determines germination-dependent anthocyanin accumulation // *Genetics*. 2000. V. 155. P. 323–336.
- Plaza B.M., Jimenez S., Segura M.L., Contreras J.I., Lao M.T. Physiological stress caused by salinity in cordyline fruticosa and its indicators // *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 2009. V. 40. P. 473–484.
- Quattrocchio F., Wing J.F., van der Woude K., Mol J.N.M., Koes R. Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes // *Plant J.* 1998. V. 13. P. 475–488.
- Quattrocchio F., Wing J., van der Woude K., Souer E., de Vetten N., Mol J., Koes R. Molecular analysis of the *anthocyanin2* gene of petunia and its role in the evolution of flower color // *Plant Cell*. 1999. V. 11. P. 1433–1444.
- Quattrocchio F., Verweij W., Kroon A., Spelt C., Mol J., Koes R. PH4 of petunia is an R2R3 MYB protein that activates vacuolar acidification through interactions with basic-helix-loop-helix transcription factors of the anthocyanin pathway // *Plant Cell*. 2006. V. 18. P. 1274–1291.
- Quattrocchio F., Baudry A., Lepiniec L., Grotewold E. The regulation of flavonoid biosynthesis // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 97–122.
- Rausher M.D. The evolution of flavonoids and their genes // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 175–211.
- Romero I., Fuertes A., Benito M.J., Malpica J.M., Leyva A., Paz-Ares J. More than 80 R2R3-MYB regulatory genes in the genome of *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* 1998. V. 14. P. 273–284.
- Ryan K.G., Swinny E.E., Markham K.R., Winefield C. Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves // *Phytochemistry*. 2002. V. 59. P. 23–32.
- Selinger D.A., Chandler V.L. Major recent and independent changes in the levels and patterns of expression have occurred at the *b* gene, a regulatory locus in maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 15007–15012.
- Shirley B.W., Hanley S., Goodman H.M. Effect of ionizing radiation on a plant genome: analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutations // *Plant Cell*. 1992. V. 4. P. 333–347.
- Shirley B.W., Kubasek W.L., Storz G., Bruggemann E., Koornneef M., Ausubel F.M., Goodman H.M. Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 659–671.
- Shoeva O.Y., Dobrovolskaya O.B., Leonova I.N., Salina E.A., Khlestkina E.K. Functional divergence between the B, S and G genomes estimated using wheat introgression lines // *Genetica*. 2014b. Under review.
- Shoeva O.Y., Gordeeva E.I., Khlestkina E.K. The genetic regulation of anthocyanin biosynthesis in wheat pericarp // *Molecules*. 2014c. V. 19. P. 20266–20279.
- Shoeva O.Y., Khlestkina E.K., Berges H., Salina E.A. The homoeologous genes encoding chalcone-flava-none isomerase in *Triticum aestivum* L.: structural characterization and expression in different parts of wheat plant // *Gene*. 2014a. V. 538. P. 334–341.
- Smith T.F., Gaitatzes C., Saxena K., Neer E.J. The WD repeat: a common architecture for diverse functions // *Trends Biochem. Sci.* 1999. V. 24. P. 181–185.
- Spelt C., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. *Anthocyanin1* of petunia encodes a basic helix-loop-helix protein that directly activates transcription of structural anthocyanin genes // *Plant Cell*. 2000. V. 12. P. 1619–1631.
- Stam M., Scheid O.M. Paramutation: an encounter leaving a lasting impression // *Trends Plant Sci.* 2005. V. 10. P. 283–290.
- Stracke R., Werber M., Weisshaar B. The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2001. V. 4. P. 447–456.
- Taylor L.P., Briggs W.R. Genetic regulation and photocontrol of anthocyanin accumulation in maize seedlings // *Plant Cell*. 1990. V. 2. P. 115–127.
- Tereshchenko O.Y., Arbutova V.S., Khlestkina E.K. Allelic state of the genes conferring purple pigmentation in different wheat organs predetermines transcriptional activity of the anthocyanin biosynthesis structural genes // *J. Cereal Sci.* 2013. V. 57. P. 10–13.
- Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbutova V.S., Börner A., Salina E.A., Khlestkina E.K. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat // *Cereal Res. Commun.* 2012. V. 40. P. 334–341.
- Van Nocker S., Ludwig P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function // *BMC Genomics*. 2003. V. 4. P. 50.

- Vetten de N., Quattrocchio F., Mol J., Koes R. The *an11* locus controlling flower pigmentation in petunia encodes a novel WD-repeat protein conserved in yeast, plants and animals // *Genes Dev.* 1997. V. 11. P. 1422–1434.
- Walker A.R., Davison P.A., Bolognesi-Winfield A.C., James C.M., Srinivasan N., Blundell T.L., Esch J.J., Marks M.D., Gray J.C. The *TRANSPARENT TESTA GLABRA1* locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein // *Plant Cell.* 1999. V. 11. P. 1337–1350.
- Winkel-Shirley B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology // *Plant Physiol.* 2001a. V. 126. P. 485–493.
- Winkel-Shirley B. It takes garden. How work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoid metabolism // *Plant Physiol.* 2001b. V. 127. P. 1399–1404.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress // *Cur. Op. Plant Biol.* 2002. V. 5. P. 218–223.
- Winkel B.S.J. The biosynthesis of flavonoids // *The Science of Flavonoids* / Ed. P.E. Grotewold. N.Y.: Springer, 2008. P. 71–95.
- Yang G., Li B., Gao J., Liu J., Zhao X., Zheng Q., Tong Y., Li Z. Cloning and expression of two chalcone synthase and a flavonoid 3'5'-Hydroxylase 3'-end cDNAs from developing seeds of blue-grained wheat involved in anthocyanin biosynthetic pathway // *J. Integr. Plant Biol. (Acta Bot. Sin.)*. 2004. V. 46. P. 588–594.
- Zhang F., Gonzalez A., Zhao M., Payne T., Llyod A. A network of redundant bHLH proteins functions in all TTG1-dependent pathways of *Arabidopsis* // *Development.* 2003. V. 130. P. 4859–4869.

FLAVONOID BIOSYNTHESIS GENES IN WHEAT

E.K. Khlestkina, O.Y. Shoeva, E.I. Gordeeva

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

Summary

The biosynthesis of flavonoid compounds is one of the best-studied metabolic pathways in plants. The researchers' attention to the biochemical, physiological and genetic aspects of flavonoid biosynthesis is associated primarily with the wide range of their biological properties. In addition, the flavonoid biosynthesis gene system is an excellent genetic model. Owing to the development of molecular and genomic methods in recent years, considerable progress is made in the understanding of the molecular and genetic mechanisms underpinning flavonoid biosynthesis in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). This article provides a brief overview of the results of research in the structural and functional organization of flavonoid biosynthesis genes in wheat and its relatives.

Key words: secondary metabolites, phenolic compounds, flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, regulatory genes, structural genes, gene cloning, sequencing, mapping, gene expression.

УДК 573.2:57.017.6

КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ PIN-БЕЛКОВ В ТРАНСПОРТЕ АУКСИНА В КОРНЕ *ARABIDOPSIS THALIANA* L.

© 2014 г. В.В. Коврижных¹, Н.А. Омелянчук¹,
Т.П. Пастернак², В.В. Миронова^{1,3}

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

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

² Институт биологии II/ молекулярной физиологии растений, Фрайбург, Германия;

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 12 сентября 2014 г. Принята к публикации 17 октября 2014 г.

Фитогормон ауксин является ключевым фактором морфогенеза растений. Ауксин неравномерно распределяется в тканях растения, формируя градиенты и максимумы концентраций, в соответствии с которыми происходит рост, деление и дифференцировка клеток. Основным вклад в образование градиентов ауксина вносит семейство PIN-FORMED (PIN) белков, трансмембранных транспортеров ауксина. Корень растений представляет собой наиболее удобную модель для изучения регуляции морфогенеза ввиду его достаточно простой клеточной организации. В данном обзоре мы рассматриваем особенности экспрессии PIN транспортеров и их роль в формировании распределения ауксина в корне арабидопсиса. Обсуждаются математические модели, которые позволили доказать связь между паттерном экспрессии PIN-белков и распределением ауксина в меристеме корня.

Ключевые слова: ауксин, активный транспорт, *Arabidopsis thaliana*, математическое моделирование, меристема, корень.

ВВЕДЕНИЕ

Ауксин координирует основные процессы развития растений, такие как эмбриогенез, дифференцировку сосудистой ткани, поддержание меристем, инициацию латеральных органов (боковых корней, боковых побегов, цветков, тропизмы и др.) (Vanneste, Friml, 2009). Градиенты ауксина в тканях в соответствии с его дозой определяют процессы деления, роста и дифференцировки клеток. Распределение ауксина создается в основном за счет активного транспорта ауксина между клетками. Транспорт ауксина осуществляется тремя семействами белков: AUX/LAX (AUXIN-INSENSITIVE1/LIKE AUX1), PIN (PIN-FORMED) и ABCB (в подсемейство ABC транспортеров) (Bennett *et al.*, 1996; Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Geisler, Murphy, 2006). PIN-белки осуществляют отток ауксина из клетки и тем самым формируют

направление его потока и градиентов (Petrásek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006). В частности, мутанты по генам PIN воспроизводят фенотипы растений дикого типа, обработанных ингибиторами активного транспорта, в гораздо большей степени, чем мутанты по генам других транспортеров (Tanaka *et al.*, 2006). Таким образом, поляризация PIN-белков на мембранах клеток и их активность определяют направленность потока ауксина и способствуют образованию локальных максимумов концентраций ауксина, необходимых для инициации органов и в конечном счете для морфогенеза (Blakeslee *et al.*, 2005). Кроме того, PIN-белки могут иметь важную роль в регуляции реакции растений на окружающую среду (Habets *et al.*, 2014).

PIN-белки осуществляют транспорт ауксина как в побегах, так и в корне растений. В данном обзоре мы решили сконцентрироваться на описании экспрессии PIN-белков в корне,

так как с конца прошлого века именно корень (чаще всего *Arabidopsis thaliana* L.) стал модельным объектом для изучения молекулярных процессов развития растений ввиду простого строения, которое не меняется по мере роста корня (Benfey, Schiefelbein, 1994). Например, корень арабидопсиса на всем своем протяжении, за исключением кончика, состоит из стели, окруженной концентрическими слоями эндодермы, кортекса и эпидермиса (рис. 1, а) (Dolan *et al.*, 1993). Стель, в свою очередь, включает центральный сосудистый цилиндр, вмещающий в себя флоэму, ксилему и камбий, окруженные перициклом. В кончике корня находится апикальная меристема корня АМК, в которой между активно делящейся зоной и колумеллой находится область редко делящихся клеток – покоящийся центр (рис. 1, а). АМК окружена потомками своих клеток, сверху – вертикальными рядами последовательно дифференцирующейся стели, снизу (также последовательно от меристемы) – дифференцирующимися клетками колумеллы, а с боков – сначала предшественниками кортекса/эндодермиса и эпидермиса и затем боковым корневым чехликом.

Целью настоящего обзора является описание ключевой роли PIN-белков в транспорте ауксина и эффективности системного подхода в изучении функции PIN генов в корне растений. В задачи обзора входило изложение опублико-

ванных данных по распределению ауксина в корне *A. thaliana* и значению экспрессии PIN генов в установлении этого распределения, а также представление интеграции этих данных в математических моделях.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АУКСИНА В КОРНЯХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

Ауксин является низкомолекулярным веществом, производным триптофана. В первые дни после прорастания ауксин синтезируется исключительно в примордиях листьев и молодых листьях в апексе побега, затем синтез может происходить в разных частях растения, в том числе и в корне, но, тем не менее, основным постоянным источником ауксина в растении всегда является апекс побега (Ljung *et al.*, 2002).

Ауксин, синтезированный в побеге, затем распределяется по растению с помощью диффузии и активного транспорта. Для исследования распределения ауксина в растении были созданы две группы искусственных репортерных ауксин-чувствительных конструкций: под управлением ауксин-чувствительного промотора DR5 (Ulmasov *et al.*, 1997) и с белковой частью, содержащей ауксин-зависимый дегрон DII-VENUS (Brunoud *et al.*, 2012).

Высокоактивная синтетическая конструкция

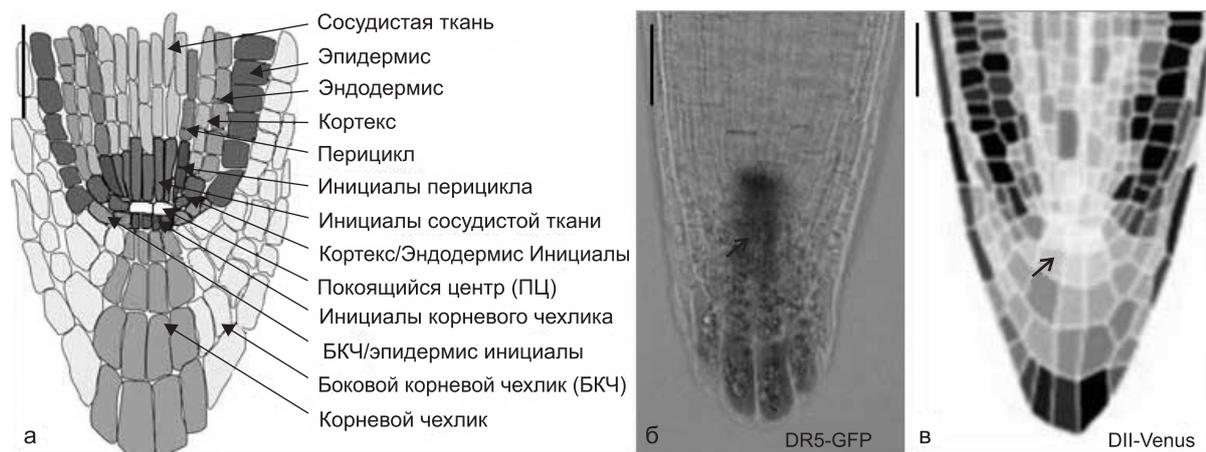


Рис. 1. Анатомическая структура кончика корня *A. thaliana* и распределение ауксина в нем.

а – клеточные типы в меристеме корня; б – распределение ауксина, выявленное с помощью DR5-GFP под конфокальным микроскопом. Максимум активности GFP обозначен черным; в – распределение ауксина, выявленное с помощью DII-VENUS. Максимум концентрации обозначен белым, минимум – черным (адаптировано из: (Brunoud *et al.*, 2012)). Стрелка указывает на покоящийся центр. Шкала – 30 мкм.

DR5 была создана путем сайт-направленного мутагенеза в природном ауксин-чувствительном сайте (AuxRE) промотора GH3 гена сои. DR5 состоит из тандема 7 прямых повторов AuxRE длиной 11 п.н., которые включают последовательность TGTCTC (Ulmasov *et al.*, 1997). Механизм работы данной конструкции заключается в том, что в ответ на накопление ауксина происходит активация промотора, за которой следует синтез репортерного белка (GUS/GFP) в соответствующих клетках. С помощью этой конструкции зарегистрировано два максимума в меристематической зоне: первый максимум ауксина в кончике корня, а точнее – в инициалах колумеллы с некоторым падением уровня в покоем центре и самой колумелле (рис. 1, б) (Sabatini *et al.*, 1999) и второй максимум ауксина в клетках протоксилемы в верхней части меристематической зоны, где происходит преддетерминация сайтов инициации боковых корней (De Smet *et al.*, 2007). Также были выявлены максимумы ауксина в клетках перидермы в зоне дифференциации, где осуществляется инициация боковых корней (De Smet *et al.*, 2007).

Конструкция DII-VENUS состоит из нескольких последовательностей, кодирующих домены Aux/IAA белков (деградация которых регулируется ауксином), слитых с быстро созревающим белком YFP (Brunoud *et al.*, 2012). DII-VENUS экспрессируется под управлением 35S промотора во всех клетках растения. При увеличении концентрации ауксина в клетке SCF^{TIR1} комплекс связывает Aux/IAA-YFP, убиквитинизирует его, после чего белок разрушается протеасомой. Изучение меристематической зоны с помощью DII-VENUS подтвердило все локальные максимумы ауксина, выявленные в ней с помощью DR5 сенсора. Ввиду большей чувствительности DII-VENUS описывает распределение ауксина в меристематической зоне более детально. Наибольший уровень ауксина DII-VENUS регистрирует в покоем центре, инициалах и двух рядах клеток колумеллы, инициалах стели и их ранних потомках и в дифференцирующихся клетках ксилемы (рис. 1, в). Другие клетки в проксимальной меристеме имеют более низкий уровень с минимумом в эпидермисе и кортексе. В дистальной части меристематической зоны (по другому называемой

базальной меристемой или транзитной зоной) уровень ауксина значительно возрастает. Зона увеличения более приближена к кончику корня в эпидермисе и сосудистой ткани. Формирование и динамическое перераспределение ауксина играют важную роль в морфогенезе растения, поэтому актуальной является задача исследования белков-транспортёров, осуществляющих это перераспределение.

ХАРАКТЕРИСТИКА PIN-БЕЛКОВ *ARABIDOPSIS THALIANA*

Первые представители семейства PIN были описаны на модельном растении *Arabidopsis thaliana*. Значение и функции белков PIN были обнаружены при анализе фенотипических аномалий в мутантах с потерей функции гена: мутантные растения образовывали подобные булавке соцветия, которые дали название семейству PIN. У арабидопсиса описано 8 генов (PIN1–PIN8) (Krecek *et al.*, 2009). Семейство PIN кодирует трансмембранные белки, которые транспортируют ауксин. Точное происхождение белков PIN в эволюционной истории растений не известно. Представители семейства PIN были найдены только в геномах высших растений, начиная со мхов и плаунов (Mgaves *et al.*, 2009).

Все PIN-белки имеют аналогичную структуру: С- и N-гидрофобные области отделены центральной гидрофильной петлей (рис. 2). Структура гидрофобных областей консервативна у разных представителей PIN. Гидрофильная область, напротив, является более изменчивой. Трансмембранные С- и N-терминальные домены вместе, вероятно, образуют пору для переноса ауксина, в то время как гидрофильная петля отвечает за локализацию белка и его активность (Dhonukshe *et al.*, 2010).

Все белки PIN *A. thaliana* на основе своей структуры могут быть разделены на два подсемейства. Более многочисленное подсемейство «длинных» PIN характеризуется наличием центральной гидрофильной петли, разделяющей две гидрофобные области друг от друга (рис. 2). Каждая гидрофобная область имеет пять трансмембранных участков. К этому подсемейству принадлежат белки PIN1–PIN4 и PIN7, которые расположены в плазматической мембране и

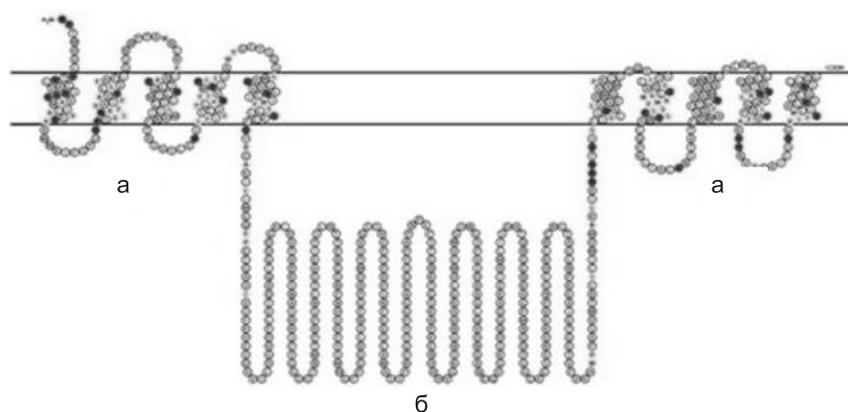


Рис. 2. Структура «длинных» PIN-белков.

а – гидрофобная область, состоящая из 5 трансмембранных участков; б – гидрофильная петля (адаптировано из: (Krecek *et al.*, 2009)).

транспортируют ауксин из клетки. Кроме того, PIN6 также относят к «длинным» PIN на основе высокой гомологии его последовательности к белкам семейства в трансмембранных участках и по наличию гидрофильной петли, которая немного редуцирована. Ауксин непосредственно повышает транскрипцию многих «длинных» PIN (Vieten *et al.*, 2007).

Отличительная особенность подсемейства «коротких» PIN (PIN5 и PIN8) – отсутствие гидрофильной петли. Они локализованы в ЭПР и обеспечивают внутриклеточное разделение ауксина между цитоплазмой и полостью ЭПР (PIN5), между цитоплазмой и вакуолями (PIN8), а также гомеостаз ауксина в клетке. Ауксин снижает транскрипцию белков PIN5 и PIN8 (Friml *et al.*, 2003).

Локализация PIN-белков в клетке. PIN-белки играют важную роль в формировании полярности клетки (Medvedev, 2012). Поэтому важным является понимание механизмов их полярной локализации. Существуют две гипотезы, объясняющие данный механизм: первая основана на рециркуляции PIN-белков, вторая – на их деградации. Синтезируемые на рибосомах белки PIN попадают в ЭПР. Из ЭПР они поступают в аппарат Гольджи, в котором упаковываются в везикулы. Далее путем экзоцитоза белки PIN встраиваются равномерно во внешнюю мембрану клетки. Согласно первой гипотезе, внутриклеточная рециркуляция белков PIN – важный регуляторный механизм их локализации на мембране (Kleine-Vehn *et al.*,

2011). Он осуществляется при помощи клатрин-зависимого эндоцитоза и вторичного экзоцитоза (Geldner *et al.*, 2001). На первой стадии эндоцитоза происходит интернализация везикул, содержащих белки PIN. На второй стадии – включение их в эндомембраны, согласно различиям в гидрофильной петле, которые обуславливают различия в клеточной локализации PIN-белков. Механизм вторичного экзоцитоза обеспечивает рециркуляцию белков PIN в конкретные участки ПМ (например, PIN1 – в базальные, PIN2 – в апикальные). Кроме того, часть PIN-белков транспортируются везикулярным путем на деградацию. Вторая гипотеза предполагает, что рециркуляция белков вносит малый вклад в их полярную локализацию и после эндоцитоза везикулы с PIN-белками деградируют (Tejos *et al.*, 2014).

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ PIN ГЕНОВ ДЛЯ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА И МОРФОГЕНЕЗА КОРНЯ

Экспрессия PIN генов в эмбриогенезе *Arabidopsis thaliana*. PIN-белки формируют градиент ауксина, определяющий дифференцировку клеток уже в эмбриогенезе. После первого деления зиготы образуется двуклеточный проэмбрио (предзародыш), апикальная клетка которого в основном даст начало всему зародышу (за исключением части меристемы корня), в то время как базальная путем горизонтальных делений – суспензору (Jürgens, 2001). Самая

апикальная клетка суспензора впоследствии станет гипофизой. В образовании меристемы корня участвуют как потомки апикальной клетки (они дают начало верхнему ярусу меристемы), так и гипофиза, из которой происходят покоящийся центр и нижний ярус. PIN гены экспрессируются уже на стадии двуклеточного предзародыша (Friml *et al.*, 2003). PIN1 белок не полярно, равномерно распределен по мембране в апикальной клетке, в то время как PIN7 локализован на верхней плазматической мембране базальной клетки и проводит ауксин из базальной клетки в апикальную. На стадии восьми клеток PIN7 локализован на верхних плазматических мембранах клетки гипофизы и клетки под ней, снабжая развивающийся зародыш ауксином. На глобулярной стадии, в апикальной части эмбриона, в области будущих семядолей начинается биосинтез ауксина и PIN1 локализуется базально в инициалах сосудистых клеток в нижней части зародыша перед гипофизой. Также на глобулярной стадии впервые в гипофизе и инициалах сосудистых клеток корневой меристемы начинает экспрессироваться PIN4, а локализация PIN7 в клетках суспензора меняется с апикальной на базальную. PIN7-зависимый транспорт ауксина в суспензор функционирует с меньшей скоростью, чем транспорт, опосредованный PIN1 и PIN4. В результате градиент ауксина меняет направление на противоположное, с новым максимумом в гипофизе. С вступлением в сердечковидную стадию в этом районе формируется меристема корня. Синтез ауксина в семядолях усиливается, и PIN1 и PIN4 обеспечивают приток ауксина к меристеме. В это время начинается экспрессия PIN3 на базальном полюсе эмбриона в предшественниках колумеллы. Таким образом, по мере хода эмбриогенеза ауксин начинает накапливаться в развивающемся корне, что, в свою очередь, приводит к формированию покоящегося центра. На торпедной стадии максимум ауксина устанавливается под покоящимся центром в инициалах колумеллы. Правильная локализация PIN-белков, обеспечивающая правильное распределение ауксина, является ключевым фактором в этом процессе. Например, при мутации белка GNOM/EMB30, необходимого для правильной локализации PIN-белков в мембране (Steinmann *et al.*, 1999),

нарушается клеточная локализация PIN1, что, в свою очередь, приводит к летальному фенотипу эмбриона.

Таким образом, во время эмбриогенеза PIN-белки арабидопсиса начинают экспрессироваться с первого деления зиготы и способствуют через образование градиентов ауксина формированию апикально-базальной оси зародыша.

Роль экспрессии PIN генов для поддержания функционирования АМК у арабидопсиса. Сформированный в конце эмбриогенеза в зачатке первичного корня за счет активности PIN транспортеров максимум ауксина в инициалах колумеллы сохраняется при прорастании и поддерживается в главном корне. В растущем корне после прорастания семян PIN1 в основном локализуется на базальной стороне сосудистых клеток меристематической зоны корня, но он также может быть локализован на базальной стороне эндодермиса и кортекса (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002a; Vieten *et al.*, 2005). В покоящемся центре наблюдается неполярная локализация PIN1 белка, но значительно слабее, чем в клетках сосудистой системы. PIN2 расположен на апикальной (верхней) стороне клеток эпидермиса и боковых клетках корневого чехлика, а также на базальной, а затем апикальной стороне клеток кортекса в меристематической зоне и зоне элонгации соответственно (рис. 3) (Friml *et al.*, 2003; Vieten *et al.*, 2005). PIN3 экспрессируется без выраженной полярности в двух или трех рядах клеток колумеллы, на базальной стороне клеток сосудов и боковой стороне клеток перицикла в зоне элонгации (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002b). PIN4 локализуется на всех сторонах вокруг клеток покоящегося центра, а также базально в инициалах сосудистых клеток и в сосудистых клетках в зоне элонгации (рис. 3) (Friml *et al.*, 2002b). PIN7 находится на боковых и базальных мембранах инициалей сосудистых клеток в меристематической зоне и зоне элонгации, тогда как в клетках колумеллы он совпадает с областью PIN3 (рис. 3) (Blilou *et al.*, 2005).

Белки PIN1, PIN3, PIN4 и PIN7 обеспечивают в корне постоянный акропетальный (направленный к кончику корня) поток ауксина из побега через сосудистую систему к покоящемуся центру (Blilou *et al.*, 2005; Friml *et al.*, 2002a). PIN3 и PIN7 также способствуют перераспределению

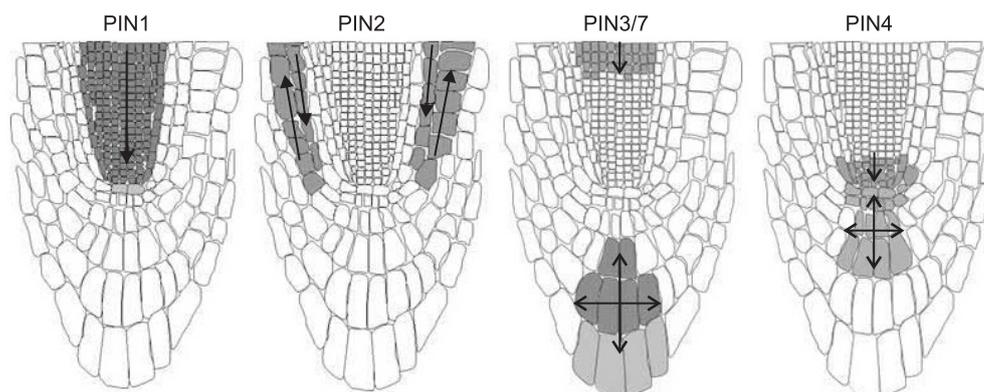


Рис. 3. Экспрессия PIN-белков в корне.

Стрелки указывают направление потоков ауксина.

ауксина в корневом чехлике. PIN2 формирует базипетальный поток ауксина из кончика корня через эпидермис, а также акропетальный поток через кортекс. Кроме того, белки PIN семейства локализованы на латеральной стороне мембраны в перицикле и эндодермисе, что опосредует латеральное перераспределение ауксина из базипетального потока обратно в акропетальный и формирует так называемую структуру «обратного фонтана» (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005; Grieneisen *et al.*, 2007).

Аналогичная локализация PIN-белков обнаружена в формирующихся боковых корнях. Локальные максимумы ауксина формируются *de novo* и затем поддерживаются во всех придаточных и боковых корнях.

Компенсаторные изменения экспрессии PIN генов в случае мутаций одного из них. В *pin* мутантах наблюдается изменение доменов экспрессии других PIN генов, которые компенсируют потерю белка мутантного гена, экспрессируясь в его домене и беря на себя его функции (Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005). Например, в мутанте *pin1*, PIN2 начинает экспрессироваться в инициалах сосудистых клеток, частично компенсируя функцию недостающего белка PIN1. В мутанте *pin3pin4pin7* экспрессия белка PIN1 была обнаружена на латерально-базальной стороне мембраны клеток эндодермиса. Кроме того, белок PIN2 был обнаружен на базальной стороне инициалей сосудистых клеток, в которых обычно экспрессируются PIN3 и PIN7. Это явление называют функциональной избыточностью (Blilou *et al.*, 2005). Таким

образом, дефекты *pin* мутантов маскируются эктопической экспрессией оставшихся PIN генов (Blilou *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005). В корне фенотипические дефекты были выявлены только у одного одиночного мутанта – *pin2*, который имеет агравитропический фенотип. Этот дефект может быть объяснен отсутствием компенсации функции PIN2 другими белками PIN. Также фенотипические аномалии в корне были обнаружены у некоторых множественных мутантов, например, тройной мутант *pin1pin3pin4* имеет очень короткий корень, а *pin1pin3pin4pin7* мутанты, в зависимости от экотипа, являются летальными с ярко выраженными аномалиями полюса корня или нефункциональным корнем у развивающихся растений (Friml *et al.*, 2003).

В заключение отметим, что дополнительные доказательства о решающем вкладе PIN-белков в формирование паттерна распределения ауксина в корне были получены из данных о слабом влиянии нуль-мутантов ABC или AUX/LAX транспортеров на ранние процессы развития растения (Ugartechea-Chirino *et al.*, 2010; Zazimalová *et al.*, 2010).

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ АУКСИНА PIN ТРАНСПОРТЕРАМИ

Выше были приведены доказательства того, что PIN-белки способствуют формированию распределения ауксина во время эмбрионального и постэмбрионального развития растения. Поскольку транспорт ауксина является динами-

ческим процессом, то его исследование с использованием математического моделирования позволяет более детально понять механизмы формирования градиента концентрации ауксина и подтвердить основную роль PIN-белков в этом процессе.

Гипотеза о достаточности PIN-белков для формирования максимума концентрации ауксина в меристеме корня в развитии впервые была проверена в математической модели (Grieneisen *et al.*, 2007). В этой работе авторы предложили механизм «обратного фонтана», согласно которому суперпозиция паттернов экспрессии PIN-белков обеспечивает формирование и сохранение в развитии максимума концентрации ауксина (рис. 1, б). В математической модели «обратного фонтана» кончик корня был представлен в виде клеточного ансамбля с прямоугольными клетками, которые различаются по размеру в зависимости от их положения в меристематической зоне или зоне элонгации. В модели был рассмотрен один PIN-белок, который обобщает функции PIN1, PIN2, PIN3, PIN7. Полярная локализация PIN задавалась в соответствии с экспериментальными данными для этих четырех белков, а именно: центральная область клеточного ансамбля моделирует сосудистую ткань с базально расположенными PIN; периферийные регионы, в которых PIN экспрессируются преимущественно апикально, соответствуют ткани эпидермиса, между этими тканями расположены «пограничные» клетки сосудистого слоя, которые имеют базально-боковую локализацию PIN; в клетках, соответствующих клеткам колумеллы, PIN-белки локализируются на всех сторонах. Таким образом, механизм обратного фонтана предполагает наличие акропетального и базипетального потоков ауксина, которые координируются боковым перераспределением ауксина, чтобы сгенерировать градиент ауксина в корне. Максимум концентрации ауксина генерировался в модели непосредственно над клетками колумеллы, что соответствует экспериментально наблюдаемому максимуму в клетках покоящегося центра (рис. 1, б).

Более детальный анализ формирования распределения ауксина в клеточном ансамбле с фиксированным паттерном экспрессии PIN-белков был проведен в работе Band с соавт. (2014). В данной работе распределение аук-

сина моделировалось в клеточном ансамбле, имитирующем реальную клеточную структуру продольного среза кончика корня, полученную из конфокальных изображений DII-VENUS *A. thaliana*. В отличие от работы Grieneisen с соавт. (2007) авторы работы Band с соавт. (2014) анализировали распределение ауксина с помощью более чувствительного сенсора DII-VENUS (рис. 1, в). В модели Band с соавт. (2014), так же, как и в модели Grieneisen с соавт. (2007), распределение PIN-белков в тканях корня было фиксированным в процессе расчета. В результате в данной работе было показано, что одних PIN-белков недостаточно для формирования экспериментально наблюдаемого распределения ауксина. Авторы пришли к выводу, что AUX1/LAX транспортеры также значительно влияют на распределение ауксина, а именно они контролируют, какие именно ткани имеют высокий уровень ауксина.

Описанные выше модели исследуют, как паттерн экспрессии PIN-белков генерирует градиент ауксина. Совершенно другой подход используется в модели «отраженной волны» (Likhoshvai *et al.*, 2007; Mironova *et al.*, 2010, 2012), в которой исследуется вопрос, как ауксин через регуляцию экспрессии PIN-белков влияет на свое распределение. В моделях используются экспериментальные данные о том, что низкие концентрации ауксина активируют транскрипцию генов PIN1–4 и PIN7, тогда как высокие концентрации вызывают деградацию этих белков (Vieten *et al.*, 2005). В модели Мироновой с соавт. (Mironova, 2012) рассматривается ауксин-зависимая экспрессия трех белков PIN: PIN1 создает акропетальный поток ауксина через сосудистые клетки, PIN2 – базипетальный и боковой потоки через эпидермис, PIN3 – неполярный поток. В численном расчете модели паттерн распределения ауксина самоорганизовывался одновременно с паттерном распределения PIN-белков. Кроме того, механизмы обратного фонтана и отраженной волны являются взаимодополняющими в процессах развития корня. В частности, механизм отраженной волны осуществляется на самых ранних стадиях развития корневой системы. На более поздних стадиях развития сформированная анатомическая структура обеспечивает функционирование механизма обратного фонтана, который

позволяет более надежно поддерживать максимум ауксина в меристеме корня. Однако механизм отраженной волны не исчезает, он снова начинает работать, если структура меристемы корня нарушается (Mironova *et al.*, 2012). Стоит отметить, что взаимодействие этих механизмов происходит через ауксин-зависимую регуляцию экспрессии PIN генов.

Результаты математического моделирования подтверждают основную роль PIN транспортеров в формировании градиента ауксина, а также важность обратных связей в регуляции данного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ауксин – гормон растений, который влияет на деление, рост и дифференцировку клеток, он также играет важную роль в развитии корневой системы. Распределение ауксина обеспечивается за счет его активного транспорта (белками семейств AUX/LAX, PIN и ABCB) и диффузии. Семейство генов PIN арабидопсиса кодирует трансмембранные белки, которые транспортируют ауксин из клетки. PIN-белки расположены асимметрично в плазматической мембране клеток, благодаря чему формируют в ткани градиенты и максимумы концентрации ауксина, влияющие на развитие. В данной статье мы привели как экспериментальные доказательства ключевой роли PIN-белков в формировании этого распределения, так и результаты исследования транспорта ауксина с помощью математического моделирования.

К числу экспериментальных доказательств относятся следующие. 1. PIN-белки начинают экспрессироваться сразу после деления зиготы и в процессе всего эмбриогенеза направляют потоки ауксина, которые в свою очередь влияют на дифференцировку клеток, в том числе способствуют формированию и развитию корня. 2. В зрелом растении паттерн экспрессии PIN генов обеспечивает непрерывный поток ауксина из побега, необходимый для поддержания функционирования меристемы корня. Кроме того, большинство одиночных и некоторые множественные мутанты *pin* не показывают фенотипических аномалий в корне, что объясняется функциональной избыточностью генов PIN. Однако стоит отметить, что механизмы,

объясняющие данное явление, в настоящее время недостаточно исследованы.

In silico подход имеет особые преимущества для изучения динамики таких сложных систем, к которым относится транспорт ауксина. Методами математического моделирования было исследовано, как паттерн экспрессии PIN-белков формирует распределение ауксина в кончике корня (Grieneisen *et al.*, 2007; Band *et al.*, 2014). В то же время стоит подчеркнуть, что важным регулятором экспрессии генов PIN является сам ауксин, эта регуляция позволяет образовывать обратную связь между концентрацией ауксина в клетке и скоростью его оттока из клетки. Математические модели, механизм работы которых основан на наличии положительной и отрицательной обратной связи между ауксином и экспрессией его транспортеров, не только воспроизводят самоорганизацию наблюдаемого распределения ауксина в корне, но и могут объяснить соответствующее ему формирование различных клеточных типов (Likhoshvai *et al.*, 2007; Mironova *et al.*, 2010; Mironova *et al.*, 2012). В дальнейшем в математических моделях необходимо учесть влияние других транспортеров ауксина, AUX/LAX и ABCB. Кроме того, важно использовать такой инструмент, как математическое моделирование для выявления механизмов полярной локализации PIN-белков. Таким образом, системная интеграция экспериментальных и компьютерных подходов впоследствии позволит добиться более детального и реалистичного понимания механизмов, лежащих в основе транспорта ауксина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом фонда «Династия» для молодых биологов и Российским научным фондом 14-14-00734.

ЛИТЕРАТУРА

- Band L.R., Wells D.M., Fozard J. *et al.* Systems analysis of auxin transport in the Arabidopsis root apex // *Plant Cell*. 2014. V. 26. No. 3. P. 862–875.
- Benfey P.N., Schiefelbein J.W. Getting to the root of plant development: the genetics of Arabidopsis root formation // *Trends Genet.* 1994. V. 10. No. 3. P. 84–88.
- Bennett M.J., Marchant A., Green H.G. *et al.* Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism // *Science*. 1996. V. 273. P. 948–950.

- Blakeslee J.J., Ann W., Angus P. *et al.* MDR/PGP auxin transport proteins and endocytic cycling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. No. 5. P. 494–500.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V. *et al.* The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots // *Nature*. 2005. V. 433. P. 39–44.
- Brunoud G., Wells D.M., Oliva M. *et al.* A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution // *Nature*. 2012. V. 482. P. 103–106.
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B. *et al.* Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis* // *Development*. 2007. V. 134. No. 4. P. 681–690.
- Dhonukshe P., Huang F., Galvan-Ampudia C.S. *et al.* Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling // *Development*. 2010. V. 137. No. 19. P. 3245–3255.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V. *et al.* Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root // *Development*. 1993. V. 119. No. 1. P. 71–84.
- Friml J., Benkova E., Blilou I. *et al.* AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis* // *Cell*. 2002a. V. 108. No. 5. P. 661–673.
- Friml J., Wiśniewska J., Benková E. *et al.* Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis* // *Nature*. 2002b. V. 415. P. 806–809.
- Friml J., Vieten A., Sauer M. *et al.* Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis* // *Nature*. 2003. V. 426. P. 147–153.
- Geisler M., Murphy A.S. The ABC of auxin transport: the role of p-glycoproteins in plant development // *FEBS Lett.* 2006. V. 580. No. 4. P. 1094–1102.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D. *et al.* Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking // *Nature*. 2001. V. 413. P. 425–428.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F. M. *et al.* Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth // *Nature*. 2007. V. 449. P. 1008–1013.
- Habets M.E., Offringa R. PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals // *New Phytol.* 2014. V. 203. No. 2. P. 362–377.
- Jürgens G. Apical-basal pattern formation in *Arabidopsis* embryogenesis // *EMBO J.* 2001. V. 20. No. 14. P. 3609–3616.
- Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A. *et al.* Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane // *Mol. Systems Biol.* 2011. V. 7. P. 540.
- Kreczek P., Skupa P., Libus J. *et al.* Protein family review The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters // *Genome Biol.* 2009. V. 10. No. 12. P. 249.
- Likhoshvai V.A., Omelyanchuk N.A., Mironova V.V. *et al.* Mathematical model of auxin distribution in the plant root // *Russ. J. of Developm. Biol.* 2007. V. 38. No. 6. P. 374–382.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth // *Plant J.* 2002. V. 28. No. 4. P. 465–474.
- Medvedev S.S. Mechanisms and physiological role of polarity in plants // *Russ. J. Plant Physiol.* 2012. V. 59. No. 4. P. 502–514.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Yosiphon G. *et al.* A plausible mechanism for auxin patterning along the developing root // *BMC Syst. Biol.* 2010. V. 4. No. 1. P. 98.
- Mironova V.V., Omelyanchuk N.A., Novoselova *et al.* Combined *in silico/in vivo* analysis of mechanisms providing for root apical meristem self-organization and maintenance // *Ann. Bot.* 2012. V. 110. No. 2. P. 349–60.
- Mravec J., Skupa P., Bailly A. *et al.* Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter // *Nature*. 2009. V. 459. P. 1136–1140.
- Petrasek J., Mravec J., Bouchard R. *et al.* PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux // *Science*. 2006. V. 312. P. 914–918.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H. *et al.* An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root // *Cell*. 1999. V. 99. No. 5. P. 463–472.
- Steinmann T., Geldner N., Grebe M. *et al.* Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF // *Science*. 1999. V. 286. P. 316–318.
- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer P.B., Friml J. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development // *Cell. Mol. Life Sci.: CMLS.* 2006. V. 63. No. 23. P. 2738–2754.
- Tejos R., Sauer M., Vanneste S. *et al.* Bipolar plasma membrane distribution of phosphoinositides and their requirement for auxin-mediated cell polarity and patterning in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2014. V. 26. No. 5. P. 2114–2128.
- Ugartechea-Chirino Y., Swarup R., Swarup K. *et al.* The AUX1 LAX family of auxin influx carriers is required for the establishment of embryonic root cell organization in *Arabidopsis thaliana* // *Ann. Bot.* 2010. V. 105. No. 2. P. 277–289.
- Ulmasov T., Murfett J., Hagen G., Guilfoyle T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements // *Plant Cell Online*. 1997. V. 9. No. 11. P. 1963–1971.
- Vanneste S., Friml J. Auxin: a trigger for change in plant development // *Cell*. 2009. V. 136. No. 6. P. 1005–1016.
- Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development // *Trends Plant Sci.* 2007. V. 12. No. 4. P. 160–168.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J. *et al.* Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression // *Development*. 2005. V. 132. No. 20. P. 4521–4531.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D. *et al.* Polar PIN localization directs auxin flow in plants // *Science*. 2006. V. 312. P. 883.
- Zazimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hosek P. Auxin transporters -why so many? // *Cold Spring Harbor Persp. Biol.* 2010. V. 2. No. 3. P. a001552.

THE KEY ROLE OF PIN PROTEINS IN AUXIN TRANSPORT IN *ARABIDOPSIS THALIANA* ROOTS

V.V. Kovrizshnykh¹, N.A. Omelyanchuk¹, T. Pasternak², V.V. Mironova^{1,3}

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

² Institute of Biology II/Molecular Plant Physiology, Freiburg, Germany;

³ Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia

Summary

The phytohormone auxin is the key factor in plant morphogenesis. Being unevenly distributed in plant tissues, it forms gradients and concentration maxima, according to which cells grow, divide, and differentiate. The family of PIN-FORMED (PIN) proteins, transmembrane transporters of auxin, play the key role in the formation of auxin gradients. The plant root is the most appropriate model for studying the regulation of morphogenesis, because of its relatively simple cellular organization. This review concerns the expression patterns of PIN transporters and their contribution to auxin distribution in the root of *Arabidopsis*. Mathematical models that prove the relationship between the expression pattern of PIN proteins and auxin distribution in the root meristem are discussed.

Key words: auxin, active transport, *Arabidopsis thaliana*, mathematical modeling, meristem, root.

УДК 633.111«321»:575.11.3:581.2

КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЗАВИСИМОСТИ СИЛЫ МУКИ ОТ ЗАПАСНЫХ БЕЛКОВ ПШЕНИЦЫ

© 2014 г. Л.В. Обухова, Е.Б. Будашкина

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

Поступила в редакцию 15 сентября 2014 г. Принята к публикации 23 октября 2014 г.

На примере яровых сортов мягких пшениц Саратовская 29, Новосибирская 67, Скала, Иртышанка 10, Целинная 20 и их интрогрессивных линий, полученных с участием *Triticum timofeevii* Zhuk., исследована корреляционная зависимость реологических свойств (силы муки) от содержания суммарного белка, сырой клейковины, глиадины и глютенина, их соотношения и прироста. Показано, что хорошая корреляция силы муки имеется только с приростом содержания глютенина. Указывается на возможность использования этой зависимости в селекции.

Ключевые слова: мягкая пшеница, клейковина, сила муки, альвеограф, запасные белки, корреляционный анализ.

Посвящается светлой памяти И.В. Черного

ВВЕДЕНИЕ

Исследование влияния белкового состава клейковины на хлебопекарное качество пшеничной муки имеет очень долгую историю (обзоры: MacRitchie, 1984; Wheat: Science and Trade, 2009). Клейковина в основном состоит из молекул глиадинов и глутенинов. Глиадины имеют молекулярную массу до 60 kDa. Глутениновый полимер пшеницы, самый большой в природе белок с Mw до 20 млн, содержит десятки тысяч аминокислот (Wrigley, 1996). Известно, что глиадины создают вязкость и влияют на растяжимость теста, а глутенины отвечают за его эластичность (Payne *et al.*, 1984). Глутенин состоит из полипептидных цепей (субъединиц), соединенных дисульфидными связями. При обработке восстанавливающими агентами молекулы глутенина диссоциируют на субъединицы разной молекулярной массы: высокомолекулярные субъединицы (ВМС) и низкомолекулярные (НМС) (Payne *et al.*, 1979).

Пристальное внимание было уделено отдельным компонентам, образующим клейковину.

Искали корреляции между аллельным составом высокомолекулярных субъединиц глутенина (ВМСГ) и хлебопекарным качеством (Payne *et al.*, 1979). Другие ссылки можно найти в работах Обуховой с соавт. (1997; Obukhova *et al.*, 2001).

Последующие исследования привели к ранжированию влияния ВМСГ на качество, и была введена оценка *Glu-1* (Payne, 1987). Изучали влияние на качество муки и теста аллельных состояний локусов *Glu-1* и *Glu-3*, а также комбинации, включая локусы *Gli-1* (Gupta *et al.*, 1989, 1994a, b; Luo *et al.*, 2001). Проведен поиск корреляций между ВМСГ и характеристиками качества теста и муки у сортов пшениц разных стран (Branlard *et al.*, 1985; Payne *et al.*, 1987; Lukow *et al.*, 1989; Metakovsky *et al.*, 1990; Morgunov *et al.*, 1990; Чеботарь и др., 2012). Ранжировано влияние аллельного состояния глиадинов на свойства муки и теста (Созинов, 1985). Помимо этого, было рассмотрено влияние суммы разного состава проламинов на качество теста и муки (Gupta *et al.*, 1994; Обухова и др., 1997, 2008; Obukhova *et al.*, 2001).

Ранее в нашей работе (Обухова и др., 2009) был исследован состав ВМСГ у интрогрессивных линий, полученных с участием *Triticum timopheevii* Zhuk. Оказалось, что все линии сохранили состав ВМСГ сортов, на основе которых они были созданы. У этих линий и исходных сортов ранее было исследовано качество муки. Некоторые линии значительно превосходили по силе муки исходные сорта, по-видимому, за счет увеличения доли глютеинов (Обухова и др., 2008).

Цель настоящей работы – выявить корреляционные зависимости реологических свойств теста – силы муки – от содержания различных запасных белков мягкой пшеницы на материале, изученном нами ранее (Обухова и др., 2008).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованы гексаплоидные яровые пшеницы *Triticum aestivum* L.: 5 сортов и 7 гибридов на их основе с участием *Triticum timopheevii* Zhuk. – донора устойчивости к листовой ржавчине и другим патогенам. В качестве родительских сортов выступали Саратовская 29 (С29), Новосибирская 67 (Н67), Скала (Ск), Иртышанка 10 (Ир10) и Целинная 20 (Ц20). Соответствующие интрогрессивные линии были: гибрид 821 на основе С29, гибрид 676 (Н67), гибрид 175 (Ск), два гибрида Ир10: 67 и 140, два

гибрида Ц20: 206 и 191. Гибриды были созданы Е.Б. Будашкиной и Н.П. Калининой (1998).

Реологические показатели («сила муки» по альвеографу, – W , ед.а.) и содержание общего белка (%), сырой клейковины (%), содержание запасных белков (у. е.) и состав *Glu-1* взяты из статьи, опубликованной ранее (Обухова и др., 2008). Результаты по зависимости приращения силы муки в интрогрессивных линиях по отношению к исходному сорту $\delta W = W_{ин.лин.} - W_{сорт}$ от приращения содержания глютеина Δ_{glu} обрабатывались с помощью формулы линейной регрессии $\delta W = A \Delta_{glu}$, где коэффициент A подлежал определению.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей статье приводятся результаты анализа влияния изменения различных запасных белков на реологические свойства теста («сила» муки по альвеографу, – W , е.а.), полученные после математической обработки части показателей, представленных в таблице в статье Л.В. Обуховой с соавт. (2008). Это касается зависимости реологических свойств (силы муки) от содержания общего белка, сырой клейковины, а также от содержания разных белковых фракций (глютеинов/глиадинов), их отношений или приращений в сравнении с родительским сортом (см. табл. и рис. 1–4).

Таблица

Характеристики интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы и их родительских форм

Показатель	Сорт-родитель, интрогрессивная линия											
	С29	821	Н67	676	Ск	175	Ир10	67	140	Ц20	206	191
% белка	15,33	15,2	15,08	16,13	13,76	16,13	16	–	16,62	15	16,13	17,16
% сырой клейковины	34,5	43	30	37	32	39,5	34	40	42,5	33	44	39
W , е.а.	374	568	285	553	256	270	468	384	376	440	451	529
Содержание глиадина, у.е.	131,6	146,6	135,4	143	139	150,4	139	146,6	139	150,4	150,4	150,4
Содержание глютеина, у.е.	49,6	58,4	49,6	62,8	56,9	55,5	55,5	58,4	56,9	56,9	58,4	62,8
Glu-1-оценка, балл	7	7	8	8	7	7	7#	5	5	9	9	9

Примечания. С29 – Саратовская 29, Н67 – Новосибирская 67, Ск – Скала, Ир10 – Иртышанка 10, Ц20 – Целинная 20, W – показатель альвеографа. Интрогрессивные линии 821, 676, 175, 67, 140, 206, 191 расположены справа от соответствующих родительских форм. Glu-1-балл определялся согласно Р.И. Рауне (1987). # Существующее разночтение в Glu-1-оценках линий 67 и 140 с сортом Иртышанка 10 связано с тем, что стандартный сорт Ир10 содержит смесь двух генотипов с оценками 5 и 7 баллов, первый из которых выступил в качестве родительской формы для линий 67 и 140.

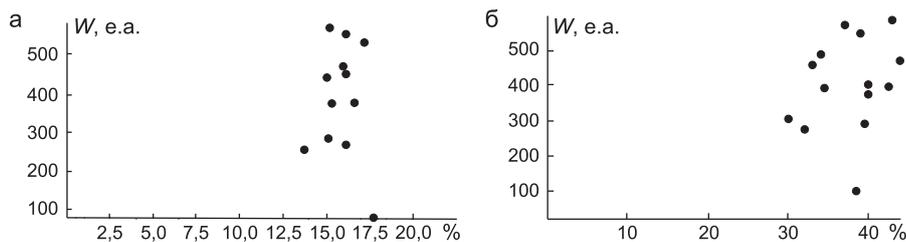


Рис. 1. Зависимость силы муки от содержания суммарного белка (а) и сырой клейковины (б).

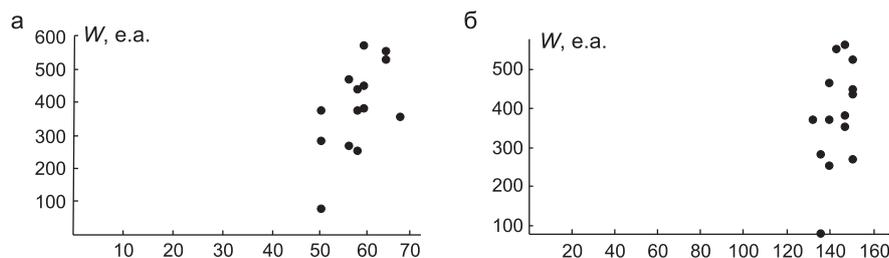


Рис. 2. Зависимость силы муки (е.а.) от содержания суммарного глютенина (а) и глиадина (б) в у.е.

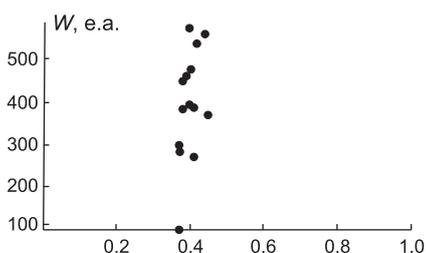


Рис. 3. Зависимость силы муки от отношения концентраций суммарного глютенина к глиадину.

Зависимость силы муки от содержания суммарного белка отсутствует (рис. 1, а). Наблюдается зависимость силы муки от содержания сырой клейковины (рис. 1, б). Обнаружена корреляция силы муки с содержанием суммарной фракции глютенинов в муке (рис. 2, а).

Отсутствует корреляция между силой муки и содержанием суммарного глиадина в муке (рис. 2, б). Кроме того, отсутствует зависимость силы муки от отношения концентраций суммарного глютенина к глиадину (рис. 3) и от приращения концентрации глиадина (рис. 4, а).

Наиболее заметной оказалась зависимость прироста силы муки δW (е.а.) от прироста концентрации суммарного глютенина Δ_{glu} в муке (рис. 4, б). Точки хорошо ложатся на прямую линию с коэффициентом $A = 20 \pm 8$ е.а., таким образом, зависимость оказывается достаточно ярко выраженной. Однако имеются две точки, достаточно далеко отстоящие от прямой (правее). Эти точки принадлежат показаниям для интрогрессивных линий 67 и 140.

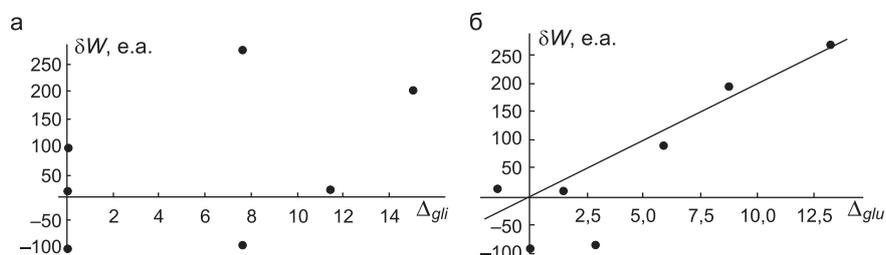


Рис. 4. Зависимость приращения силы муки от приращения концентрации проламинов.

а – от концентрации Δ_{gli} ; б – от концентрации Δ_{glu} . Точки хорошо ложатся на линейную зависимость $\delta W = A \Delta_{glu}$ с коэффициентом $A = 20 \pm 8$ е.а. Точки, далеко отстоящие от прямой, принадлежат линиям 67 и 140.

Мы выяснили причину наблюдаемого в последнем случае отклонения от линейного закона. Как отмечено в табл. в графе: «*Glu-1*-оценка, балл», существующее разночтение в *Glu-1*-оценках линий 67 и 140 с сортом Иртышанка 10 связано с тем, что в стандартном сорте Иртышанка 10 имеются два генотипа с оценками 5 и 7 баллов (Morgunov *et al.*, 1990; Обухова и др., 2008, 2009). В нашем случае первый из этих генотипов выступил в качестве родительского сорта для линий 67 и 140 (Обухова и др., 2008, 2009).

С учетом последнего фактора мы исключили линии 67 и 140 из подгонки величины *A*. В таком случае для этого коэффициента получается значение $A = 13,2 \pm 7,8$ е.а.

Таким образом, наши результаты показывают, что качество пшеницы в значительной степени определяется не только принятым стандартным параметром – содержанием сырой клейковины, но и приростом содержания суммарных глютеинов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В изученных моделях имеется хорошая корреляция прироста силы муки с приростом содержания глютеина. Наблюдается корреляция с содержанием суммарного глютеина и непрямая корреляция с содержанием сырой клейковины. Отсутствует корреляция силы муки с содержанием глиадинов и с содержанием суммарного белка.

Предложенный в настоящей статье простой способ может позволить предсказать на ранних стадиях селекции будущую силу муки. Для этого следует проводить сравнительный анализ концентрации суммарной фракции глютеинов гибридной и родительских форм под контролем ВМС-глютеинов для определения аллельного состава и учета гетерозигот.

Работа выполнена за счет средств бюджетного проекта VI.53.1.3.

ЛИТЕРАТУРА

Будашкина Е.Б., Калинина Н.П. Создание интрогрессивных линий гексаплоидной пшеницы, устойчивых к грибным инфекциям: Патент РФ 1998. № 2138155.
Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Ермакова М.Ф., Калинина Н.П., Шумный В.К. Качество зерна и муки у

интрогрессивных линий яровой мягкой пшеницы с генами устойчивости к листовой ржавчине от *Triticum timopheevii* Zhuk. // С.-х. биология. 2008. № 5. С. 38–42.
Обухова Л.В., Будашкина Е.Б., Шумный В.К. Исследование запасных белков у интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. × *Triticum timopheevii* Zhuk.) // Генетика. 2009. Т. 45. № 3. С. 360–368.
Обухова Л.В., Майстренко О.И., Генералова Г.В. и др. Состав высокомолекулярных субъединиц глютеина у замещенных линий мягкой пшеницы, созданных с участием сортов с контрастными хлебопекарными свойствами // Генетика. 1997. Т. 33. № 8. С. 1179–1184.
Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М.: Наука, 1985. 272 с.
Чеботарь С.В., Благодарова Е.М., Куракина Е.А. и др. Генетический полиморфизм локусов, определяющих хлебопекарное качество украинских сортов пшеницы // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 87–98.
Branlard G., Dardevet M. Diversity of grain proteins and bread wheat quality. II. Correlation between high molecular weight subunits of glutenin and flour quality characteristics // J. Cereal Sci. 1985. V. 3. P. 345–354.
Gupta R.B., MacRitchie F. Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3*, and *Gli-1*, of common wheat. II. Biochemical basis of the allelic effects on dough properties // J. Cereal Sci. 1994. V. 19. P. 19–29.
Gupta R.B., Paul J.G., Cornish G.B. *et al.* Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties // J. Cereal Sci. 1994b. V. 19. P. 9–17.
Gupta R.B., Singh N.K., Shepherd K.W. The cumulative effects of allelic variation in LMV and HMW glutenin subunits on physical dough properties in the progeny of two bread wheats // Theor. Appl. Genet. 1989b. V. 77. P. 57–64.
Lukow O.M., Payne P.I., Tkachuk R. The HMW glutenin subunit composition of Canadian wheat cultivars and their association with bread-making quality // J. Sci. Food Agric. 1989. V. 46. P. 451–460.
Luo C., Griffin W.B., Branlard G., McNeil D.L. Comparison of low- and high molecular-weight wheat glutenin allele effects on flour quality // Theor. Appl. Genet. 2001. V. 102. P. 1088–1098.
MacRitchie F. Baking quality of wheat flours // Adv. Food Res. 1984. V. 29. P. 201–277.
Metakovsky E.V., Wrigley C.W., Bekes F., Gupta R.B. Gluten polypeptides as useful genetic markers of dough quality in Australian wheats // Austr. J. Agric. Res. 1990. V. 41. P. 289–306.
Morgunov A.I., Rogers W.J., Sayers E.J., Metakovsky E.V. The high-molecular-weight glutenin subunit composition of Soviet wheat varieties // Euphytica. 1990. V. 51. P. 41–52.
Obukhova L.V., Maystrenko O.I., Generalova G.V. *et al.* Role of prolamins in BMQ of wheat substitution lines raised from cultivars contrasting in this quality // Cereal Res. Commun. 2001. V. 29. No. 1/2. P. 189–196.
Payne P.I. Genetics of wheat storage proteins and the effect of allelic variation on bread-making quality // Ann. Rev. Plant. Physiol. 1987. V. 38. P. 141–153.

- Payne P.I., Corfield K.G., Blackman J.A. Identification of a high-molecular weight subunit of glutenin whose presence correlates with bread-making quality in wheats of related pedigree // *Theor. Appl. Genet.* 1979. V. 55. P. 153–159.
- Payne P.I., Holt L.M., Jackson E.A., Law C.N. Wheat storage proteins: their genetics and their potential for manipulation by plant breeding // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B.* 1984. V. 304. P. 359–371.
- Payne P.I., Nightingale M.A., Krattiger A.F., Holt L.M. The relationship between HMW glutenin subunits composition and the bread-making quality of British-grown wheat varieties // *J. Sci. Food Agric.* 1987. V. 40. P. 51–65.
- Wheat: Science and Trade / Ed. B. Carve. Wiley-Blakwell, 2009. 569 p.
- Wrigley C.W. Giant proteins with flour power // *Nature.* 1996. V. 381. P. 738–739.

ANALYSIS OF THE CORRELATION BETWEEN WHEAT DOUGH STRENGTH AND STORAGE PROTEINS

L.V. Obukhova, E.B. Budashkina

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

Summary

We analyzed the hexaploid wheat cultivars Saratovskaya 29, Novosibirskaya 67, Skala, Irtyshanka 10, and Tselinnaya 20 and their introgression lines with *Triticum timofeevii* Zhuk. to elucidate the correlation between dough rheological properties (dough strength) and the contents of overall protein, raw gluten, gliadin, glutenin. The ratio of glutenin and gliadin contents and their increment in the introgression lines in comparison with the parent cultivars were assessed. Dough strength was found to correlate significantly only with glutenin increase. This correlation can be utilized in breeding design.

Key words: bread wheat, gluten, dough strength, alveograph, storage proteins, correlation analysis.

УДК 631.527.53:575.2

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ ОДНОРОДНОГО СЕМЕННОГО ПОТОМСТВА У РЕМОНТАНТНОЙ КРУПНОПЛОДНОЙ ЗЕМЛЯНИКИ (*FRAGARIA* × *ANANASSA* DUCH.)

© 2014 г. С.О. Батури¹, И.К. Аполинар², А.А. Кузьмина³

- ¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail: SO_baturin@mail.ru;
- ² Государственное научное учреждение Сибирский физико-технический институт аграрных проблем Россельхозакадемии, Новосибирск, Россия;
- ³ Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт растениеводства и селекции Россельхозакадемии, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 25 августа 2014 г. Принята к публикации 17 сентября 2014 г.

Высокий уровень пloidности *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($2n = 8x = 56$) и, как следствие, полисомическое наследование многих признаков, в том числе и репродуктивных, существенно затрудняют достижение однородности в семенном потомстве, необходимое для создания сортов, размножающихся семенами. В статье обосновывается эффективность использования линейных скрещиваний для достижения однородности семенного потомства ремонтантной крупноплодной земляники. Данные изучения трех потомств (F_1) от линейных скрещиваний ремонтантной крупноплодной земляники свидетельствуют об однородности в потомствах по основным биоморфологическим признакам. Срок вступления в плодоношение сеянцев происходит спустя 4–5 месяцев после посева семян, что позволяет в условиях Западной Сибири собирать урожай в августе–сентябре и частично в октябре.

Ключевые слова: крупноплодная земляника, *Fragaria ananassa*, селекция, однократное плодоношение, ремонтантность, тип плодоношения.

ВВЕДЕНИЕ

Земляника крупноплодная (*Fragaria* × *ananassa* Duch., $2n = 8x = 56$) по занимаемым площадям одна из ведущих ягодных культур в мире (Hummer *et al.*, 2011). За 300 лет селекции этого вида было создано около 4 000 сортов, адаптированных для различных условий выращивания. Ягоды¹ крупноплодной земляники ценятся за их уникальный вкус, диетические и лечебные качества. По характеру плодоношения

созданные сорта распределены на две группы: с однократным и многократным (ремонтантным) типом плодоношения.

Ремонтантные сорта интересны тем, что они по урожайности превышают однократно плодоносящие сорта в 2–3 раза, а плоды можно собирать уже в первый год вегетации вплоть до установления снежного покрова. Однако агротехнический уход за ними сложнее, чем за обычными сортами с однократным типом плодоношения (Волкова, 2000).

Для земляники крупноплодной многократно показано, что признак «тип плодоношения» генетически контролируется, причем однократное плодоношение контролируется рецессивным аллелем, а ремонтантное – доминантным (Powers, 1954; Darrow, 1966; Ahmadi *et al.*, 1990).

¹ С позиций классической ботаники плодом у *Fragaria* принято считать многоорешек на сочном цветоложе или «ложная ягода», а развившийся в процессе двойного оплодотворения семязачаток (семя) следует называть плодиком или орешком (Левина, 1987). В дальнейшем для удобства воспользуемся терминами, общепринятыми в генетике и селекции земляники, понимая под плодом ягоду, под семенем – семянку (Волкова, 2000).

В зависимости от генотипической структуры ремонтантного сорта в его семенном потомстве доля ремонтантных сеянцев может варьировать (Батурин и др., 1995). При семенном размножении сортов крупноплодной земляники в потомстве наблюдается выраженная генетическая изменчивость по биоморфологическим признакам, обусловленная полиплоидностью вида (8x) (Morrow, Darrow, 1952; Дука, 1959). Такая изменчивость существенно затрудняет поддержание сортовой однородности потомства при семенном размножении. В связи с этим ремонтантные сорта так же, как и сорта с однократным типом плодоношения, репродуцируют вегетативным способом, благодаря наземным столонам (усам) с укореняющимися розетками. Тем не менее в настоящее время зарубежными селекционерами предпринимаются активные усилия по выведению сортов ремонтантной земляники, которые при семенном воспроизводстве в потомстве проявляли бы однородность по основным биоморфологическим признакам (Bentvelsen *et al.*, 1997). При этом используется межлинейная гибридизация и отбор проводится на семьи, где сеянцы быстро вступают в плодоношение, т. е. на 5–6-й месяц после посева семян. Примером селекции в этом направлении можно считать сорт Свитхарт (США). По заявлению авторов этого сорта, семенное потомство на 90 % однородно по основным признакам продуктивности (US Patent 5585540, 1996). В Европе голландской компанией ABZ Seeds созданы ремонтантные сорта Tarpan F1, Лоран F1, Элан F1, Сариан F1, Merlan F1, Грандиан F1, Tristan F1 и др. (Bentvelsen, Bouw, 2006), которые продаются в виде семян, в том числе и в России.

Отечественный сортимент ремонтантной крупноплодной земляники, размножаемой сеянками, представлен лишь сортом Московский деликатес F1, зарегистрированным в Государственном реестре. Тем не менее российские семеноводческие компании в последнее время увеличивают сортимент размножаемой семенами ремонтантной крупноплодной земляники, не проводя регистрацию сорта в Государственном реестре. Целью настоящей работы является оценка однородности семенного потомства при гибридизации ремонтантных линий крупноплодной земляники.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для исследования служили сеянцы семей № 119 (20 шт.), № 120 (92 шт.) и № 121 (67 шт.). Их происхождение следующее: семья № 119 – [11/66-2 × 11/137-8]; семья № 120 – [30-1 × 11/137-8]; семья № 121 – [11/79-1 × 11/137-8]. Исходные образцы № 11/66-2, № 11/79-1 и № 30-1 представляют собой ремонтантные линии, полученные при участии нейтральнодневных ремонтантных сортов Elin и Rebecka шведского происхождения, а линия № 11/137-8 – при участии ремонтантного нейтральнодневного сорта Аромас калифорнийского происхождения. Скрещивания были проведены в июне, а сеянки собраны в июле 2012 г. Для скрещиваний цветки кастрировали пинцетом, соцветия с кастрированными цветками помещали в изолятор из прозрачного упаковочного целлофана, при этом вокруг основания цветоноса прокладывалась вата для предотвращения попадания насекомых (возможных переносчиков пыльцы). У основания изолятор перевязывали тонким шпагатом с этикеткой. Завязываемость семян на ягоде оценивали путем расчета коэффициента семенификации (процента семенификации), который определяли как отношение числа развившихся семян к общему числу семязачатков в цветке, выраженное в процентах (Вайнагий, 1973).

Для этого ягоды разрезали на 2–4 части, которые плотно прижимали к листу тонкого картона, высушивали при комнатной температуре и затем проводили подсчеты семян и семязачатков для каждой ягоды с помощью бинокулярного микроскопа Микромед МС-2 ZOOM. Расчет среднего значения процента семенификации сорта для каждого месяца сбора ягод осуществляли по данным завязывания семян у 30 случайно отобранных ягод. Анализ всхожести проводился на 300 сеянках от каждого сорта (100 семян в трехкратной повторности) (ГОСТ 13056.6-97, 1998). Сеянки проращивались в начале февраля при положительной температуре 20–22 °С в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге после стратификации при температуре от +2 до –3 °С в течение 14 дней. Всхожесть оценивали в течение 65 дней с момента посева. Оценку всхожести гибридных семян проводили в сравнении со

всхожестью семян коммерческого сорта Loran F1 селекции компании «ABZ Seeds» (Голландия). Данный сорт был выбран в качестве стандарта исходя из наилучших посевных качеств семян (Батурин и др., 2010). В июле сеянцы в возрасте 5 мес. переносились в открытый грунт. Сеянцы выращивались на стандартном агрофоне без дополнительного полива и внесения удобрений на опытных участках биополигона СибФТИ и Новосибирской зональной плодово-ягодной станции. Для оценки на однородность полученных потомств использовали морфометрические признаки, рекомендованные для описания растений земляники (Методика ..., 2008). Статистическую обработку результатов проводили с применением стандартных методов (Зайцев, 1973). Для оценки изменчивости анализируемых морфологических признаков был использован коэффициент вариации V . При этом варьирование считали слабым, если V не превосходил 10 %, средним, когда коэффициент вариации составлял 11–25 % и значительным при значении коэффициента вариации выше 25 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Достижение однородности семенного потомства у ремонтантной крупноплодной земляники необходимо для реализации технологии семенной репродукции ремонтантных сортов. В связи с этим приобретают значимость все особенности сорта, связанные с технологией семенного размножения, но самые основные из них – это всхожесть семян, коэффициент семенификации, период вступления сеянцев в плодоношение, проявление ремонтантности, урожайность и вкусовые качества ягод. Так, сравнение всхожести семян, полученных в направленных скрещиваниях, показало, что всхожесть в гибридных семьях была существенно выше, чем у стандарта – коммерческого сорта Loran F₁ (62,5 %) (рис. 1). Так, всхожесть семян семьи № 121 составила 99,6 %. Согласно указаниям ГОСТа 12420-81 (1988), для посевных качеств семян приняты следующие показатели их всхожести: 1-й класс – 75 %, 2-й класс – 60 %, 3-й класс – 40 %. Таким образом, посевные качества семян гибридных комбинаций соответствуют 1-му классу.

Показатель «срок вступления в плодоношение с момента посева семян» является опре-

деляющим для семенной репродукции ремонтантной крупноплодной земляники в Западной Сибири в связи с ограниченностью периода действия положительных температур воздуха (4–5 месяцев). В нашем эксперименте растения семей № 119 и № 121 вступали в плодоношение через 4 месяца, семьи № 120 – через 5 месяцев с момента посева семян, что позволяет получать урожай в августе–сентябре и частично в октябре. Плодоношение начиналось во II–III декадах августа. Оценка вкусовых качеств ягод составила для семьи № 119 – 4,0 балла; № 120 – 4,5 балла, № 121 – 4,2 балла, а для растений сорта Loran F1 – 3,8 балла. Средний вес ягод первого порядка составил для сеянцев семьи № 119 – 19,1 г, № 120 – 20,8 г, для сеянцев семьи № 121 – 23,9 г. У растений сорта Loran F1 средний вес ягод первого порядка составил 20,0 г.

Завязываемость семян, или коэффициент семенификации, указывает на степень полноценности развития ягод. Чем больше показатель завязываемости семян, тем более правильной формы ягоды на растении, поскольку развитие полноценной семянки сопряжено с развитием определенной площади поверхности ягоды. Низкие показатели семенификации свидетельствуют об уродливой форме ягод. В нашем эксперименте по анализу семенификации ягод мы использовали растения семьи № 120 и сравнили с растениями сорта Loran F1 (рис. 2). Во все месяцы плодоношения, с июля по сентябрь, завязываемость семян у растений семьи № 120 была достоверно выше, чем у стандарта. Причем варьирование среди сеянцев семьи № 120 по этому показателю было низким ($V = 8,8$ %, август) или средним

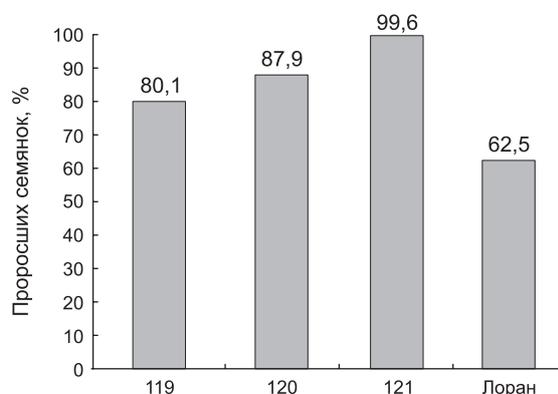


Рис. 1. Всхожесть семян ремонтантной крупноплодной земляники при межлинейных скрещиваниях.

($V = 19,9\%$, июль и $13,9\%$, сентябрь), в то время как у растений сорта Logan F1 лишь в августе и сентябре оно было средним ($V = 17,4\%$ и $V = 19,0\%$) соответственно, а в июле – близко к высокому ($V = 25,6\%$) (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что растения семьи № 120 формируют более выполненные плоды, в отличие от растений сорта Logan F1.

Несомненным критерием пригодности использования технологии семенной репродукции ремонтантных сортов является наличие в семенном потомстве однородности по проявлению ремонтантного плодоношения. Для крупноплодной земляники – октоплоида – получение однородного по проявлению ремонтантности семенного потомства весьма затруднительно по причине гетерозиготности ремонтантных растений (Батурин и др., 1995) и влияния среды на проявление ремонтантности (Ahmadi *et al.*, 1990; Battey *et al.*, 1998). Успех возможен при создании стабильных ремонтантных линий и использовании их в гибридизации (Bentvelsen *et al.*, 1997; Bentvelsen, Bouw, 2006; Аполинарьева и др., 2013). В нашем эксперименте такие линии были созданы и использованы при гибридизации. Все растения в потомствах от таких скрещиваний (семьи 119, 120 и 121) проявляли ремонтантное плодоношение. Цветение наступало спустя 18–20 недель после посева семян и было непрерывным, в то время как у сорта Logan F1 растения зацветали через 21 неделю после посева семян. Причем по типу цветения все полученные сеянцы отно-

сятся к нейтральнодневным. Нейтральнодневные растения обладают способностью формировать соцветия независимо от продолжительности светового дня. Соцветия у этих растений закладываются почти одновременно с образованием розеток на усах.

В целом по морфометрическим признакам, таким как количество цветоносов, количество цветков и ягод на цветоносе, высота растения, количество листьев на растении, диаметр куста, потенциальная урожайность и другим, принятым методикой проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность для земляники (Методика ..., 2008), растения семей № 119, 120 и в том числе № 121 проявляют значительную однородность. Незначительные отклонения касались количественных признаков, чутко реагирующих на условия произрастания: средняя масса ягод, длина цветоноса, фактический урожай и др. (Hytönen, 2009). Следует отметить, что растения каждой семьи имели отличительные фенотипические характеристики. Так, в семье № 119 у сеянцев преобладал тип куста: «стелющийся габитус», плотность облиственности – «рыхлая», преобладающая форма ягод – «почковидная» и крупные плотные листья, а у сеянцев семьи № 120 – полушаровидный габитус, средняя плотность куста, удлинненно-конические ягоды и темно-зеленые плотные листья. Все три семьи по силе роста относятся к «сильнорослым». Исходные родительские формы этих семей – линии № 11/79-1, № 30-1

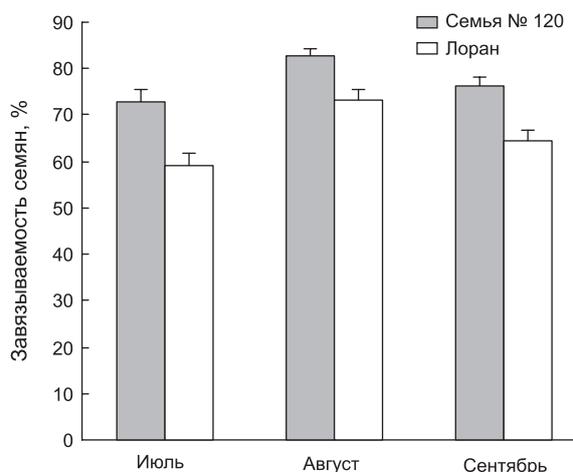


Рис. 2. Завязывание семян (%) у ремонтантных сеянцев земляники в разные сроки плодоношения в открытом грунте.

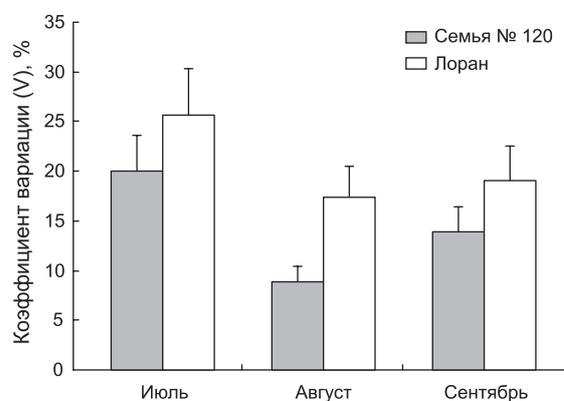


Рис. 3. Степень изменчивости завязываемости семян у ремонтантных сеянцев земляники в разные сроки плодоношения.

и № 11/137-8 следует считать перспективными для дальнейшей селекционно-генетической работы по совершенствованию комбинационной эффективности скрещиваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате использования линейных скрещиваний получены простые линейные гибриды ремонтантной крупноплодной земляники, представленные растениями семей № 119, № 120 и № 121. В этих семьях растения имеют сокращенный период вступления в плодоношение, 4–5 месяцев, при условии высева семян в начале февраля и непрерывный характер плодоношения. По результатам изучения гибридного потомства выделяются семьи № 120 и № 121, которые удовлетворяют принципам семенного воспроизводства сортовой ремонтантной крупноплодной земляники. Растения этих семей стабильно плодоносят, их ягоды обладают хорошим вкусом и могут использоваться как в свежем виде, так и для переработки и заморозки. Посадив розетку земляники такого нейтральнодневного сорта, спустя два месяца можно уже получить урожай. В плодоношение нейтральнодневные растения вступают на 10–12 дней раньше обычных однократноцветущих за вегетацию сортов. Они могут плодоносить весь вегетационный период с апреля по ноябрь при условии их выращивания в весеннее и осеннее время в закрытом грунте. Помимо высокой урожайности нейтральнодневные растения очень декоративны и могут выращиваться в шпалерной культуре. Сам подход – использование линейных скрещиваний для создания однородных потомств – следует считать перспективным для создания сортов ремонтантной крупноплодной земляники, сохраняющих сортоспецифичность при семенном размножении.

Работа выполнена по бюджетному проекту № VI.53.1.3.

ЛИТЕРАТУРА

- Аполинарьева И.К., Батурич С.О., Петрук В.А. Фенологические наблюдения в семенных потомствах ремонтантной крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2013. № 3. С. 59–65.
- Батурич С.О., Аполинарьева И.К., Петрук В.А. Оценка всхожести семян и сортовой однородности семенного потомства ремонтантных коммерческих сортов крупноплодной земляники // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2010. № 1. Р. 40–45.
- Батурич С.О., Сухарева Н.Б., Малецкий С.И. Использование апомиксиса для изучения наследования ремонтантности у земляники крупноплодной (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1418–1424.
- Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений // Ботан. журнал. 1973. Т. 59. № 6. С. 826–831.
- Волкова Т.И. Ремонтантная земляника. М.: Наука, 2000. 142 с.
- ГОСТ 12420-81. Семена многолетних цветочных культур. Посевные качества. Технические условия. М.: ИПК Издательство стандартов, 1988. 12 с.
- ГОСТ 13056.6-97. Семена деревьев и кустарников. Метод определения всхожести. М.: ИПК Издательство стандартов, 1998. 27 с.
- Дука С.Х. Биология и селекция садовой крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Науч. тр. Украинского НИИ садоводства. Киев: Гос. изд-во с.-х. лит-ры УССР, 1959. 119 с.
- Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. М.: Наука, 1973. 256 с.
- Левина Р.Е. Морфология и экология плодов. Л., 1987. 160 с.
- Методика проведения испытаний на отличимость, однородность и стабильность. Земляника *Fragaria* L. М., 2008. 16 с.
- Ahmadi H., Bringham R.S., Voth V. Modes of inheritance of photoperiodism in *Fragaria* // J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1990. V. 115. P. 146–152.
- Batley N., Le Meire P., Tehranifar A., Cecik C., Taylor S., Shrivs K., Hadley P., Greenland A., Darby J., Wilkinson M. Genetic and environmental control of flowering in strawberry // Genetic and environmental manipulation of horticultural crops / Ed. G.D. Cockshull, K.E. Seymour, G.B. Thomas B. CAB International. Wallingford. UK. 1998. P. 111–131.
- Bentvelsen G.C.M., Bouw E. Breeding ornamental strawberries // Acta Hort. (ISHS). 2006. V. 708. P. 455–457.
- Bentvelsen G.C.M., Bouw E., Veldhuyzen van Zanten J.E. Breeding strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) from seed // Acta Hort. (ISHS). 1997. V. 1. No. 439. P. 149–153.
- Darrow G.M. Everbearing strawberries // The Strawberry, History, Breeding and Physiology / Ed. Holt, Rinehart, Winston. N.Y., 1966. P. 165–174.
- Hummer K.E., Bassil N., Njuguna W. *Fragaria* // Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits / Ed. C. Kole. Berlin: Springer, 2011. P. 17–44.
- Hytönen T. Regulation of strawberry growth and development. Academic dissertation. Helsinki Univ. Print, Helsinki. 2009. 62 p.
- Morrow E.B., Darrow G.M. Effect of limited inbreeding in strawberry // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1952. V. 59. P. 269–276.
- Powers L. Inheritance of period of blooming in progenies of Strawberries // Proc. Amer. Soc. Hort. Sci. 1954. V. 64. P. 293–298.
- US Patent 5585540. *Fragaria* plants and seeds. 1996. http://www.patentstorm.us/inventors-patents/Willem_Sterk/2122660/1.html

Аполинарьева И.К., Батурич С.О., Петрук В.А. Фенологические наблюдения в семенных потомствах ремонтантной крупноплодной земляники (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) // Сиб. вестн. с.-х. науки. 2013. № 3. С. 59–65.

Батурич С.О., Аполинарьева И.К., Петрук В.А. Оценка

**PROSPECTS OF OBTAINING UNIFORM SEED PROGENY
OF EVERBEARING GARDEN STRAWBERRY
(*FRAGARIA* × *ANANASSA* Duch.)**

S.O. Baturin¹, I.K. Apolinarieva², A.A. Kuzmina³

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

² Siberian Physical-Technical Research Institute of Agrarian Problems,
Russian Academy of Agricultural Sciences, Novosibirsk, Russia;

³ Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding,
Krasnoobsk, Novosibirsk oblast, Russia

Summary

It is difficult to reach seed uniformity in *Fragaria* × *ananassa* Duch. ($2n = 8x = 56$) because of the high ploidy level of this species and polysomic inheritance of characters, including reproductive ones, and, correspondingly, to raise varieties propagating by seeds. The present work demonstrates efficiency of line crossings for achieving uniformity within everbearing strawberry seed progeny. Examination of three progeny lines resulting from line crossings of everbearing garden strawberry testified uniformity of major biomorphological traits. The seedlings were capable to produce yield four to five months after germination, which allows harvesting berries in West Siberia in August, September, and, partially, in October.

Key words: garden strawberry, *Fragaria ananassa*, breeding, seasonal flowering, everbearing, flowering duration, seed reproduction.

УДК 575.224.2

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАРКЕРОВ ОРГАНЕЛЬНОЙ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА ФИЛОГЕОГРАФИИ ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЕЛИ ЕВРОПЕЙСКОЙ *PICEA ABIES* (L.) H. KARST.

© 2014 г. Е.К. Потокина^{1,2}, А.А. Киселева^{1,4}, М.А. Николаева²,
С.А. Иванов², П.С. Ульянич², А.Ф. Потокин^{2,3}

¹ Всероссийский институт растениеводства им. Н.И. Вавилова,
Санкт-Петербург, Россия, e-mail: e.potokina@vir.nw.ru;

² Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет им. С.М. Кирова,
Санкт-Петербург, Россия;

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия;

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 9 сентября 2014 г. Принята к публикации 3 октября 2014 г.

История формирования ареала ели европейской на территории Восточно-Европейской равнины обсуждается по результатам анализа аллельного разнообразия митохондриального гена *Nad1*, имеющего материнскую природу наследования, и межгенного спейсера *trnT-trnF* хлоропластной ДНК, наследуемой у елей по отцовской линии. Полиморфизм генов органельной ДНК проанализирован на выборке из 221 ели из 28 регионов РФ, представленной в географических культурах. У елей всех регионов европейской части РФ выявлены аллели *Nad1*, типичные для «северной семьи» *Picea abies*, распространенные также в Скандинавии и Западной Европе. Аллель *Nad1*, характерный для «южной семьи» *P. abies*, обнаружен в популяциях ели из Закарпатья. Аллель *Nad1*, видоспецифичный для *P. obovata*, выявлен только у елей из Свердловской области и Красноярского края. У проанализированных деревьев обнаружены гаплотипы хлДНК, как характерные для *P. obovata*, так и специфичные для *P. abies*. Анализ полиморфизма органельной ДНК позволяет выявить гибридную природу елей, развившихся в результате переопыления между особями разных видов.

Ключевые слова: Филогеография, органельная ДНК, молекулярные маркеры, *Nad1*, *trnT-trnF*, *Picea*, географические культуры.

ВВЕДЕНИЕ

Процессы интрогрессивной гибридизации, протекающие на территории Русской равнины в популяциях ели европейской (*P. abies* (L.) H. Karst.) и ели сибирской (*P. obovata* Ledeb.), интенсивно изучаются с использованием морфометрических и молекулярно-биологических методов. Естественные гибриды между *P. abies* и *P. obovata*, часто обособляемые в отдельный таксон *P. fennica* (Regel) Kom. (ель финская), представляют интерес не только для систематиков, но и специалистов по лесному хозяйству. Сообщается, в частности, о связи между про-

дуктивностью и таксономической принадлежностью образцов ели сибирской, ели европейской и ели финской (Егоров и др., 2011). Вопрос о разработке молекулярных маркеров, позволяющих идентифицировать виды елей, а также их возможных гибридов является актуальным.

У сравнительно долгоживущих организмов, таких, как древесные хвойные, очертание ареала и популяционно-генетическая структура вида несут отпечаток истории послеледниковых миграций (Newton *et al.*, 1999). *P. abies* – один из первых видов древесных растений, которые колонизировали Центральную Европу после последнего оледенения, примерно 12 тыс. лет

назад (по: Gugerli *et al.*, 2001). Считается, что ели европейской удалось уцелеть, благодаря нескольким рефугиумам. Один гипотетический рефугиум располагался в европейской части России, откуда в западном и северо-западном направлении, вслед за отступающим Скандинавским ледниковым щитом, мигрировала так называемая «северная семья» ели европейской (northern lineage, по: Tolledsrud *et al.*, 2008a). В настоящее время эта северная группа популяций ели широко представлена в Скандинавии, странах Западной Европы и Прибалтике (Giesecke, Bennett, 2004). «Южная семья» (southern lineage) ели европейской распространилась в Центральной Европе из рефугиумов в горах Европы, включая Альпы, Карпаты и горы Балканского полуострова. Таким образом, в Западной Европе естественный ареал *P. abies* в настоящее время представлен двумя обособленными территориями: северо-восточная лесная часть и горы Центральной Европы (Schmidt-Vogt, 1977) (рис. 1). В районе Среднепольской возвышенности имеет место дизъюнкция ареала («spruceless zone»), которая, возможно, возникла в результате послеледниковой миграций популяций ели во встречных направлениях (Dering *et al.*, 2009). Недавно опубликованные филогенетические исследования рода *Picea*, основанные на анализе органельной и ядерной ДНК, свидетельствуют о том, что обособление северной и южной «семей»

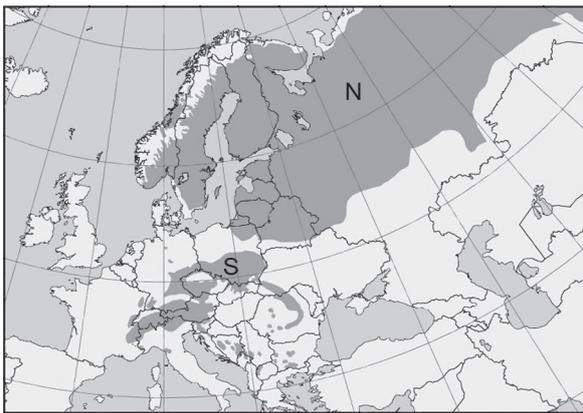


Рис. 1. Ареал *P. abies* в Европе с дизъюнкцией в районе Среднепольской возвышенности (по: (Schmidt-Vogt, 1977)).

N и S – разграниченные дизъюнкцией области распространения северной и южной «семей» ели европейской по результатам анализа мтДНК (Tolledsrud *et al.*, 2008a).

P. abies могло произойти гораздо раньше, около 6 млн лет назад, задолго до начала последнего оледенения (Lockwood *et al.*, 2013).

Для уточнения вопросов филогеографии видов хвойных эффективно используется полиморфизм митохондриального (мтДНК) и хлоропластного (хлДНК) геномов. мтДНК наследуется исключительно по материнской линии, что означает распространение различных вариантов мтДНК через семена, но не посредством пыльцы. Из-за отсутствия рекомбинации мтДНК наследуется как единый гаплотип – набор тесно сцепленных локусов (Минченко, Дударева, 1990). Исследование полиморфизма митохондриальных генов является хорошей основой для изучения процессов миграции и географической разрозненности популяций вида (Sperisen *et al.*, 2001). хлДНК также представляет интерес для филогенетических исследований, благодаря особенностям наследования. Для семейства *Pinaceae* доказано отцовское наследование хлДНК (Sears, 1980; Neale, Sederov, 1989; Neale *et al.*, 1991; Sutton *et al.*, 1991). Суммируя данные, полученные с использованием маркеров мтДНК и хлДНК, можно оценить относительный вклад пыльцы и семян в общем потоке генов, идентифицировать родительские формы гибридов и, таким образом, вести мониторинг процессов интрогрессивной гибридизации между *P. abies* и *P. obovata*.

Цель нашего исследования состояла в том, чтобы по результатам анализа полиморфизма митохондриального гена *Nad1* и межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК на выборках популяций ели из разных регионов европейской части РФ установить материнскую линию наследования интрогрессивных форм *P. abies*–*P. obovata*, населяющих территорию европейской части РФ, и оценить частоту встречаемости гибридных елей, возникших в результате переопыления особей *P. abies* пыльцой *P. obovata*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследований были использованы ели из географических культур, заложенных в 70-х годах прошлого столетия в различных регионах европейской части России с целью разработки и совершенствования лесосеменного районирования. Закладка объектов

осуществлялась в 1977 г. по единой государственной методике. Испытанию подлежали 35 климатипов – популяций ели из разных областей и республик бывшего СССР. Разница между крайними популяциями по широте составила 19,70° (Мурманская область – Закарпатье), по долготе – 43,00° (Литва – Свердловская область). Семена этих популяций были высеваны в разных климатических зонах РФ структурированными плантациями, которые на сегодняшний день и представляют собой, собственно, географические культуры. Один из изучаемых вариантов таких географических культур расположен в Любанском лесничестве (Тосненский лесхоз, Ленинградская область), другой вариант – в Караидельском лесничестве (Южно-Уральский лесостепной район, Республика Башкортостан). Географические культуры являются удобным объектом изучения внутривидового генетического разнообразия, так как представляют собой репрезентативную выборку популяций ели из разных регионов европейской части РФ, выращенных в одинаковых условиях. В исследовании вошли 28 климатипов ели (табл. 1). Дополнительно были исследованы также образцы елей, собранные в период экспедиции в Красноярский край (заповедник «Столбы»), для увеличения числа образцов «чистого» вида *P. obovata*.

Анализ полиморфизма продуктов ПЦР

Для проведения молекулярно-генетического анализа в качестве матрицы использовалась ДНК, выделенная СТАВ-методом по Vousquet с соавт. (1990) из свежей хвои, собранной в географических культурах *P. abies*, *P. obovata* и их гибридов, произрастающих в Любанском и Караидельском лесничествах.

Для анализа аллелей митохондриального гена *Nad1*, содержащего tandemные минисателлитные повторы, полимеразно-цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием термоциклера GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1× буфер для *Taq*-полимеразы (pH 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Силекс, Россия), 200 мкмоль dNTPs, 0,5 мкмоль каждого из праймеров, 1 ед. *Taq*-полимеразы (Диалат, Россия) и 2 мкл (30–60 нг) исследуемой ДНК.

Для проведения ПЦР использовались праймеры, опубликованные Gugerli (2001): прямой – CTCTCCCTCACCCATATGATG; обратный – AGATCCCCATATATGCCCCGG, а также режим проведения ПЦР, рекомендованный автором: преденатурация – 3 мин при 94 °С, далее 26 циклов (1 мин – 94 °С, 1 мин – 57 °С и 2 мин – 72 °С), заключительный этап – 5 мин при 72 °С. Полученные продукты ПЦР были подвергнуты рестрикции с *EcoRV* для укорочения области, содержащей повторяющиеся элементы. Это позволяет более точно установить размеры амплифицированной последовательности (Tollefsrud *et al.*, 2008a). Рестрикцию с использованием *EcoRV* проводили в объеме 15 мкл, содержащем 3 мкл ПЦР-продукта, 10,25 мкл воды, 1,5 мкл буфера и 0,25 мкл (1 ед.) рестриктазы в течение 3 ч при + 37 °С.

Анализ размера рестрикционных фрагментов осуществлялся с использованием автоматической станции капиллярного электрофореза высокого разрешения QIAxcel System Capillary Electrophoresis (Qiagen). При использовании QIAxcel длина фрагментов рассчитывалась с помощью внутренних стандартов, в качестве которых использованы маркеры соответствия (QX Alignment Marker 15bp/3kb), устанавливающие верхний (3000 н.п.) и нижний (15 н.п.) порог детекции. Одновременно использовался внутренний стандарт – набор фрагментов ДНК известного размера (QX Size Marker 25bp/1,8kb), различающихся по длине на 25 нуклеотидов.

ПЦР-фрагменты, различающиеся по длине по результатам рестрикционного анализа, секвенировали в двух повторностях (Евроген, Москва) с использованием прямого и обратного праймеров. Выравнивание ДНК-последовательностей проводили с использованием BioEdit 7.1.

Для анализа полиморфизма межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК были использованы «универсальные» праймеры Taberlet с соавт. (1991): «а» – CATTACAAATGCGATGCTCT, «d» – GGGGATAGAGGGACTTGAAC. Реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала 1×буфер для *Taq*-полимеразы (pH = 8,6, 2,5 mM Mg²⁺) (Силекс, Россия), 200 мкмоль dNTPs, 1 мкмоль каждого из праймеров, 5 ед. *Taq*-полимеразы (Диалат, Россия) и 2 мкл (60–80 нг) исследуемой ДНК. ПЦР проводилась при следующем режиме: преденатурация – 5 мин при

Таблица 1
 Географическое происхождение елей, взятых в анализ, и гаплотипы мтДНК и хлДНК, выявленные среди различных климатипов ели европейской в географических культурах Лубанского и Карaidельского лесничеств

№ климатипа	Регион (область)	Пункт сбора	Координаты	Число генотипов в анализе	Гаплотипы мтДНК (<i>NadI</i>)		Гаплотипы хлДНК (<i>trnI-trnF</i>)		
					Северная семья <i>P. abies</i>	Южная семья <i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>	<i>P. abies</i>	
1	Мурманская	Мончегорск	67°51'N – 32°57'E	5	721				
2	Карелия	Сегежа	63°75'N – 34°31'E	7	721, 755, 823, 857				
5	Ленинградская	Тосно	59°30'N – 30°52'E	5	721, 823, 857				
6	Ленинградская	Лисино	59°30'N – 30°54'E	6	721, 789				_CAC
7	Псковская	Великие Луки	56°23'N – 30°30'E	11	721, 755, 789				_CCC, _CAC
8	Эстония	Вильянди	58°24'N – 25°38'E	10	721, 789				_CCC, _CAC
12	Могилевский	Чериковский	53°30'N – 31°24'E	6	721				_CCC, _CAC
17	Закарпатье	Раково	48°07'N – 24°03'E	10	721, 789	815			_CCC, _CAC
18	Закарпатье	Ивано-Франковск	48°50'N – 24°44'E	6	721	815			_CCC, _CAC
21	Архангельская	Коноша	60°58'N – 40°11'E	6	721, 789				_CAC
22	Архангельская	Котлас	61°15'N – 46°54'E	6	721, 857				_CAC
24	Вологодская	Череповец	59°07'N – 37°57'E	6	721, 755, 823				_CAC
25	Коми	Корткерос	61°41'N – 51°31'E	6	721				_CCC, _CAC
26	Коми	Сосногорск	63°27'N – 53°55'E	5	721, 789, 857				GCCA, _CCA

Окончание таблицы 1

№ климатического типа	Регион (область)	Пункт сбора	Координаты	Число генотипов в анализе	Гаплотипы мтДНК (<i>NadI</i>)		Гаплотипы хлДНК (<i>trnT-trnF</i>)		
					Северная семья <i>P. abies</i>	Южная семья <i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>	<i>P. abies</i>	<i>P. obovata</i>
27	Костромская	Галич	58°24'N – 42°20'E	6	721			GCCA	GCCA
28	Кировская	Слободской	58°49'N – 50°06'E	6	721, 755			_CCA	_CCA
29	Московская	Солнечногорск	56°10'N – 36°58'E	11	721, 755, 789, 857			GCCA	GCCA
29а	Московская	Загорье	56°19'N – 38°09'E	6	721			GCCA	GCCA
30	Тверская	Нелидово	56°14'N – 32°48'E	6	721			_CAC	GCCA
32	Калужская	Калуга	54°25'N – 36°16'E	6	721, 823, 857			_CAC	GCCA
34	Татарстан	Сабинский	56°00'N – 50°30'E	16	721, 755, 857			_CCC, _CAC	_CCA
35	Удмуртия	Ижевск	56°50'N – 53°10'E	6	721, 755			_CCC	_CCC
36	Башкирский	Красный Ключ	55°43'N – 55°15'E	6	721			_CAC	_CAC
38	Пермский	Красновишерск	60°12'N – 57°08'E	11	721			_CAC	GCCA
39	Пермский	Добрянка	58°16'N – 56°25'E	11	721, 857			_CAC	GCCA
40	Свердловская	Карпинск	59°51'N – 60°00'E	12	721, 755, 857			_CAC	GCCA
41	Свердловская	Нижний Тагил	51°54'N – 60°00'E	11	721, 789				
42	Свердловская	Тавда	58°04'N – 65°18'E	12	721		712		GCCA

94 °С, далее 35 циклов (45 с – 94 °С, 1 мин – 55 °С и 2 мин – 72 °С), заключительный этап – 5 мин при 72 °С. ПЦР-продукт был секвенирован в двух повторностях с использованием праймеров «а» и «д».

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ полиморфизма митохондриального гена *Nad1*

Для анализа полиморфизма мтДНК у ели были использованы маркеры, разработанные для гена *Nad1*, кодирующего первую субъединицу одного из ключевых белков дыхательной цепи NADH-дегидрогеназы (NADH dehydrogenase subunit1) (Sperisen *et al.*, 2001). *Nad1* отличается полиморфной последовательностью второго интрона, в которой присутствуют тандемные повторы длиной в 34 и 32 нуклеотида (минисателлиты). Участок в 34 нуклеотида у разных индивидуумов может повторяться от 0 до 10 раз, и смежный с ним элемент длиной 32 нуклеотида характеризуется аналогичной копийностью. Кроме того, имеются еще 11 дополнительных полиморфных сайтов, фланкирующих тандемные повторы, 5 из которых могут влиять на размер фрагмента (Sperisen *et al.*, 2001). Проведенный ранее анализ полиморфизма второго интрона митохондриального гена *Nad1* у *P. abies* (Tollesfrud *et al.*, 2008a) позволил выявить аллели, специфичные для северной и южной «семей» ели европейской, а также аллель, видоспецифичный для *P. obovata*. Все выявленные аллели различаются по длине амплифицируемого фрагмента, который варьирует от 712 п.н. (*P. obovata*) до 1027 п.н. (северная «семья» *P. abies*).

В нашем исследовании структура второго интрона гена *Nad1* была проанализирована у 221 ели, произрастающей в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств, а также трех образцов елей *P. obovata* из Красноярского края. Для первичного анализа использовалась ПЦР с последующей рестрикцией продукта эндонуклеазой *EcoRV* (рис. 2) для более точной оценки размера амплифицируемого фрагмента. После визуализации продуктов рестрикции на 1,5 %-м агарозном геле их точный размер анализировался с использованием капиллярного электрофореза высокого

разрешения (QIAxcel). Всего при анализе 221 дерева было обнаружено 9 различающихся по длине аллелей гена *Nad1*, которые были секвенированы. Результаты секвенирования выявленных аллелей представлены на рис. 3 и обобщены на рис. 4.

Семь из девяти аллелей гена *Nad1*, различающихся длиной тандемных повторов и нуклеотидными вставками-делециями различной протяженности (рис. 4), были описаны ранее Tollefsrud с соавт. (2008a) как характерные для «северной семьи» *P. abies*. Еще один аллель (815 п.н.), описанный ранее для «южной семьи» ели европейской (Tollefsrud *et al.*, 2008a), был выявлен у деревьев, выращенных из семян, собранных в Закарпатье, т. е. наиболее южной области из представленных в географических культурах и вошедших в исследование. Аллель *Nad1*, специфичный для *P. obovata*, был выявлен только у образцов ели, собранных в Красноярском крае (заповедник «Столбы»), и у единственного дерева из 36 представителей «свердловского» климатипа елей, изученных в географических культурах. Этот видоспецифичный для *P. obovata* вариант последовательности второго интрона *Nad1* длиной 712 п.н. был описан ранее Tollefsrud с соавт. (2008a). По результатам секвенирования, он отличается от всех известных аллелей «северной семьи» *P. abies* делецией в 9 нуклеотидов и двумя

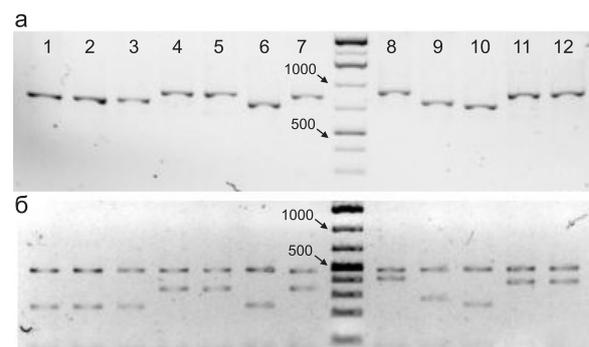


Рис. 2. Аллели митохондриального гена *Nad1*, выявленные у деревьев *P. abies* в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств с помощью геноспецифичной ПЦР (а) и последующей рестрикцией ПЦР-продукта с *EcoRV* (б).

Выявленные аллели *Nad1*: 1, 2, 3, 6, 10 – 721 п.н.; 4, 5 – 789 п.н.; 7 – 815 п.н.; 8 – 857 п.н.; 9 – 755 п.н.; 11, 12 – 823 п.н.

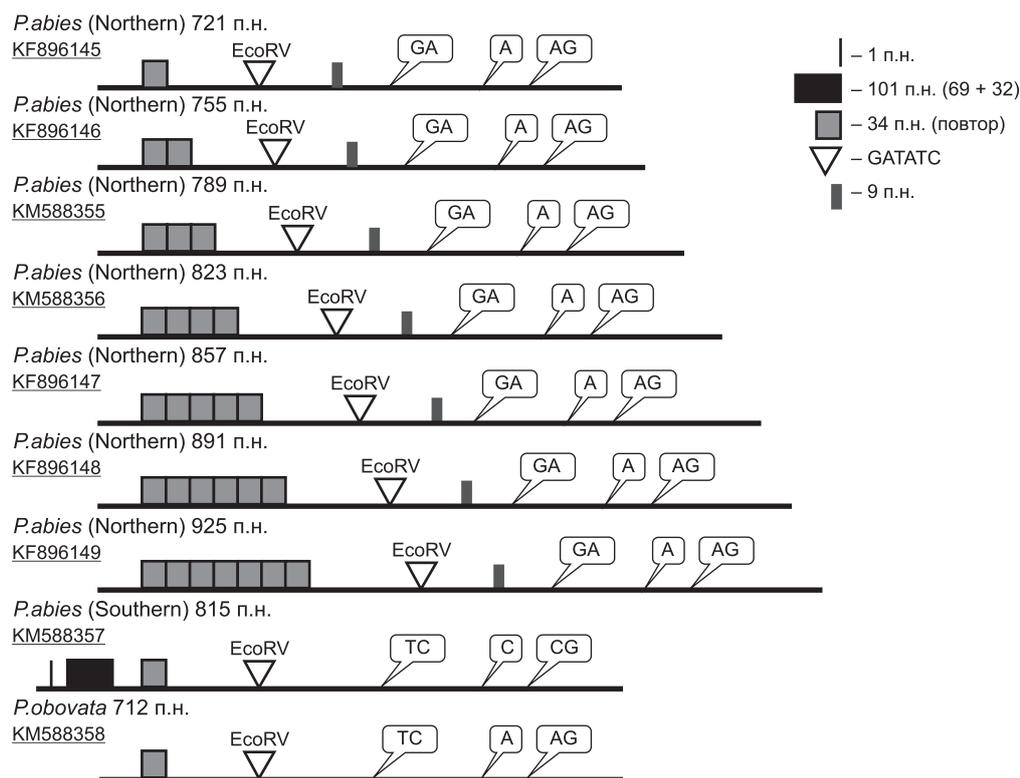


Рис. 4. Варианты структуры второго интрона митохондриального гена *Nad1*, выявленные при анализе елей в географических культурах Любанского и Караидельского лесничеств.

Треугольником отмечен сайт рестрикции *EcoRV*. Последовательности KM588355, KM588356, KM588357, KM588358 представлены к депонированию в базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI).

нуклеотидными заменами. От «южной семьи» *P. abies* его также можно отличить по двум де- лениям (рис. 4).

Таким образом, все многообразие елей, представленное в изученной выборке, по поли- морфизму митохондриального гена *Nad1* можно свести к трем кластерам, соответствующим груп- пам популяций, вероятно, связанным общностью происхождения. «Северная семья» *P. abies*, широко представленная в странах Северной Европы, объединяет также и ели, произрас- тающие практически во всех регионах евро- пейской части РФ. К «южной семье» *P. abies* относятся образцы ели из Закарпатья. К виду *P. obovata*, по результатам маркирования мт- ДНК, относятся все образцы елей из заповед- ника «Столбы» (Красноярский край) и един- ственный экземпляр в географических культурах происхождения из наиболее восточного пун- кта Свердловской области, представленного в анализе (пос. Тавда, 65°18' в.д.).

О распространении аллелей гена *Nad1* среди различных климатипов ели в географических культурах можно судить по табл. 1. Наиболее рас- пространенным является аллель длиной 721 п.н., характерный для популяций ели Северо-Запад- ного и Центрального регионов России, который также является доминирующим в популяциях «северной семьи» *P. abies* в странах Северной Европы (Tollefsrud, 2008a). Остальные аллели *Nad1* представлены значительно реже и не обнаруживают какой-либо географической приуроченности.

Анализ полиморфизма межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК

В результате ПЦР с «универсальными» прай- мерами, описанными Taberlet с соавт. (1991), амплифицируется участок межгенного спей- сера *trnT-trnF* хлДНК длиной 1031 п.н. Четыре различных варианта структуры этого участка

хлДНК (гаплотипа) были выявлены ранее при анализе 50 популяций елей с территории Восточно-Европейской равнины, которая считается зоной интрогрессивной гибридизации видов *P. abies* и *P. obovata* (Толлефсруд, Спиренсен, 2011). По мнению авторов, ель сибирская характеризуется собственным набором видоспецифичных гаплотипов межгенного спейсера *trnT-trnF*. Эти нуклеотидные последовательности были опубликованы лишь недавно (Volkova *et al.*, 2014) и в настоящее время доступны из баз данных GenBank (GenBank Acc. KF896139, KF896142). Гаплотипы спейсера *trnT-trnF* ели европейской и ели сибирской различаются четырьмя полиморфными сайтами, причем для хлоропластного генома *P. abies* характерны гаплотипы _CCC, _CAC, _TCC, GCAC и GCCC, а типичными для *P. obovata* являются гаплотипы GCCA и _CCA (Tollesfrud *et al.*, 2008b, цит. по: (Volkova *et al.*, 2014)). К сходным выводам ранее пришли Ran с соавт. (2006), которые сравнивали последовательность межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК у видов *P. abies* и *P. obovata* (DQ358149 и DQ0106), описав два видоспецифичных полиморфных сайта.

Для того чтобы установить, насколько эти описанные видоспецифичные гаплотипы межгенного спейсера *trnT-trnF* распространены среди елей, произрастающих на территории Восточно-Европейской равнины РФ, в нашем исследовании были секвенированы последовательности межгенного спейсера *trnT-trnF* у 52 елей разных климатипов, представленных в географических культурах, а также у 3 елей из Красноярского края, представляющих в анализе «чистый» вид *P. obovata*. Среди 55 проанализированных елей у 37 были обнаружены гаплотипы хлДНК, характерные для *P. abies*, у 18 елей – гаплотипы хлДНК, типичные для *P. obovata*.

В процессе анализа были выявлены особи, сочетающие аллели *P. abies* как в митохондриальном, так и хлоропластном геноме, которые теоретически можно отнести к «чистому» виду *P. abies*. Обнаружены также ели, которые несут аллели мтДНК, характерные для *P. abies*, и аллели хлДНК, характерные для *P. obovata*, что может указывать на их гибридное происхождение. Так, по результатам комбинированного анализа мтДНК и хлДНК ели из Республики Коми,

Калужской, Кировской, Архангельской, Могилевской областей были выращены из семян, завязавшихся в результате переопыления ели европейской пыльцой ели сибирской (табл. 1). Не выявлено какой-либо географической закономерности в преобладании «чистой» *P. abies* или гибридов *P. abies* × *P. obovata* в проанализированных климатипах географических культур. К «чистому» виду *P. obovata* по результатам маркирования органельной ДНК можно отнести только образцы елей из Красноярского края (заповедник «Столбы»), так как для мтДНК и хлДНК этих образцов характерны гаплотипы, типичные для *P. obovata*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

История расселения *P. abies* в Западной Европе в голоцене в настоящее время представляет достаточно ясную картину, благодаря работам по популяционной генетике и молекулярной филогеографии ели, основанной на анализе полиморфизма генов органельной ДНК (Gugerli *et al.*, 2001; Sperisen *et al.*, 2001; Tollesfrud *et al.*, 2008a). Выявленные ранее закономерности формирования ареала ели европейской в Центральной и Западной Европе сохраняются и на Восточно-Европейской равнине: практически во всех регионах европейской части РФ доминируют генотипы «северной семьи», описанной Tollesfrud с соавт. (2008a). Представители «южной семьи» – потомки елей, переживших последнее оледенение в рефугиумах Балканского полуострова (Huntley, Birks, 1983), обнаружены только в популяциях из Закарпатья. Остается неизвестным, насколько далеко распространилась эта филогенетическая ветвь в северном и северо-восточном направлениях от Карпатских гор и где сейчас проходит граница распространения «южной» и «северной» семей ели европейской на территории РФ. На сегодняшний день отсутствуют также и работы, посвященные вопросам филогеографии вида *P. obovata*, с использованием методов маркирования органельной ДНК. Возможно, этот вид имеет свою собственную историю послеледниковых миграций, которую можно было бы реконструировать при изучении полиморфизма митохондриального и хлоропластного геномов. Полученные данные могут представлять интерес для разработки стратегии

консервации лесных генетических ресурсов Сибирского региона.

Процессы интрогрессивной гибридизации елей европейской и сибирской, протекающие на территории Восточно-Европейской равнины, представляют интерес с эволюционной точки зрения (см. Попов, 2010), а также имеют важное значение для развития генетико-селекционных программ и организации мероприятий по охране и рациональному использованию биологических ресурсов (Политов, 2007). Специфика однородительского наследования митохондриального и хлоропластного геномов хвойных может быть использована для разработки ДНК-маркеров, позволяющих идентифицировать гибридные особи, возникшие в результате переопыления *P. abies* пыльцой *P. obovata*, которые, несомненно, нашли бы свое применение в селекционной практике и лесосеменном районировании. Наследование митохондриального генома у *P. abies* строго по материнской линии было подтверждено специальными исследованиями в контролируемых скрещиваниях (Bobola *et al.*, 1996; Grivet *et al.*, 1999) так же, как и отцовское наследование маркеров хлДНК у елей, которое было показано в экспериментах по получению межвидовых гибридов елей *P. mariana* и *P. rubens* (Bobola *et al.*, 1996), *P. pungens* и *P. glauca* (Stine *et al.*, 1989), *P. engelmannii* и *P. sitchensis* (Sutton *et al.*, 1991). Использование комбинации этих маркеров могло бы позволить определять гибридную природу растений, развившихся в результате переопыления между особями разных видов елей.

Несколько неясным остается вопрос о «видоспецифичности» гаплотипов межгенного спейсера *trnT-trnF* хлДНК, указанных как «типичные» для елей *P. obovata* сибирского происхождения (Толлефсруд, Спиренсен, 2011) и позднее описанных П. Волковой (Volkova *et al.*, 2014) на материале из Карелии. Имеющиеся в доступе опубликованные данные, к сожалению, не позволяют однозначно ответить на вопрос, насколько достоверно описанные гаплотипы, GССА и _ССА, межгенного спейсера *trnT-trnF* ассоциированы именно с видом *P. obovata*. Доступная информация сводится к короткому сообщению (Толлефсруд, Спиренсен, 2011) и ссылкам на неопубликованную диссертационную работу (Tollefsrud, 2008b, цит. по: (Volkova

et al., 2014)). Тем не менее использование в нашем исследовании маркеров органельной ДНК, предложенных этими авторами, подтверждает опубликованные ранее сообщения об интенсивных процессах интрогрессивной гибридизации ели сибирской и ели европейской на территории Восточно-Европейской равнины (Щербакова, 1973; Попов, 2010; Ильинов и др., 2011). Согласно результатам анализа полиморфизма органельной ДНК на выборке деревьев, представленных в географических культурах, популяции ели на территории европейской части РФ сформированы генотипами *P. abies* и гибридными формами *P. abies* × *P. obovata*. И те и другие могут быть идентифицированы по специфичным различиям в последовательности митохондриальной и хлоропластной ДНК. Результаты нашего исследования подтверждают опубликованные ранее сообщения о том, что «нативный» вид *P. obovata* на территории европейской части России, вероятно, не представлен и встречается к востоку от Уральских гор (Толлефсруд, Спиренсен, 2011). Полученные выводы основаны на результатах анализа популяционных выборок, представленных в географических культурах ели. Для получения более точной картины распространения гибридных форм ели в европейской части РФ и сведений о частотном географическом градиенте встречаемости межвидовых гибридов необходим более детальный анализ природных популяций.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-01418а и научного проекта №37.1521.2014/К Минобрнауки РФ в рамках реализации проектной части государственного задания.

ЛИТЕРАТУРА

- Егоров А.А., Бурцев Д.С., Орлова Л.В. и др. Продуктивность видов и внутривидовых таксонов *Picea abies*, *P. fennica*, *P. obovata* в географических культурах на Северо-Западе России // Уч. записки Петрозаводского гос. ун-та. 2011. Т. 121. № 8. С. 59–64.
- Ильинов А.А., Раевский Б.В., Рудковская О.А. и др. Сравнительная оценка фенотипического и генетического разнообразия северотаежных малонарушенных популяций ели финской (*Picea* × *fennica*) // Тр. Карельского науч. центра РАН. 2011. Т. 1. С. 37–47.

- Минченко А.Г., Дударева Н.А. Митохондриальный геном. Новосибирск: Наука, 1990. 194 с.
- Политов Д.В. Генетика популяций и эволюционные взаимоотношения видов сосновых (сем. *Pinaceae*) Северной Евразии: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 2007. 47 с.
- Попов П.П. Формовая структура и географическая дифференциация популяций ели на северо-западе России // Экология. 2010. № 5. С. 336–343.
- Толлефсруд М.М., Спиренсен Х. Отцовская интрогрессия от ели сибирской (*Picea obovata*) к ели обыкновенной (*P. abies*): отслеживание потока пыльцы и семян с помощью хлоропластной и митохондриальной ДНК // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Матер. 3-го междунар. совещ. Красноярск, 2011. С. 166–167.
- Щербакова М.А. Генэкология ели обыкновенной *Picea abies* (L.) Karst. в разных лесорастительных районах: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Красноярск, 1973. 47 с.
- Bobola M., Guenette D., Eckert R. *et al.* Using nuclear and organelle DNA markers to discriminate among *Picea rubens*, *Picea mariana*, and their hybrids // Can. J. Forest Res. 1996. V. 26. No. 3. P. 433–443.
- Bousquet J., Simon L., Lalonde M. DNA amplification from vegetative and sexual tissues of trees using polymerase chain reaction // Can. J. Forest Res. 1990. V. 20. P. 254–257.
- Dering M., Lewandowski A. Finding the meeting zone: Where have the northern and southern ranges of Norway spruce overlapped? // Forest Ecol. Manag. 2009. V. 259. P. 229–235.
- Giesecke T., Bennett K.D. The Holocene spread of *Picea abies* (L.) Karst. in Fennoscandia and adjacent areas // J. Biogeogr. 2004. V. 31. P. 1523–1548.
- Grivet D., Jeandroz S., Favre J. *Nad1* b/c intron polymorphism reveals maternal inheritance of the mitochondrial genome in *Picea abies* // Theor. Appl. Genet. 1999. V. 99. No. 1/2. P. 346–349.
- Gugerli F., Sperisen C., Büchler U. *et al.* Haplotype variation in a mitochondrial tandem repeat of Norway spruce (*Picea abies*) populations suggests a serious founder effect during postglacial re-colonization of the western Alps // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 1255–1263.
- Huntley B., Birks H. An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0–13,000 BP. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 1983.
- Lockwood J.D., Aleksić J.M., Zou J. *et al.* A new phylogeny for the genus *Picea* from plastid, mitochondrial, and nuclear sequences // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. V. 69. No. 3. P. 717–727.
- Neale D., Sederoff R. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 77. No. 2. P. 212–216.
- Neale D., Marshall K., Harry D. Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in incense-cedar (*Calocedrus decurrens*) // Can. J. Forest Res. 1991. V. 21. No. 5. P. 717–720.
- Newton A.C., Allnutt T.R., Gillies A.C.M. *et al.* Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species // Trends Ecol. Evol. 1999. V. 14. P. 140–145.
- Ran J., Wei X., Wang X. Molecular phylogeny and biogeography of *Picea* (*Pinaceae*): Implications for phylogeographical studies using cytoplasmic haplotypes // Mol. Phylogenet. Evol. 2006. V. 41. P. 405–419.
- Schmidt-Vogt H. Die Fichte, Band I // Taxonomie. Verbreitung. Morphologie. Ökologie. Waldgesellschaft. Hamburg und Berlin. Verlag Paul Parey, 1977. T. 647.
- Sears B. Elimination of plastids during spermatogenesis and fertilization in the plant kingdom // Plasmid. 1980. V. 4. No. 3. P. 233–255.
- Sperisen C., Buchler U., Gugerli F. *et al.* Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce // Mol. Ecol. 2001. V. 10. P. 257–263.
- Stine M., Sears B., Keathley D. Inheritance of plastids in interspecific hybrids of blue spruce and white spruce // Theor. Appl. Genet. 1989. V. 78. No. 6. P. 768–774.
- Sutton B., Flanagan D., Gawley J. *et al.* Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in *Picea* and composition of hybrids from introgression zones // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. No. 2. P. 242–248.
- Taberlet P., Gielly L., Pautou G., Bouvet J. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA // Plant Mol. Biol. 1991. 17. P. 1105–1109.
- Tollefsrud M.M., Brochmann C., Sperisen C. Paternal introgression from Siberian spruce (*Picea obovata*) to Norway spruce (*P. abies*): tracing pollen and seed flow with chloroplast and mitochondrial DNA // Phylogeography, diversity and hybridization in Norway spruce / M.M. Tollefsrud. PhD thesis. University of Oslo, Norway. 2008b.
- Tollefsrud M., Kissling R., Gugerli F. *et al.* Genetic consequences of glacial survival and postglacial colonization in Norway spruce: combined analysis of mitochondrial DNA and fossil pollen // Mol. Ecol. 2008a. V. 17. No. 18. P. 4134–4150.
- Volkova P., Shipunov A., Borisova P. *et al.* In search of hybridity: the case of Karelian spruces // Silva Fennica. 2014. V. 48. No. 2. Art. id 1072. 14 p. <http://dx.doi.org/10.14214/sf.1072>

**ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF ORGANELLE DNA
TO ELUCIDATE THE PHYLOGEOGRAPHY
OF NORWAY SPRUCE IN THE EAST EUROPEAN PLAIN**

**Е.К. Potokina^{1,2}, А.А. Kiseleva⁴, М.А. Nikolaeva²,
S.A. Ivanov², P.S. Ulianich², A.F. Potokin^{2,3}**

¹ Vavilov Institute of Plant Industry, St. Petersburg, Russia, e-mail: e.potokina@vir.nw.ru;

² Saint Petersburg State Forest Technical University, St. Petersburg, Russia;

³ Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia;

⁴ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Summary

The history of Norway spruce distribution in the East European plain is discussed with regard to the results of allele diversity survey of the mitochondrial *Nad1* gene, which is maternally inherited, and the chloroplast *trnT-trnF* region, which is paternally inherited in spruce. The polymorphism of organelle DNAs was examined in 221 genotypes from 28 regions of the former USSR in geographical provenances. Alleles common for the northern *Picea abies* lineage were detected in accessions originated from the most regions investigated. The *Nad1* allele typical for the southern lineage of *P. abies* was discovered just in spruces originated from Carpathians. The *Nad1* allele typical for *P. obovata* was found in spruces from the Sverdlovsk (Urals) and Krasnoyarsk (Siberia) oblasts. Among the trees analyzed, some had chloroplast DNA sequences (*trnT-trnF*) assigned to *P. abies*, others carried cpDNA haplotypes fixed for *P. obovata*. Analysis of organelle DNA allows revealing the hybrid nature of spruces resulting from cross-pollination of different species.

Key words: phylogeography, organelle DNA, molecular markers, *Nad1*, *trnT-trnF*, *Picea*, geographical provenances.

УДК 631.9+581.6

THE LOST ANCESTOR OF THE BROAD BEAN (*Vicia faba* L.) AND THE ORIGIN OF PLANT CULTIVATION IN THE NEAR EAST

© 2014 г. O.E. Kosterin

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

Поступила в редакцию 29 августа 2014 г. Принята к публикации 1 сентября 2014 г.

The broad bean (*Vicia faba* L.) was among the founder crops of the Near East; nevertheless, its wild close relatives remain unknown. Presumably, its missing wild progenitor had a small range within the Levant and was associated with restricted habitats, so that it was domesticated entirely as a species. Its habitats are supposed to have been situated along floodplain/slope borders (“transeluvial-accumulative barriers”) providing favorable edaphic conditions. These restricted natural habitats of the broad bean could be foci of early cultivation activities, thus becoming nascent fields. It is hypothesized that the broad bean, a conspicuous plant with large seeds and restricted habitats, could be the Near Eastern “primer crop”, which provoked the first emergence of the idea and practice of plant cultivation and “invention” of the field.

Key words: *Vicia faba* L., Near East, origin of plant cultivation, plant domestication, founder crops, primer crop, slope/floodplain joint.

INTRODUCTION

The broad bean, *Vicia faba* L., is known as a cultivated plant from the very onset of agriculture (Hanelt, 1972; Zohary, Hopf, 2000) and is an important crop until the present. According to the most recent revision, *V. faba* represents a monospecific section in its genus, nearly warranting upgrade to generic rank (Maxted, 1993). Until the present, neither wild representatives of this species nor any closely related species have been found (Ladizinsky, 1975; Maxted *et al.*, 1991; Maxted, Kell, 2009). The absence of a link to the extant wild flora made the broad bean scarcely considered in reconstructions of the origin of plant cultivation and domestication in the Near East. However, the absence of a wild relative of some specific crop may be as such meaningful and indicative, as discussed below.

BROAD BEAN AMONG FOUNDER CROPS

The broad bean has been found in quite a number of the earliest archaeological sites in the Levant, namely in ten sites referring to the Pre-

Pottery Neolithic B (PPNB, ca 8,700-6,000 BC), the time of early plant cultivation: three in the Jordan basin: Jericho II (Hopf, 1983), Yiftahel (Kislev, 1985), “Ain Ghazal (Rollefson *et al.*, 1985); one at the Orontes: Tell el-Kerkh (Tanno, Willcox, 2006a); four in the upper Euphrates basin: Tell Abu Hureyra II (Hillman, 1975; de Moulins, 2000), Tell Halula, Dja’de (Willcox, 1996), Nevali Çori (Pasternak, 1998), Cafer Höyük IX-XIII (de Moulins, 1997) and one at the upper Tigris: Çayönü (van Zeist, de Roller, 1992). The broad bean was also reported for two sites in the Jordan valley referring to the earlier Pre Pottery Neolithic A (PPNA, ca 9,800–8,700 BC), when nascent plant cultivation was probably arising, namely Jericho I (dating range 9,150–8,350 BC) and, less surely, Iraq ed-Dub (9,700–8,800 BC), but these records remain dubious with respect to exact archaeological layer and species identification (Colledge, 2001). There is some uncertainty with respect to identification of *V. faba* seeds, which in some cases could not be distinguished from those of *Vicia narbonensis* L. and were identified as *Vicia* sp., so the actual number of Neolithic sites where *V. faba* was found may

be greater (Kislev, 1985; Tanno, Willcox, 2006a). The broad bean seeds found in archaeological sites provide no information if the plant was collected in the wild or cultivated. It is noteworthy that in Yiftahel (Kislev, 1985) and Tell el-Kerkh (Tanno, Willcox, 2006a), broad bean seeds were found in very large quantities. *V. faba* was not included in the set of the so-called “founder crops” of the Near East (Zohary, Hopf, 2000; Weiss, Zohary, 2011). Fuller *et al.* (2012) referred to it as one of the “lost crops”, although it was the ancestor which is lost, not the crop. Tanno and Willcox (2006a) and Abbo *et al.* (2013. P. 816) reasonably proposed to include broad bean into the founder crop set: “We see no reason why the broad bean cannot be added to the classical eight “founder” crops list (Zohary, Hopf, 2000), as advocated earlier by Tanno and Willcox (2006b). We presume that Zohary and Hopf (2000, and in earlier editions) refrained from doing so simply because the wild ancestor of broad bean is still elusive (Zohary, Hopf, 2000)”.

The area of the broad bean domestication is supposed either very broadly as “between Afghanistan and East Mediterranean” (Hanelt, 1972; Maxted, Kell, 2009. P. 133) or as two options: “the Near East, which is the centre of diversity of section *Faba* [in a broad sense by Kupicha], and Afghanistan, where the most primitive forms of *V. faba* occur” (Maxted *et al.*, 1991). The second option (Afghanistan), proposed by Ladizinsky (1975) is, however, unlikely since the archeological records of cultivated *V. faba* in the Near East far predate the onset of agriculture in Afghanistan (Cubero, 1984). The diagnostic characters of *V. faba* subsp. *paucijuga* Murat., cultivated in Afghanistan, Pakistan and N India, namely, the greater number of leaflet pairs per leaf (3–4) and flowers per inflorescence (4–11), were supposed to be plesiomorphic (Muratova, 1937; Maxted *et al.*, 1991; Maxted, Kell, 2009) but the arguments are not convincing. Moreover, the very necessity of subspecies division of *V. faba*, is not well justified (Cubero, 1973, 1984). The substantial diversity found in recent broad beans has most probably been accumulated already under cultivation, by mutation, isolation during expansion of the crop, and selection, since little intraspecies divergence was found in the entire species (“a strong nucleus, which carries the maximum of potentialities of the species and from which different populations branch”) (Cubero, 1973. P. 59).

AN ANCESTOR MISSING

Since Alphonse de Candolle (1882), the standard logic for locating the area of plant domestication, at least in the Near East, was the search for areas where all or most of wild relatives of the founder crops still exist until the present (Lev-Yadun *et al.*, 2000; Abbo *et al.*, 2011a, 2012). This approach has to leave aside a founder crop which no longer has its extant wild representatives or close relatives. One may, however, suppose that such a species was domesticated entirely as is, rather than was “taken for cultivation from nature”, so that its natural range and habitats were small and entirely converted to nascent agrocenoses.

The wild progenitor of the broad bean is supposed to be either extinct (Hanelt, 1972; Schäfer, 1973; Abbo *et al.* 2013) or not yet found (De Wouw *et al.*, 2001; Abbo *et al.*, 2013). However, perhaps the simplest explanation could be that it had a restricted natural range and habitat and so was domesticated entirely. Its cautious version is found in literature: “... material in the centre of origin was bred extensively so obliterating the remains of the original forms” (Maxted *et al.*, 1991. P. 136).

A PUTATIVE HABITAT

What conjectures can we make about the lost broad bean wild ancestor based on the present day crop? This is a large and conspicuous annual herb with stiff erect stems and broad foliage. It is hygrophilous and demands heavy clayey humid soils rich in humus and carbonates (Muratova, 1937). These traits suggest for the broad bean wild progenitor an open habitat with fertile soil and a good water supply. This kind of habitat is far from widespread in the Near East. In spite of a considerable variability of the seed size among present day cultigens, and although the earliest cultivated forms were rather small-seeded (Maxted, 1993), the broad bean is still a champion for this parameter among legume crops of Near Eastern origin. Thus there is little doubt that its wild ancestor was among wild Near Eastern herbaceous legumes with the largest seeds.

The large seeds may be advantageous in growth competition of seedlings among annual plant species; or an adaptation to drought after germination as allowing early growth of a deep root. At last, it

may be supposed to serve for successful germination in conditions of relatively deep burial (note the broad bean has a hypogeal type of germination). Domestication of a crop was usually followed (or accompanied) by gradual seed enlargement, which was supposed to be an adaptation to deeper seed burial under cultivation than achieved with natural seed dispersal (Harlan *et al.*, 1973; Smith, 2006; Fuller, 2007), with germinating ability at deep burial experimentally shown to correlate with seed mass for five of eight grain legume species tested (Kluyver *et al.*, 2013). Analogous situations of deeper burial can be found in nature, for instance, beneath occasional alluvium deposited by sudden floods in river floodplains. In pre-agricultural times, the floodplains of major rivers received seasonal delivery of thick alluvium. They were swampy and dominated by large perennial plants propagating via rhizomata or stolons, with participation of tiny “floodland ephemeratum” (annual plants with very short life span specific to floodlands). However, we may suppose that natural growth of the broad bean progenitor occurred at the most elevated levels of floodplains along their margins, where they meet the valley slopes, thus locally rimming the slope bases. In terms by the seminal work by B.B. Polynov (1937) considering soil chemistry in a geomorphological context, this position was the border between the transeluvial position of a hill/mountain slope and the accumulative position of floodplain. This transitional landscape position, once termed “transeluvial-accumulative barrier” (Glazovskaya, 1964; Stebaev *et al.*, 1993), is an ecotone known for its very high biological productivity because of soils enjoying permanently sufficient amount of ground water (provided by springs at slope bases as well as by the river), oxygen and nutrients (Stebaev *et al.*, 1993). It is irregularly (not every year) reached by the highest floods and the soil is expected to be irregularly and moderately disturbed by slope creeps and linear erosion as well as by occasional deposit of thin alluvium.

It is noteworthy that many species of the plant communities of the slopes are usually found still growing along the slope bases, partly because of accumulation of seeds washed down or fallen from above, so the slope bases are the habitats richest in species across a valley. In the Near East they could include wild progenitors of other annual founder crops, with seeds smaller than those of the broad

bean. Moreover, there they could undergo some natural selection for greater seed mass which increases the chances of a seed descending the slope by gravitation and ensures its germination from under the thin alluvial deposit. Various species from the slope plant communities could facultatively grow at the slope margins, however the characters of the contemporary broad bean tempts us to suppose its wild progenitor to be specialised to this very habitat. Judging from the archaeological evidence from the Levant cited above, the wild broad bean progenitor’s native range could comprise the valley(s) of some of the upper Orontes, Euphrates and Tigris Rivers or their major tributaries, but unlikely spread over all these valleys.

It is not possible to indicate at a plant association in which the faba bean wild progenitor once participated; moreover, the below hypothesis on its role in the origin of plant cultivation implies that this association, as a nascent agrocoenosis, disappeared in its natural state together with the progenitor itself.

INVENTION OF THE FIELD

Origin of agriculture associated with domestication of plants, together with domestication of animals comprising the so-called Neolithic Revolution, was followed by a dramatic rise in human population density and hence was one of the main pre-requisites of civilisation. No doubt it took place several times in different continents, independently and non-synchronously (Vavilov, 1951; Harlan, 1971; Zohary, 1999; Smith, 2006; Abbo *et al.*, 2010a; Fuller *et al.*, 2012). Naturally, these crucial events used to inspire a great interest as to why and how they happened, giving rise to hypotheses about factors, both natural and social, which lead to the origin of plant cultivation and domestication. Such attempts, however, often look too deterministic as implying that domestication must have taken place as soon as necessary conditions appeared, such as useful plant species and soils, and would better be reformulated in terms of factors which made appearing of agriculture possible rather than inevitable.

The seminal N.I. Vavilov’s concept of plant domestication centres (Vavilov, 1951) faced the main theoretical problem in explaining why agriculture origin and plant domestication was localised in

space and time (Harlan, 1971). And indeed, some Vavilov's disciples found it possible to expand the centres to "regions" (Sinskaya, 1969) or "mega-gene-centres", the latter eventually occupying nearly the entire land except for the extreme North (Zhukovskiy, 1970). A pre-existing fortunate set of especially useful plant species is a bad candidate for a specific factor restricting the area of agriculture origin: in most speculations of that kind (e.g. Diamond, 1998), advantages of plant species which have been domesticated used to be reasoned *ad hoc* while advantages or disadvantages of edible species which have not been domesticated are not (and could hardly be) considered comparatively.

Currently a hot debate goes on concerning the origin of plant cultivation and domestication in the Near East. One party suggests that their origin was singular, rather fast (hundreds of years), and took place in the so-called "core area" about 250 × 150 km situated at the sources of the Euphrates and Tigris in NE Turkey (Dijarbaky and Mardin Vilayets); this was followed by cultural evolution of domesticated crops improving their quality (Lev-Yadun *et al.*, 2000; Gopher *et al.*, 2001; Abbo *et al.*, 2010a, 2011a, 2012, 2013). Adherents of the contrary so-called protracted model of plant domestication argue that both cultivation and domestication had multiple origins over the Fertile Crescent, went on slowly and in parallel, with pre-domestication cultivation for 1–1.5 thousand years preceded domestication (as a genetical phenomenon) which was gradual, lasted for not less than 3,000 years and was crowned by fully domesticated crops (Willcox, 2005; Tanno, Wilcox, 2006b; Weiss *et al.*, 2006; Fuller, 2007; Allaby *et al.*, 2008; Brown *et al.*, 2009; Glémin, Battailon, 2009; Fuller *et al.*, 2011, 2012; Asouti, Fuller, 2012). Both parties agree that plant cultivation emerged as a conscious practice but disagree whether selection for the domestication traits was conscious and exploited variation pre-existing in wild population (the "Core Area party") or non-conscious and utilised spontaneous mutations occurring in already cultivated crops (the protracted domestication party).

While arguments of both parties about domestication, essentially genetic changes of crops, are strongly supported and diverse, those concerning the origin of cultivation as an idea and practice are not. This is not surprising since it would hardly leave archaeological remnants (Willcox, 2007).

Thus, arguments in favour of pre-domestication cultivation are largely based on finding seeds of cultivation weeds admixed with those of non-domesticated crops, or remnants of "pre-domestication granaries" (Colledge, 1998; Willcox *et al.*, 2008). It may be argued that such evidence depends on the methods of yield processing and may not reflect the origin and spread of cultivation as an idea. So the issue is far from being solved whether the invention of cultivation in the Near East happened once or many times over.

The very nature of the invention of cultivation can still be put into question: was it

- "a cultural conscious and deliberate choice" (Abbo *et al.*, 2005. P. 495), "a fully conscious socio-cultural move based on a well-educated choice of specific food sources" (Abbo *et al.*, 2010a. P. 325) and based on "deep cultural traditions of plant tending" among hunter-gatherers (Fuller *et al.*, 2012. P. 642), as both parties believe;
- or a "cultural mutation", a "meme" in Richard Dawkins's (1982) sense supported by "natural selection of ideas" in Karl Popper's (1978) sense?

These options are rather aspects of our attempts to speculate on motivations of the most primitive farmer than mutually exclusive alternatives. But there is a high danger of involving too much of actualism while reconstructing motivations of pre-historic people. All primitive societies are characterised, if not to say overloaded, by numerous and diverse traditions and rituals; it may be said that rituals were the main mode of existence of early humans. Some of them seem senseless from the modern human's point of view, while some are obviously harmful biologically, such as body modification, human sacrifice etc. From an evolutionary biologist's perspective, traditions and rituals can be viewed as the heredity of a society, the diversity of which looks as if it resulted from random "mutations". Only societies with more or less harmless traditions would survive and those with useful traditions would propagate. (Some biologically harmful traditions, e.g. body modification, of course bring about social advantage to those who execute them, but only within the context of these traditions themselves, and a society is still viable only if the biological harm is tolerable.) There is a well-known example of a kind of useful traditions found in most of the known societies including our

own: those preventing inbreeding and promoting exogamy. It is noteworthy, however, that in primitive societies, the actual harm of inbreeding is not realised and is too weak to be noticed in practice, and that traditions providing outbreeding are usually too overcomplicated for this purpose (Lévi-Strauss, 1966). Such traditions most probably appeared by chance and independently in some local societies but were positively selected and enhanced throughout the world by the benefit of avoiding inbreeding. Analogously, plant cultivation can be imagined to originate from some ritual appearing by chance and positively selected because of the gain of food.

Some hypotheses refer to such usual evolutionary scenario as change of function and derive the nascent agricultural technologies from otherwise aimed human activities. For instance, primitive agricultural habits could result as a by-product of some complex ritual of a religious or magic nature. Such rituals were indeed described as focused on maize, considered by primitive farmers not just food but also a magic plant (Anderson, 1952). Initial practices leading to plant cultivation could be rituals associated with e.g. sacrificing food, burial imitations etc., probably unconscious in respect of gain in food supply and perhaps quite odd from our point of view. In fact it is fairly difficult to reconstruct if the initial motivation of the most primitive farmer was mostly trophic or spiritual, or combining these components in a manner which modern people would hardly understand. Anyway, such speculations can by no means be tested.

Another example of the change-of-function approach is the so-called “dump-heap hypothesis” suggesting that soil disturbance around human dwellings, its fertilisation by domestic wastes and dropping of edible seeds would result in abundant growth of useful annual plants and hence were pre-requisites of plant cultivation (Engelbrecht, 1916; Sauer, 1952; Anderson, 1952). However, it was heavily criticised by Abbo *et al.* (2005) with respect to the Near East cultivation. Note also that this hypothesis does not solve the problem why plant domestication was localised in space and time rather than took place at early stages of human evolution coherently throughout vast areas, as this hypothesis predicts (Hawkes, 1983). Indeed, most of the land was inhabited by humans and everywhere they used to utilise some plants for food. Abbo *et al.* (2005)

additionally argued against the dump-heap hypothesis noting that some of wild representatives of the Near Eastern founder crops are not ruderals and can hardly tolerate substantial human disturbance of their natural ecosystems. In fact, as soon as a plant species had been domesticated, the still wild and already domesticated forms became subjected to disruptive selection favouring them to retain either wild or domesticated characteristics (Zohary, 2004; Glémin, Battailon, 2009).

If practices of plant cultivation appeared by chance as a cultural mutations, it is their low probability which could explain why centres of plant cultivation origin, although quite a few worldwide, were mostly localised in space and time in spite of hunter-gatherers immense and intimate knowledge of the surrounding nature and availability of some useful plants wherever people lived. Still one can consider objective pre-requisites favouring appearance of such cultural mutations (subjective in essence) and/or providing their selective advantage over non-farming societies, that is a common approach in the Darwinian theory of biological evolution.

The amount of seasonal labour invested into plant cultivation should have been associated with dramatic changes in societies of hunter-gatherers which transited from utilising diverse but limited food resources to cultivation of crops as a staple (Fuller *et al.*, 2010; Asouti, Fuller, 2012, but see Tzarfati *et al.*, 2013). So cultivation most probably could not appear readily as soon as it became possible and beneficial in principle. Some additional factor is necessary to facilitate invention of cultivation.

Hunter-gatherer societies depended on diversified activities and used diverse food resources distributed over considerable areas (Kelly, 1995; Fuller *et al.*, 2010; Asouti, Fuller, 2012). Perhaps a crucial event in the transition to farming was the “invention of the field”, that is investment of large amount of labour focused to certain restricted land plots. Little is known about the earliest fields since they used to leave no archaeological traces, so that the archaeological record of nascent agriculture is based on remnants of crop processing sites, dwellings and burials (Fuller *et al.*, 2010).

It is logical to suppose that the field invention would be facilitated if some very useful food plant was confined to restricted habitats in the wild, especially if this plant was conspicuous and formed

pure growth. Let us call it *the primer crop*. Such a situation would bring about natural focusing of human attention to a special plant and of their foraging activity to a restricted area. Addition of some practice of soil treatment facilitating plant growth either intentionally aimed at gain in food or of a ritual nature, or most probably combining both options, would result in converting these habitats into fields. Hence a single primer crop is supposed to trigger plant cultivation rather than a set of founder crops.

Note this would to some extent solve the first problem of plant domestication: the wild type seed dormancy, a trait considered critical for domestication (Abbo *et al.*, 2011b, 2012), which lead Ladizinsky (1987) to his challenging concept of “domestication before cultivation” in case of lentil: sowing is efficient only with non-dormant seeds. The inefficiency (because of dormancy) of sowing wild-type seeds without scarification was proved by Abbo *et al.* (2011b) by experimental cultivation of wild peas. If the earliest fields evolved from natural habitats of a primer crop, harvesting seeds could hardly be total, and the failure of sowing dormant seeds would be compensated to some extent by the soil seed bank. And if natural habitats of the primer crops were scarce and restricted in some large area, the focused human activity would convert them all into nascent fields, thus solving the second problem of plant domestication: gene flow from the wild ancestor. Such a primer crop would then undergo rather a rapid domestication, that is genetic changes towards acquisition of the so-called “domestication syndrome” (Hammer, 1984), characteristic for seed crops, in contrast to slow domestication of those nascent crops which co-existed with their wild relatives and hence demonstrated the protracted pattern of acquisition of the domesticated syndrome, because of gene flow from the wild relatives (Jones, Brown, 2007; Allaby, 2010) or just recurrent mixture with those still being gathered from the wild (Barker, 2006; Abbo *et al.*, 2012) or entering fields through field shifting and fallowing (Fuller *et al.*, 2010).

Fuller *et al.* (2012) argued that many independent cases of plant cultivation and domestication were based on solitary crops, e.g. rice, Chinese millet, pearl millet etc. Those solitarily domesticated crops mostly were conspicuous plants confined to specific habitats. A scenario with natural habitats

converted to fields could be suspected for the above mentioned crops, and also maize. Note that the bottleneck during maize domestication was estimated to last 500–2000 years with the population size of 500–4000 maize individuals that suggests a fairly small population of early farmers existing for about a thousand years in isolation (Eyre-Walker *et al.*, 1998; Doebley, 2004). As supposed below, the Near East plant cultivation may not have been an exclusion and started from cultivation of a single plant species serving as a primer crop”.

Whatever be the origin of the idea or tradition of plant cultivation, it could spread over societies via sociocultural influences (Braidwood, 1967; Abbo *et al.*, 2010a) even decoupled from crops themselves, allowing recruitment elsewhere of suitable species as crops from local wild floras (Jet, 1973). Abbo *et al.* (2010a) noted that there is no proof of independence of domestication of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and maize (*Zea mays* L.) in Mesoamerica, which had taken place in an area just several hundred kilometres away (Matsuoka *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2009), so that a sociocultural influence cannot be excluded. We may at least consider as an option, and a version of the Core Area hypothesis by Lev-Yadun *et al.* (2000), that in the Near East, cultivation as an idea and practice had a singular origin even if it was followed by multiple domestication events. On the other hand, this supposition agrees with the protracted model of plant domestication in assuming that the founder crops may not have entered cultivation simultaneously.

BROAD BEAN AS A PRIMER CROP?

The European/West Asian civilisation sprouted from the so-called “Neolithic revolution” following the onset of plant cultivation in the Near East. This centre of cultivation origin is characterised by quite a number of founder crops: eight “traditional” ones from three families: einkorn wheat (*Triticum monococcum* L.), emmer wheat (*T. dicoccum* (Schrank) Schuebl), barley (*Hordeum vulgare* L.), lentil (*Lens culinaris* Medic), pea (*Pisum sativum* L.), chickpea (*Cicer arietinum* L.), bitter vetch (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) and flax (*Linum usitatissimum* L.) (Lev-Yadun *et al.*, 2000; Zohary, Hopf, 2000; Abbo *et al.*, 2010a, b; Weiss, Zohary, 2011), plus broad bean (*V. faba*) (Abbo *et al.*, 2013), plus maybe some lost crops (Melamed *et al.*, 2008; Fuller *et al.*, 2011,

2012 but see Abbo *et al.*, 2013). It is noteworthy that these crops are quite dissimilar in ecological and biological respects demanding different ways of treatment under cultivation: the cereals are characterised by highly competitive determinate growth, the legumes by indeterminate growth and low competitive ability, with the pea being a tall climbing plant, the broad bean a tall erect plant and lentil and chickpea (Abbo *et al.*, 2009, 2011b). For this reason, the set of founder crops was supposed to be complementary and deliberately chosen “on the basis of intimate knowledge of their nutritional value and potential to contribute to the nutritive welfare of consumers” (Abbo *et al.*, 2008. P. 928) and because of “a very good yield buffering ability” (Abbo *et al.*, 2010b, 2012. P. 21).

However, such a variety of potential crop progenitors, most of which grew over broad areas, would hardly motivate transition from diverse gathering activity to cultivation which demanded extraordinary concentration of attention and labour (Fuller *et al.*, 2010). It may be supposed that among those Near Eastern founder crops there was one which served as the primer crop, to provoke an idea and/or practice of plant cultivation and of the field as its focus. This could be the broad bean. It is suggested above that the putative natural habitat along the rims of river valleys was quite narrow and probably patchy, and easy to convert into primary fields. The relief position it probably occupied was very favourable for cultivation, allowing a naturally sufficient amount of ground water, nutrients and oxygen. The broad bean is a tall conspicuous plant. Its large seeds were not only useful for food but also allow a clear observation of a plant germinating from a seed and hence comprehension or stressing the causal link between sowing and growing. (Note that these are beans which are used for this very purpose at present, as a model object in school education. Ironically, our hypothesis connotes with the sacred nature of beans proclaimed by the earliest philosopher of Pythagoras.) Absence of extant wild relatives of the broad bean suggests that the wild progenitor was not a common and widespread plant. If so, all its scarce natural populations would be soon converted into primary fields and then, without gene flow from wild relatives, it would undergo rapid domestication, leaving no remnants of the wild ancestor. Wild progenitors of other founder crops were scattered over much larger

areas, as they still are at present, that would hardly favour the emergence of the idea of cultivation at a restricted field. At the same time, presence of other potential crops in the habitat of the broad bean wild progenitor, being converted into primary fields, as discussed above, would lead to their involvement into cultivation as well. Moreover, conversion of the broad bean natural habitats into primary fields would most likely result in mixed species cultivation. Probably this was an initial type of plant cultivation in the Near East where the founder crop set included so many species altogether. In this respect, the set of founder crops could be balanced rather ecologically than nutritionally (as supposed by Abbo *et al.*, 2008, 2010b). If so, their involvement into cultivation could be interpreted in terms of endogenous ecological succession of a biogeocenose which included humans and plants being domesticated as its constituents: human culture and genomes of several plant species coevolved bringing about drastic changes in the biogeocenosis structure and appearance – an approach related to consideration of the plant cultivated origin in terms of symbiosis (Rindos, 1980).

The proposed scenario would shape the pattern we are observing: the founder crop, with the largest seeds among others, known only as a cultivated plant recorded archeologically from quite a restricted area of the Levant. The hypothesis is in line with supposition by Kislev and Bar-Yosef (1988), based on favourable nutritional properties and patchy distribution of wild legumes, that domestication of pulses could predate domestication of cereals in the Near East. It may draw attention of archaeologists to a certain relief position where the traces of the earliest fields could be sought for if there appear methods to detect them. Finding of archaeological remnants of a pre-agricultural society using broad bean as a staple would be decisive but there is little hope for this since this hypothetical society, if existed, should have occupied a very restricted area and for a short time, to rapidly evolve to an early agricultural society using the founder crop set.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to Dr. Shahal Abbo and four anonymous referees for valuable critical comments, to Dr. N.P. Goncharov for fruitful discussion

and to Dr. D. Thomas for the same and linguistic corrections. This work was supported by the Russian State Program VI.53.1.3. “Genetic control of mechanisms of incompatibility between plant taxa and their adaptation to unfavourable environmental conditions”.

REFERENCES

- Abbo S., Gopher A., Rubin B., Lev-Yadun S. On the origin of Near Eastern founder crops and the “dump-heap hypothesis” // *Genet. Res. Crop. Evol.* 2005. V. 52. P. 491–495.
- Abbo S., Zezak I., Schwartz E., Lev-Yadun S., Gopher A. Experimental harvesting of wild peas in Israel: implications to the origins of Near East farming // *J. Archaeol. Sci.* 2008. V. 35. P. 922–929.
- Abbo S., Saranga Y., Peleg Z., Lev-Yadun S., Kerem Z., Gopher A. Reconsidering domestication of legumes versus cereals in the ancient Near East // *Quant. Rev. Biol.* 2009. V. 84. P. 29–50.
- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher, A. Agricultural origins: centres and noncentres; a Near Eastern reappraisal // *Critl. Rev. Plant. Sci.* 2010a. V. 29. P. 317–328.
- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher A. Yield stability: an agronomic perspective on the origin of Near Eastern agriculture // *Veg. Hist. Archaeobot.* 2010b. V. 19. P. 143–150.
- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher A. Origin of Near Eastern plant domestication: homage to Claude Levi-Strauss and “La Pensée Sauvage” // *Genet. Res. Crop. Evol.* 2011a. V. 58. P. 175–179.
- Abbo S., Rachamim E., Zehavi Y., Zezak I., Lev-Yadun S., Gopher A. Experimental growing of wild pea in Israel and its bearing on Near Eastern plant domestication // *Ann. Bot.* 2011b. V. 107. P. 1399–1404.
- Abbo S., Lev-Yadun S., Gopher A. Plant domestication and crop evolution in the Near East: on events and process // *Critl. Rev. Plant. Sci.* 2012. V. 31. P. 241–257.
- Abbo S., Lev-Yadun S., Heun M., Gopher A. On the “lost crops” of the neolithic Near East // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 815–822.
- Allaby R.G. Integrating the processes in the evolutionary systems of domestication // *J. Exp. Bot.* 2010. V. 61. P. 935–944.
- Allaby R.G., Fuller D.Q., Brown T.A. The genetic expectation of the protracted model of the origin of domesticated crops // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. P. 13982–13986.
- Anderson E. *Plants, Man and Life.* 1952. Little, Brown and Co., Boston.
- Asouti E., Fuller D.Q. From foraging to farming in the southern Levant: the development of the Epipaleolithic and Pre-pottery Neolithic plant managing strategies // *Veg. History Archaeobot.* 2012. V. 21. P. 149–162.
- Barker G. *The Agricultural Revolution in Prehistory, Why did Foragers Become Farmers.* Oxford Univ. Press, Oxford, 2006.
- Braidwood R. *Prehistoric Men,* 7th edition. 1967. Scott, Foresman and Company, Glenview.
- Brown T.A., Jones M.K., Powell W., Allaby R.G. The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent // *Trends Ecol Evol.* 2009. V. 24. P. 03–109.
- Candolle de A. *Origine des plantes cultivées.* Germer Baillière, Paris, 1882.
- Colledge S. Identifying pre-domestication cultivation using multivariate analysis // *The origins of agriculture and crop domestication / Eds A.B. Damania, J. Valkoun, G. Willcox, C.O. Qualset.* ICARDA, Aleppo, 1998. P. 121–131.
- Colledge S. Plant excavation on Epipaleolithic and early Neolithic sites in the Levant // *Brit. Archaeol. Rep. Intern. Ser.* Archaeopress Oxford: Archaeopress, 2001. V. 986.
- Cubero J.I. Evolutionary trends in *Vicia faba* // *Theor. Appl. Genet.* 1973. V. 43. P. 59–65.
- Cubero J.I. Taxonomy, distribution and evolution of the faba bean and its wild relatives // *Genetic Resources and their Exploitation / Eds J.T. Witcombe, W. Erskine.* Chickpeas, Faba Beans and Lentils. 1984. Springer Netherlands. P. 131–143.
- Dawkins R. *The Extended Phenotype.* Oxford: W.H. Freeman, 1982.
- De Wouw M. van, Enneking D., Robertson L.D., Maxted N. Vetches (*Vicia* L.) // *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean / Eds N. Maxted, S.J. Bennett.* Kluwer, Dordrecht, 2001. P. 132–157.
- Diamond J. *Guns, germs and steel.* Vintage-Random House, London. 1998. 480 p.
- Doebly J.F. The genetics of maize evolution // *Annu. Rev. Genet.* 2004. V. 38. P. 37–59.
- Engelbrecht T.H. Über die Entstehung einiger feldmäßig angebauter Kulturpflanzen // *Georg. Z.* 1916. V. 22. P. 328–334.
- Eyre-Walker A., Gaut R.L., Hilton H., Feldman D.L., Gaut B.S. Investigation of the bottleneck leading to the domestication of maize // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 4441–4446.
- Fuller D.Q. Contrasting pattern in crop domestication and domestication rates: recent archaeological insights from the Old World // *Ann. Bot.* 2007. V. 100. P. 903–924.
- Fuller D.Q., Allaby R.G., Stevens C. Domestication as innovation: the entanglement of techniques, technology and chance in the domestication of cereal crops // *World Archaeol.* 2010. V. 42. P. 13–28.
- Fuller D.Q., Willcox G., Allaby R.G. Cultivation and domestication had multiple origins: arguments against the core area hypothesis for the origins of agriculture in the Near East // *World Archaeol.* 2011. V. 43. P. 628–658.
- Fuller D.Q., Willcox G., Allaby R.G. Early agricultural pathways: moving outside the “core area” hypothesis in Southwest Asia // *J. Exp. Bot.* 2012. V. 63. P. 617–633.
- Glémin S., Bataillon T. A comparative view of the evolution of grasses under domestication // *New Phytol.* 2009. V. 183. P. 273–290.
- Glazovskaya M.A. *Geochemical bases of typology and methods of investigation of natural landscapes.* M.: Nauka, 1964. (in Russian).
- Gopher A., Abbo S., Lev-Yadun S. The “when”, the “where” and the “why” of the Neolithic revolution in the Levant // *Documenta Praehistorica.* 2001. V. 27. P. 49–62.
- Hammer K. The domestication syndrome // *Kulturpflanze.* 1984. V. 32. P. 11–34.
- Hanelt P. Die infraspezifische Variabilität von *Vicia faba* L. und ihre Gliederung // *Kulturpflanze.* 1972. V. 20. P. 75–128.

- Harlan J.R. Agricultural origin: centres and noncentres // *Science*. 1971. V. 174. P. 468–474.
- Harlan J.R., De Wet J.M.J., Price E.G. 1973. Comparative evolution of cereals // *Evolution*. 1973. V. 27. P. 311–25.
- Hawkes J.G. *The Diversity of Crop Plants*. Cambridge: Harvard Univ. Press, 1983.
- Hillman G. The plant remains from Tell Abu Hureyra: a preliminary report // *Proc. of the Prehistoric Soc.* 1975. V. 41. P. 70.
- Hopf M. Appendix B. Jericho plant remains // *The pottery phases of the Tell and other finds* / Eds K.M. Kenyon, T.A. Holland. Excavations at Jericho. British School of Archaeology in Jerusalem, London, 1983. V. 5. P. 578–621.
- Jones M., Brown T. Selection, cultivation and reproductive isolation: a reconsideration of the morphological and molecular signals of domestication // *Rethinking Agriculture: Archaeological and Ethnoarchaeological Perspectives* / Eds T. Denham, J. Iriarte, L. Vrydaghs. Left Coast Press, Walnut Creek, 2007. P. 36–49.
- Jett S.C. Comment on Pickersgill's "Cultivated plants as evidence for cultural contacts" // *Amer. Antique*. 1973. V. 38. P. 223–225.
- Kelly R.L. *The foraging spectrum: Diversity in hunter-gatherer lifeways*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1995.
- Kislev M.E. Early Neolithic horsebean from Yiftahel, Israel // *Science*. 1985. V. 228. P. 319–320.
- Kislev M.E., Bar-Yosef O. The legumes: the earliest domesticated plants in the Near East? // *Curr. Anthropol.* 1988. V. 29. P. 175–179.
- Kluyver T.A., Charles M., Jones G., Rees M., Osborne C.P. Did greater burial depth increase the seed size of domesticated legumes? // *J. Exp. Bot.* 2013. V. 64. P. 4101–4108.
- Kwak M., Kami J. A., Gepts P. Center of *Phaseolus vulgaris* is located in the Lerma-Santiago basin of Mexico. // *Crop Sci.* 2009. Vol. 49, P. 554–563.
- Ladizinsky G. On the origin of the broad bean, *Vicia faba* L. // *Isr. J. Bot.* 1975. Vol. 24, P. 80–88
- Ladizinsky G. Pulse domestication before cultivation // *Econ. Bot.* 1987. V. 41. P. 60–65.
- Lev-Yadun S., Gopher A., Abbo S. The cradle of agriculture // *Science*. 2000. V. 288. P. 1602–1603.
- Lévi-Strauss C. *The Savage Mind*. Chicago: The University of Chicago Press, 1966.
- Matsuoka Y., Vigouroux V., Goodman M.M., Sanchez G.J., Buckler E., Doebley J. A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. P. 6080–6084.
- Maxted N. A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciaeae) // *Bot. J. Linn. Soc.* 1993. V. 111. P. 155–182.
- Maxted N., Kell S.P. Establishment of a global network for the *in situ* conservation of crop wild relatives: status and needs. FAO Commission on Genetic Resources for Food and Agriculture, Rome. 2009.
- Maxted N., Khattab A., Bisby F.A. Domesticated legumes and their wild relatives: newly discovered relatives of *Vicia faba* do little to resolve the enigma of its origin // *Botanika Chronika*. 1991. V. 10. P. 129–159.
- Melamed Y., Plitmann U., Kislev M.E. *Vicia peregrina*: an edible early Neolithic legume // *Veg. Hist. Archaeobot.* 2008. V. 17. P. 29–34.
- Muratova V.S. *Vicia* L. // *Kulturnaya Flora SSSR* / Ed. E.V. Vulf. IV. Zernovye bobovye. State Publishing House of State and Collective Farm Literature, Moscow, Leningrad, 1937. P. 79–122 (in Russian).
- Moulins de D. Agricultural changes at Euphrates and steppe sites in the mid-8th to the 6th millennium BC. *British Archaeological Reports, International Series*. Iss. 683. Oxford: Archaeopress, 1997.
- Moulins de D. Abu Hureyra 2: Plant remains from the Neolithic // *Village on the Euphrates. From foraging to farming at Abu Hureyra* / Eds A.M.T. Moore, G.C. Hillman, A.J. Legge. N.Y.: Oxford Univ. Press, 2000. P. 399–416.
- Pasternak R. Investigations of botanical remains from Nevalı Çori PPNB, Turkey: short interim report // *Origin of Agricultural and Crop Domestication* / Eds A.B. Damania, J. Valkoum, G. Willcox, C.O. Quallset. ICARDA, Aleppo, 1998. P. 170–177.
- Polynov B.B. *The cycle of watering*. T. Murby, London. 1937.
- Popper K. Natural selection and the emergency of mind // *Dialectica*. 1978. V. 32. P. 339–355.
- Rindos D. Symbiosis, instability, and the origins and spread of agriculture: a new model // *Curr. Anthropol.* 1980. V. 21. P. 751–772.
- Rollefson G.O., Simmons A.H., Donaldson M.L., Gillespie W., Kafafi Z., Köhler-Rollefson I.-U., McAdam E., Rolston S.L., Tubb M.K. Excavation of the Pre-Pottery Neolithic B village of "Ain Ghazal (Jordan) // *Mitteilungen der Deutschen Orientgesellschaft zu Berlin*. 1985. V. 117. P. 69–116.
- Sauer C.O. *Seeds, Spades, Hearths, Herds. The Domestication of Animals and Foodstuffs*. Cambridge: The MIT Press, 1952.
- Schäfer H.I. Zur Taxonomie der *Vicia narbonensis* Gruppe // *Kulturpflanze*. 1973. V. 21. P. 211–273.
- Sinskaya E.N. *Historical Geography of Cultivated Flora (At the Dawn of Agriculture)*. Leningrad: Kolos, 1969. 480 p. (in Russian).
- Smith B.D. Eastern North America as an independent center of plant domestication // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 12223–12228.
- Stebaev I.V., Pivovarova Z.F., Smolyakov B.S., Nedelkina S.V. *General Biogeosystem Ecology*. Novosibirsk: Nauka, Siberian Branch (in Russian), 1993.
- Tanno K., Willcox G. The origins of *Cicer arietinum* L. and *Vicia faba* L.: early finds from Tell el-Kerkh, north-west Syria, late 10th millennium B.P. // *Veg. Hist. Archaeobot.* 2006a. V. 15. P. 197–204.
- Tanno K., Willcox G. How fast was wild wheat domesticated? // *Science*. 2006b. V. 311. P. 1886.
- Tzarfatı R., Saranga Y., Barak V., Gopher A., Korol A.B., Abbo S. Threshing efficiency as an incentive for rapid domestication of emmer wheat // *Ann. Bot. London*, 2013. V. 112. P. 829–837.
- Vavilov N.I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants // *Selective Writings of N.I. Vavilov. Chronika Botanica*. 1951. V. 13. P. 1–364.
- Weiss E., Kislev M.E., Hartmann A. Autonomous cultivation before domestication // *Science*. 2006. V. 312. P. 1608–1610.

- Weiss E., Zohary D. The Neolithic Southwest Asian founder crops, their biology and archaeobotany // *Curr. Anthropol.* 2011. V. 52. Suppl. 4. P. S237–S254.
- Willcox G. Evidence for plant exploitation and vegetation history from three early Neolithic pre-pottery sites on the Euphrates (Syria) // *Veg. Hist. Archaeobot.* 1996. V. 5. P. 143–152.
- Willcox G. The distribution, natural habitats and the availability of wild cereals in relation to their domestication in the Near East: multiple events, multiple centres // *Veg. Hist. Archaeobot.* 2005. V. 14. P. 534–541.
- Willcox G. Agrarian change and the beginnings of cultivation in the Near East // *The emergence of agriculture. A global view* / Eds T. Denham, P. White. Routledge, N.Y., 2007. P. 217–241.
- Willcox G., Fornite S., Herveux L.H. Early Holocene cultivation before domestication in northern Syria // *Veg. Hist. Archaeobot.* 2008. V. 17. P. 313–325.
- Zeist van W.A., Roller de G.J. The plant husbandry of aceramic Çayönü, SE Turkey // *Palaeohistoria.* 1992. V. 33/34. P. 65–96.
- Zhukovskiy P.M. World Gene Fund of Plants for Selection. (Megagenocentres and Endemic Microgenocentres). Leningrad: Nauka, 1970. 88 p. (in Russian).
- Zohary D. Monophyletic versus polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East // *Genet. Res. Crop Evol.* 1999. V. 46. P. 133–142.
- Zohary D. Unconscious selection and evolution of domesticated plants // *Economic Bot.* 2004. V. 58. P. 5–10.
- Zohary D., Hopf M. *Domestication of Plants in the Old World*, 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 2000.

«УТЕРЯННЫЙ ПРЕДОК» КОНСКИХ БОБОВ (*Vicia faba* L.) И НАЧАЛО ВОЗДЕЛЫВАНИЯ РАСТЕНИЙ НА БЛИЖНЕМ ВОСТОКЕ

О.Э. Костерин^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: kosterin@bionet.nsc.ru;

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия

Конские бобы (*Vicia faba* L.) принадлежат к набору культур, с которых начиналось культивирование растений на Ближнем Востоке, однако их дикий предок или близкие сородичи до сих пор неизвестны. Предполагается, что дикий предок бобов имел ограниченный ареал в Леванте и был тесно связан с растительным сообществом, ограниченным по площади, вследствие чего оказался одомашнен целиком как вид. Возможно, его местообитания были связаны с границей речной поймы и склона (так называемый «трансэлювиально-аккумулятивный барьер»), отличающейся благоприятными почвенными условиями. Эти ограниченные природные местообитания бобов могли стать фокусом приложения нарождающегося возделывания растений, становясь тем самым прообразом будущих полей. Предполагается, что конские бобы, будучи заметными высокими растениями с крупными семенами и ограниченным местообитанием, могли служить «стартовой культурой» для возникновения сельского хозяйства на Ближнем Востоке и способствовать самому возникновению идеи и практики возделывания растений и «изобретению» поля.

Ключевые слова: *Vicia faba* L., конские бобы, Ближний Восток, происхождение возделывания растений, доместикация растений, культуры-основатели, стартовая культура, трансэлювиально-аккумулятивный барьер.