

УДК 577.2:631:581.115:542.1

А.В. ГАЛАЕВ¹, Л.Т. БАБАЯНЦ², Ю.М. СИВОЛАП¹

¹ Южный биотехнологический центр в растениеводстве,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036,
e-mail: yuri@genome.intes.odessa.ua

² Селекционно-генетический институт,
Овидиопольская дорога, 3, Одесса, 65036

**ДЕТЕКЦИЯ ИНТРОГРЕССИИ
ЭЛЕМЕНТОВ ГЕНОМА
AEGILOPS CYLINDRICA HOST.
В ГЕНОМ *TRITICUM AESTIVUM* L.
С ПОМОЩЬЮ ISSR-АНАЛИЗА**



Провели сравнительный анализ интрогрессивных и родительских форм для выявления участков генома донора в пшенице, которой приданы локусы с новыми генами устойчивости к грибным заболеваниям. При помощи ISSR-метода в генотипах 18 индивидуальных растений интрогрессивной линии 5/20–91 выявлено 124 ISSR-локуса, 17 из которых были отнесены к интрогрессивным фрагментам генома *Ae. cylindrica* в *T. aestivum*. Показали, что ISSR-метод эффективен для детекции изменчивости, вызванной интрогрессией чужеродного генетического материала в геном *T. aestivum*.

© А.В. ГАЛАЕВ, Л.Т. БАБАЯНЦ, Ю.М. СИВОЛАП, 2003

Введение. Проблема устойчивости сельскохозяйственных растений к болезням и вредителям является одной из главных в современной селекции. Необходимость сортосмены часто связана с распространением рас патогенов, к которым у возделываемых сортов отсутствует генетически обусловленная устойчивость, и потребностью введения новых генов, обуславливающих невосприимчивость к болезням.

Интенсивная селекция, связанная с внутривидовой гибридизацией, привела к сужению генетического разнообразия культивируемых видов и использованию в производстве относительно небольшого количества наиболее продуктивных генотипов. В связи с этим возникает потребность в расширении генетической базы культурных видов за счет привлечения новых источников зародышевой плазмы из удаленных видов, произрастающих в природных условиях.

Так, в селекции пшеницы широко привлекаются представители *Triticeae*, в частности, различные виды *Aegilops*. В Селекционно-генетическом институте (СГИ) осуществлена (рис. 1) интрогрессия фрагментов генома *Aegilops cylindrica* (CCDD; $2n = 28$) в *Triticum aestivum* (AABBDD; $2n = 42$). При дальнейшем отборе на основе этого материала созданы формы пшеницы, обладающие устойчивостью к мучнистой росе, бурой и стеблевой ржавчине, твердой головне, септариозу, фузариозу [1, 2].

При использовании материала, полученного от отдаленной гибридизации, проявился ряд проблем, связанных с недостаточной изученностью доноров устойчивости к фитопатогенам, а также отсутствием эффективных методов оценки и отбора генотипов с новыми генами устойчивости. Возникла необходимость изучения интрогрессивных и родительских форм, а также разработки методов выявления интрогрессий и маркирования устойчивости к болезням с целью эффективного отбора генотипов, несущих новые гены устойчивости, в гибридных популяциях.

В работах по маркированию и детекции интрогрессии широко используется один из многолокусных вариантов ПЦР-RAPD, с помощью которого маркированы и картированы ряд генов устойчивости к болезням растений. Так, Schachermayer et al. [3] маркировали ген *Lr 24* устойчивости к листовой ржавчине пшеницы, который интрогрессирован из *Agropyron elongatum*. William et al. [4] маркировали ген *Lr 34*. В связи с тем, что

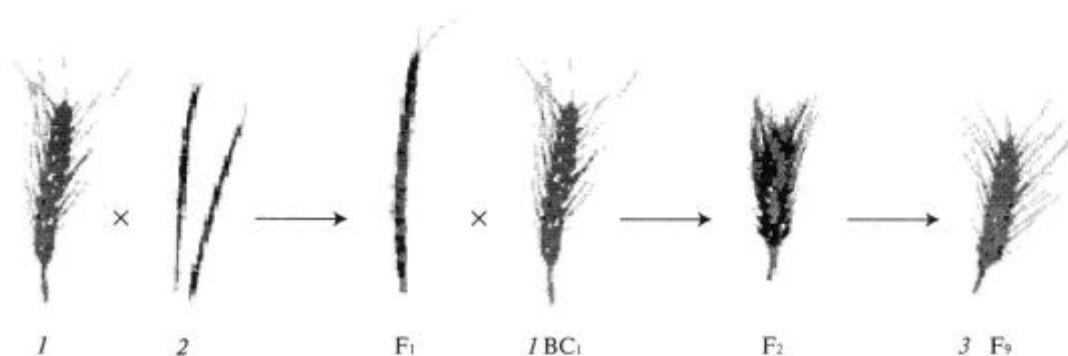


Рис. 1. Схема получения пшенично-эгилопсных гибридов ([1, 2]): 1 — сорт Одесская полукарликовая (♀); 2 — *Aegilops cylindrica* (♂); 3 — интрогрессивная линия 5/20-91

при RAPD-анализе возникают проблемы с воспроизводимостью результатов, в настоящей работе для детекции интрогрессии фрагментов генома *Aegilops cylindrica* в *Triticum aestivum* использован

Таблица 1
Молекулярно-генетический полиморфизм сорта мягкой пшеницы Одесская полукарликовая

Праймер	Количество			Полиморфизм, %
	анализируемых растений	детектируемых ISSR-локусов	полиморфных ISSR-локусов	
(AGC) ₆ G	18	20	6	30,0
(TG) ₃ C	18	7	2	28,6
(ACC) ₆ G	18	14	7	50,0
(GAG) ₃ C	18	11	2	18,2
(CTC) ₆ A	18	23	9	39,1
(GA) ₃ C	18	17	5	29,4
(CT) ₃ G	18	18	9	50,0
Итого		110	40	36,4

Таблица 2
Внутривидовая гетерогенность *Aegilops cylindrica* Host.

Праймер	Количество			Полиморфизм, %
	анализированных линий	детектируемых ISSR-локусов	полиморфных ISSR-локусов	
(AGC) ₆ G	24	23	11	47,8
(TG) ₃ C	24	12	5	41,6
(ACC) ₆ G	24	12	5	41,6
(GAG) ₃ C	24	16	4	25,0
(CTC) ₆ A	24	23	13	56,5
(GA) ₃ C	24	11	6	54,5
(CT) ₃ G	24	11	2	18,2
Итого		108	46	42,6

ISSR-анализ. Полиморфизм, выявляемый с помощью ISSR-праймеров, как правило, выше и более четко воспроизводим, чем с использованием RAPD [5]. Детектируемые с помощью ISSR-праймеров микросателлитные последовательности фланкируют многие гены и могут быть использованы как якорные последовательности к этим генам, что особенно важно при поиске маркеров к генам устойчивости. Цель нашего исследования — сравнительный анализ интрогрессивных и родительских форм для выявления участков генома донора в пшенице, которой приданы локусы с новыми генами устойчивости к грибным заболеваниям.

Материалы и методы. Исследовали 18 индивидуальных растений мягкой пшеницы сорта Одесская полукарликовая, 24 линии — смеси ДНК *Ae. cylindrica* (по пять индивидуальных растений каждой линии на смесь) и ДНК 18 индивидуальных растений интрогрессивной линии 5/20-91, полученной от скрещивания Одесской полукарликовой и *Ae. cylindrica* (рис. 1).

ДНК выделяли с помощью СТАВ-буфера [6]. Для амплификации использовали прибор «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Реакционная смесь для проведения ISSR-ПЦР объемом 20 мкл содержала 50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl pH 8,4 (25 °C), 2–5 мМ MgCl₂, 0,01 % Tween 20, по 0,2 мМ каждого нуклеотида, 0,2 мкМ праймера, 20 нг ДНК и 1 ед. Таq-полимеразы. В эппендорф поверх реакционного раствора добавляли 30 мкл минерального масла. Амплификацию с семью ISSR-праймерами проводили в режиме: первая денатурация 93 °C — 1 мин 30 с, 35 циклов — 60 °C — 40 с, 70 °C — 1 мин, 93 °C — 30 с, последняя элон-

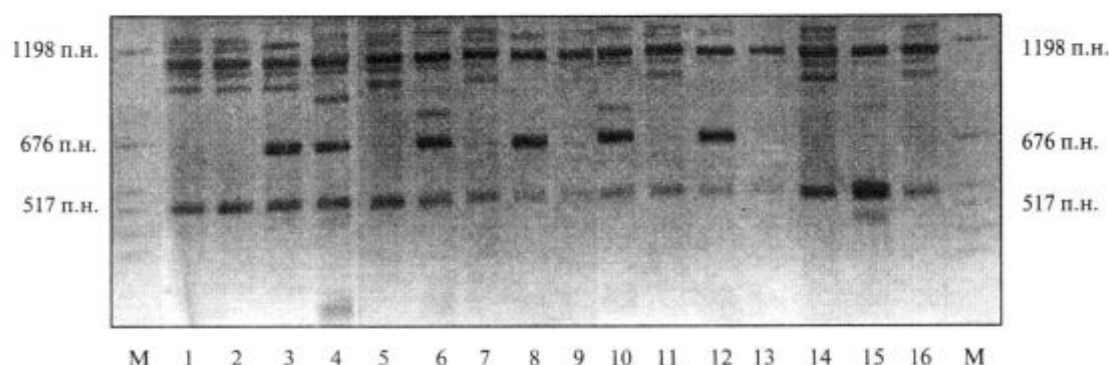


Рис. 2. Схема электрофоретического разделения продуктов ISSR-ПЦР (праймер (СТ)₉G) 16 индивидуальных растений сорта мягкой пшеницы Одесская полукарликовая: 1–16 — амплифицированная ДНК 16 индивидуальных растений сорта; М — маркер молекулярной массы pGEM

гация 70 °C — 1 мин 30 с. Электрофорез продуктов амплификации ДНК проводили в однократном буфере (0,045 М Трис-борат и 10 мМ ЭДТА, pH 8,0) в 2%-ном агарозном геле длиной 12 см при 100–130 В в течение 2,5 ч. Гели предварительно перед электрофоретическим разделением продуктов амплификации окрашивали бромистым этидием и после разделения продуктов амплификации фотографировали в ультрафиолетовом свете на пленку «Микрат-300».

Для отнесения обнаруженных ISSR-локусов в спектрах фрагментов амплификации ДНК растений интрогрессивной линии 5/20-91 к фрагментам, характерным для *Ae. cylindrica* или Одесской полукарликовой, использовали электрофорез в 7%-ном неденатурирующем полиакриламидном геле размером 17,5 × 22 толщиной 0,75 мм в 1 × TBE буфере при напряжении 500 В в течение 1–1,5 ч. Полиакриламидные гели окрашивали серебром согласно Silver sequence TM DNA Sequencing System Technical Manual (Promega). Для точного определения размера фрагментов амплификации ДНК (в п.н.) использовали программное обеспечение Image Master 1D. Калибровку молекулярной массы осуществляли с использованием стандартов.

Результаты исследований и их обсуждение. Молекулярно-генетический полиморфизм родительских форм. При анализе 18 индивидуальных растений сорта Одесская полукарликовая с помощью семи ISSR-праймеров обнаружено 110 ампликонов, из которых полиморфными оказались 40. Средний показатель внутрисортовой гетерогенности составил 36,3 % (табл. 1). ISSR-праймеры выявляли на электрофореграммах от 7 до 23 фрагмен-

тов амплификации ДНК, при этом длина фрагментов составляла 201–2975 п.н. Наиболее информативными в плане выявления полиморфизма оказались праймеры (ACC)₆G, (CTC)₆A и (CT)₉G (рис. 2), детектировавшие наибольшее количество полиморфных ISSR-локусов.

Оценку дискриминационной возможности (PIC — polymorphism information contents) анализируемых данных амплификации ДНК с помощью ISSR-ПЦР проводили согласно алгоритму $PIC = 2f(1-f)$ для бинарных данных, где f — частота фрагмента амплификации (т.е. аллеля), а $(1-f)$ — частота нуль-аллеля. PIC характеризует дискриминационную силу локуса по количеству экспрессирующихся аллелей и по относительным частотам встречаемости этих аллелей [5]. Значение PIC по исследуемой популяции сорта Одесская полукарликовая для индивидуальных

Таблица 3
Молекулярно-генетический полиморфизм интрогрессивной линии 5/20–91

Праймер	Количество			Полиморфизм, %
	анализируемых генотипов	детектируемых ISSR-локусов	полиморфных ISSR-локусов	
(AGC) ₆ G	18	28	16	57,1
(TG) ₉ C	18	10	2	20,0
(ACC) ₆ G	18	15	5	33,3
(GAG) ₆ C	18	11	2	18,2
(CTC) ₆ A	18	26	14	53,8
(GA) ₆ C	18	20	6	30,0
(CT) ₉ G	18	14	7	50,0
Итого		124	52	41,9

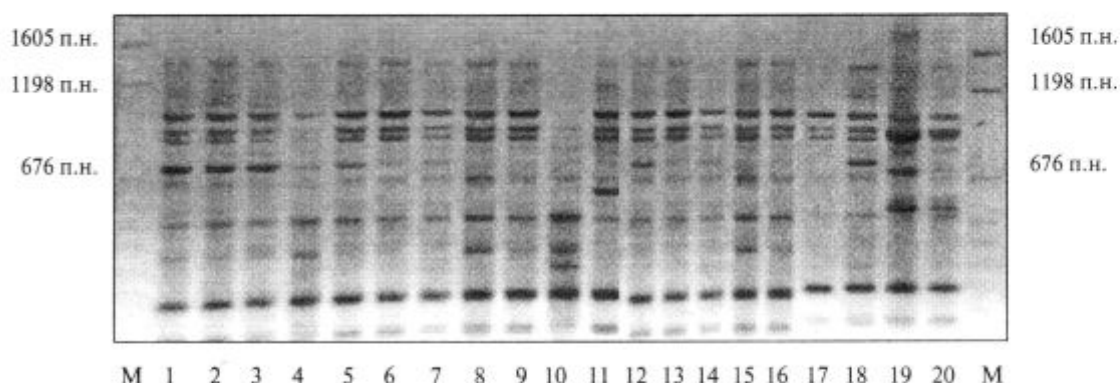


Рис. 3. Схема электрофоретического разделения продуктов ISSR-ПЦР (праймер $(AGC)_6G$) 20 линий *Aegilops cylindrica* Host.: 1–20 — амплифицированная смесь ДНК (по пять индивидуальных растений линии на смесь); М — маркер молекулярной массы pGEM

ISSR-праймеров колебалось от 0,143 до 0,592. Среднее значение PIC по семи ISSR-праймерам составило 0,339. На рис. 2 представлен профиль ДНК отдельных растений пшеницы сорта Одесская полукарликовая.

При исследовании молекулярно-генетической гетерогенности 24 форм *Ae. cylindrica*, отобранных А.И. Рыбалка по морфобиологическим признакам из растений, которые произрастают по краям полей селекционно-семеноводческих посевов СГИ, использовали смеси ДНК (по пять индивидуальных растений каждой линии на смесь). В 24

линиях — смесей ДНК *Ae. cylindrica* ISSR-спектры состояли из 11–23 амплифицированных фрагментов (табл. 2). Длина фрагментов составляла 184–1690 п.н. По результатам амплификации детектировано 108 ISSR-локусов, 46 из которых полиморфны. Средний показатель внутривидовой гетерогенности 24 линий *Ae. cylindrica* по семи ISSR-праймерам составил 42,6 %. Наибольшее количество полиморфных ISSR-локусов выявили праймеры $(CTC)_6A$ и $(AGC)_6G$ (рис. 3), обнаружившие соответственно 13 и 11 полиморфных ISSR-локусов.

Таблица 4

Результаты ISSR-анализа фрагментов генома *Aegilops cylindrica* Host. в *Triticum aestivum* L.

ISSR- праймеры	Количество интрогрессируемых фрагментов	Молекулярная масса интрогрессируемых фрагментов, п.н.	18 индивидуальных растений интрогрессивной линии 5/20–91															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
№ 7 $(AGC)_6G$	8	1225	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
		880	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
		790	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+
		648	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	+	+	+	+	–	+
		556	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
		388	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		351	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
		276	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–
№ 8 $(TG)_3C$	1	610	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	+
№ 12 $(GAG)_6C$	1	520	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
№ 17 $(CTC)_6A$	4	1190	+	+	+	+	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+	+	–
		765	+	–	–	–	+	+	–	+	+	+	–	–	–	–	–	–
		314	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
		277	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
№ 21 $(GA)_3C$	1	1226	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
№ 23 $(CT)_3G$	2	960	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	+	+
		630	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

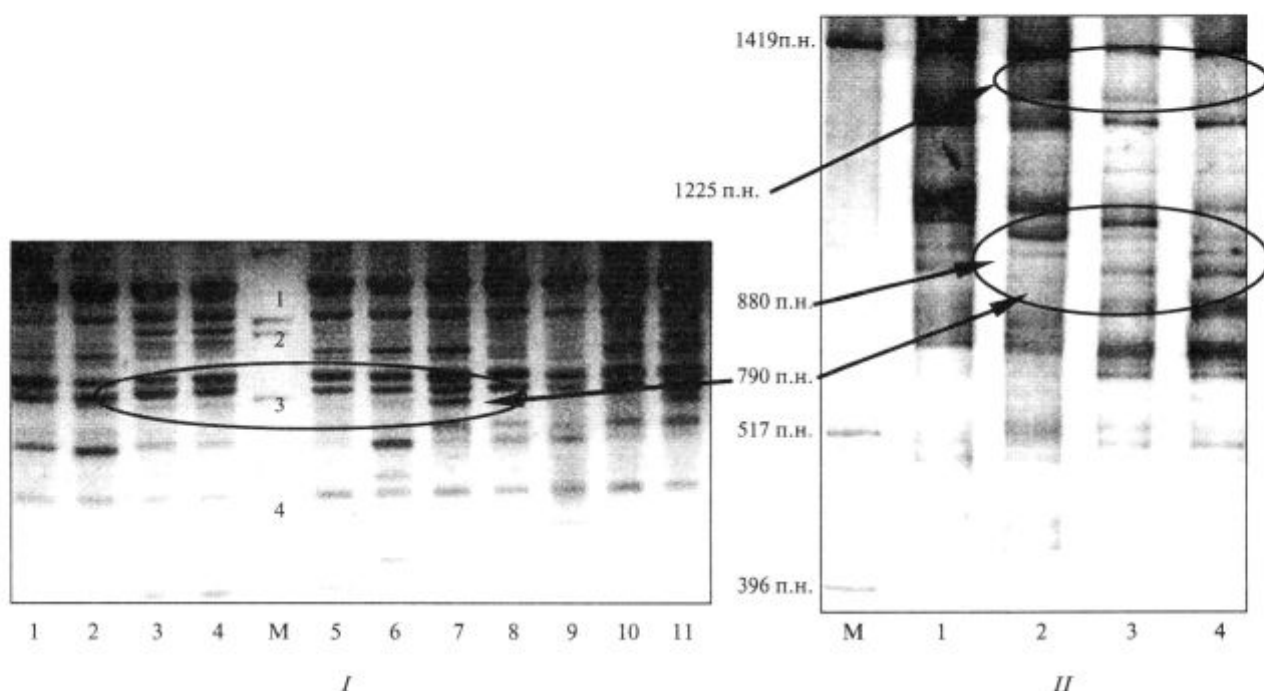


Рис. 4. Схема электрофоретического разделения продуктов ISSR-ПЦР (праймер $(AGC)_6G$): *I* — в агарозном геле (2 %): 1–2 — амплифицированная ДНК двух индивидуальных растений сорта Одесская полукарликовая; 3–4 — амплифицированная смесь ДНК двух линий *Aegilops cylindrica* (по пять индивидуальных растений линии на смесь); 5–11 — амплифицированная ДНК семи индивидуальных растений линии 5/20–91; М — маркер молекулярной массы Lambda Pst 1 (1 — 1159 п.н., 2 — 1059 п.н., 3 — 805 п.н., 4 — 514 п.н.); *II* — в полиакриламидном геле (7 %): 1 — амплифицированная ДНК одного индивидуального растения сорта Одесская полукарликовая; 2 — амплифицированная смесь ДНК одной линии *Aegilops cylindrica* (по пять индивидуальных растений линии на смесь); 3, 4 — амплифицированная ДНК двух индивидуальных растений линии 5/20–91; М — маркер молекулярной массы pUC18/Hinf

ISSR-анализ интрогрессии элементов генома эгилопса в геном мягкой пшеницы. С помощью семи ISSR-праймеров выявили локусы, встречающиеся в *Ae. cylindrica* и сорте Одесская полукарликовая, для точного отнесения выявленных ISSR-локусов интрогрессивной линии 5/20–91 к мягкой пшенице или к *Ae. cylindrica*. В генотипах 18 индивидуальных растений линии 5/20–91 выявлено 124 ISSR-локуса (табл. 3), 17 из которых были отнесены к интрогрессивным, т.е. принадлежащим *Ae. cylindrica* (табл. 4). Наиболее информативным в плане выявления интрогрессий является праймер $(AGC)_6G$ (рис. 4), с помощью которого выявлено восемь интрогрессивных ISSR-локусов, наименее информативным — праймер $(ACC)_6G$, не обнаруживший ни одного интрогрессивного локуса. По двум праймерам, $(AGC)_6G$ и $(GA)_9C$, выявлено два интрогрессивных локуса, которые присутствуют во всех растениях линии 5/20–91. С помощью ISSR-праймера $(AGC)_6G$ выявлены две группы

локусов интрогрессии с молекулярной массой 1225 и 276 п.н., а также 880, 556 и 351 п.н., которые одинаково присутствуют в одних растениях и отсутствуют в других. Такую же аналогию наблюдаем по группе локусов с молекулярной массой 314 и 277 п.н. (праймер $(CTC)_6A$), 610 и 960 п.н., выявленных соответственно праймерами $(TG)_9C$ и $(CT)_9G$, и группе интрогрессивных локусов 520 и 630 п.н., выявленных соответственно праймерами $(GAG)_6C$ и $(CT)_9G$. Данная зависимость может свидетельствовать о том, что указанные пять групп локусов принадлежат пяти различным фрагментам интрогрессии генома *Aegilops cylindrica*. При анализе спектров амплификации у 18 растений линии 5/20–91 обнаружены следующие отличия в сравнении с родительскими формами: уменьшение интенсивности ряда ISSR-локусов из спектра интрогрессивных растений, характерных для *T. aestivum* и *Ae. cylindrica*; появление новых локусов, не обнаруженных в родительских растениях.

В результате ISSR-анализа обнаружены две пары индивидуальных растений линии 5/20–91 под № 6, 8 и 11, 12, имеющие одинаковые спектры интрогрессивных локусов, остальные 14 растений линии 5/20–91 имели индивидуальный спектр интрогрессивных локусов, т.е. отличались от других определенным количеством интрогрессивных локусов и их молекулярным размером.

С помощью использованных в исследовании ISSR-праймеров детектировано 17 интрогрессивных фрагментов генома *Ae. cylindrica* в *T. aestivum*, в результате чего можно считать ISSR-метод эффективным для детекции изменчивости, вызванной интрогрессией чужеродного генетического материала в геном *T. aestivum*.

SUMMARY. Comparative analysis of introgressive and parental forms of wheat was carried out to reveal the sites of donor genome with new loci of resistance to fungal diseases. By ISSR-method 124 ISSR-loci were detected in the genomes of 18 individual plants of introgressive line 5/20–91; 17 of them have been related to introgressive fragments of *Ae. cylindrica* genome in *T. aestivum*. It was shown that ISSR-method is effective for detection of the variability caused by introgression of alien genetic material to *T. aestivum* genome.

РЕЗЮМЕ. Проведено порівняльний аналіз інтрогрессивних і батьківських форм для виявлення ділянок генома донора в пшениці, в яку залучені нові локуси стійкості до грибних захворювань. За допомогою ISSR-методу у генотипів 18 індивідуальних рослин інтрогрессивної лінії 5/20–91 виявлено 124 ISSR-локуса, 17 з яких було відне-

сено до інтрогрессивних фрагментів генома *Ae. cylindrica* у *T. aestivum*. Показано, що ISSR-метод ефективний для детекції мінливості, що спричиняється інтрогрессією чужорідного генетичного матеріалу у геном *T. aestivum*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабаянц Л.Т., Рыбалка О.І., Аксельруд Д.В. Нове джерело стійкості пшениці до основних хвороб // Реалізація потенційних можливостей сортів і гібридів Селекційно-генетичного інституту в умовах України : Зб. наук. пр. — Одеса, 1996. — С. 111–116.
2. Бабаянц Л.Т., Рыбалка А.И. и др. Новый исходный материал для селекции пшеницы на устойчивость к возбудителям инфекционных заболеваний // Пшеница и тритикале : Матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко». — Краснодар, 2001. — С. 329–337.
3. Schachermayr G., Messmer M., Feuillet C., Winzeler H. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum* — derived leaf rust resistance gene Lr 24 in wheat. Plant Genome III. Int. Conf. of Status of Plant Genome Research : Abstracts. — 1995. — P. 206.
4. William M., Hoisington D., Singh R.P., Gonzalez-de Leon D. Towards a PCR-based assay of Lr 34 in bread wheats // Ibid. — P. 259.
5. Куц О.О., Чеботар С.В., Сиволап Ю.М., Тоцький В.М. Молекулярно-генетичний поліморфізм *Triticum aestivum* L., визначений шляхом inter-SSR ПЛП // Вісн. ОДУ. — 2000. — 5, вип. 1. — С. 97–101.
6. Сиволап Ю.М. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях : Науч.-метод. руководство. — К.: Аграр. наука, 1998. — 156 с.

Надійшла 27.09.02