

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЛАЗМОТИПА У СТАБИЛЬНЫХ ЛИНИЙ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИДИПЛОИДОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А.В. Соколюк, М.Е. Василевская

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Введение. Создание тритикале (\times *Triticale*) является примером наиболее успешного применения отдаленной гибридизации и экспериментальной полиплоидии в селекции зерновых культур. Современный генофонд пшенично-ржаных гибридов включает искусственно синтезированные тетраплоидные (*Triticosecale tetraploidii (lebedevii)* Kurk.; A/BRR, $2n=4x=28$), гексаплоидные (*Triticosecale hexaploidii (derzhavinii)* Kurk. et Filat.; AABBRR, $2n=6x=42$) и октоплоидные (*Triticosecale rimpaii* Wittm.; AABBDDRR, $2n=8x=56$) тритикале, а также хромосомно-замещенные формы, в том числе с генетическим материалом диких видов злаков. На сегодняшний день только гексаплоидные тритикале в полной мере отвечают требованиям сельскохозяйственного производства, тогда как тетраплоидные и октоплоидные формы используются в основном в работах по хромосомной реконструкции полигенома пшенично-ржаных гибридов. Принимая во внимание синтетическую природу тритикале и отсутствие естественных центров формообразования, дальнейшее развитие селекционной работы с этой культурой ставит вопрос о необходимости расширения спектра доступной отбору генетической изменчивости за счет вовлечения в скрещивания видового и сортового разнообразия пшеницы и ржи, создания новых амфидиплоидов различного генетического состава и ядерно-цитоплазматической структуры (на цитоплазме пшеницы или ржи).

В Институте генетики и цитологии НАН Беларуси в результате многолетних исследований по отдаленной гибридизации и хромосомной инженерии создан разнообразный генофонд пшенично-ржаных гибридов, характеризующихся различиями по структуре ядерного полигенома и происхождению цитоплазмы (Гордей и др., 2020). В настоящей работе поставлена задача с применением молекулярно-генетических методов провести идентификацию плазмотида у стабильных линий пшенично-ржаных амфидиплоидов с целью дальнейшего использования форм с различной ядерно-цитоплазматической структурой для научных исследований и практической селекции.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись:

- 11 стабильных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале с интрогрессией хромосом D-генома пшеницы (A/B/DRR, $2n=6x=42$), полученных путем гибридизации первичных рекомбинантных линий с современными сортами тритикале (Дубовец и др., 2013);
- 14 стабильных высокопродуктивных линий секалотритикум F₆₋₁₆ поколений (*Secalotriticum*, S^r/RRAABB, $2n=6x=42$), полученных в результате гибридизации тетраплоидной ржи с гексаплоидными тритикале и последующего однократного беккросса на тритикале полученных пентаплоидных ржано-тритикальных гибридов F₁ (Гордей, Люсикив и Гордей, 2020);
- 9 стабильных линий тетраплоидных тритикале (A/BRR, $2n=4x=28$), выделенных в потомстве от скрещивания гексаплоидных тритикале с диплоидной рожью (Дубовец и др., 2010).

Выделение тотальной ДНК осуществлялось с помощью набора Thermo Scientific GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit.

Изучение тотальной ДНК проводилось с помощью ПЦР со специфическими праймерами к 18S/5S митохондриальному (мт) повтору и *ndhH*-району хлоропластной (хп) ДНК. ПЦР проводи-

лась в смеси следующего состава: 250 мкМ каждого из dNTP; 1 мкМ каждого праймера, 2мМ MgCl₂, 1U TaqДНК-полимеразы (ArtBioTech), 1xPCR буфер (ArtBioTech), 100-200 нг тотальной ДНК с использованием амплификатора Bio-Rad C1000 Touch Thermal Cycler.

Для амплификации *18S/5S* мт-повтора были использованы прямой праймер с нуклеотидной последовательностью – 5'-TTCTCGCGTTCCCTTAATTC-3'; обратный праймер с нуклеотидной последовательностью – 5'-CGTTCGCCACTTTGTTCTCA-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 92 °С, 30 сек; отжиг – 55 °С, 1 мин; элонгация – 72 °С, 1 мин; заключительная достройка – 72 °С, 10 мин.

Для амплификации *ndhH*-района хпДНК были использованы следующие праймеры: прямой – 5'-TGCATGGTGTTCTTCGACTG-3'; обратный – 5'-GGATTCCTCATTTACCAAC-3'. Оптимальными условиями для проведения амплификации являются: первичная денатурация – 5 мин при 94 °С; 35 циклов: денатурация – 94 °С, 45 сек; отжиг – 60 °С, 1 мин; элонгация – 72 °С, 1 мин; заключительная достройка – 72 °С, 10 мин.

Детекция принадлежности локусов органелльной ДНК к пшеничному или ржаному типу проводилась с помощью рестрикционного анализа ПЦР-продуктов: *18S/5S* мт-повтор анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Sal I*, *ndhH*-район хлоропластной ДНК анализировался с использованием эндонуклеазы рестрикции *Msp I*.

Продукты ПЦР и рестрикции фракционировали методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×ТАЕ буфере в течение 90 минут при напряжении 80В. Результат документировался в системе гель документации Biorad Gel Doc XR+.

Результаты. Из литературных данных известно, что в зависимости от происхождения пшенично-ржаные гибриды могут содержать различные родительские типы митохондриальной (мт) и хлоропластной (хп) ДНК, при этом в некоторых случаях наблюдается явление гетероплазмии, когда у одного растения присутствуют более одного варианта хпДНК и/или мтДНК (Трубачеева и др., 2012). Установлено, что гетероплазмия у гибридных форм может затрагивать одновременно несколько локусов органелльной ДНК и сохраняться в ряду самоопыленных поколений (Hattori et al., 2002).

Детектировать различия между органелльной ДНК пшеницы и ржи можно на основании ПЦР-ПДРФ анализа *ndhH*-района хлоропластной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *MspI*) и *18S/5S*-повтора митохондриальной ДНК (имеет сайт узнавания эндонуклеазы *SalI*). Плазматипу ржи соответствует отсутствие рестрикции амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагмент 750 п.н.) и наличие рестрикции *tMet-18S/5S*-локуса эндонуклеазой *SalI* (фрагменты 250 п.н.), а плазматипу пшеницы – рестрикция амплифицированного участка *ndhH* эндонуклеазой *MspI* (фрагменты длиной 500 и 250 п.н.) и отсутствие рестрикции *tMet-18S/5S*-локуса эндонуклеазой *SalI* (фрагмент 500 п.н.).

В результате рестрикционного анализа у всех исследованных линий вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале по *ndhH*-району хпДНК были получены фрагменты длиной 500 и 250 п.н. (рис. 1), по *18S/5S* мт-повтору – 500 п.н., что позволяет отнести их к пшеничному типу.

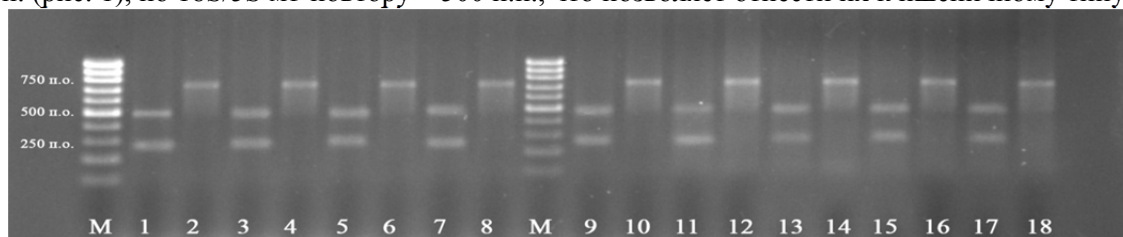


Рисунок 1. – Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов по *ndhH*-району хпДНК у линий гексаплоидных тритикале

М - Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder)

2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ПЦР-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – результат рестрикции ПЦР-продукта *ndhH*-района.

Аналогичные результаты получены для тетраплоидных тритикале.

У всех исследованных линий секалотритикале по *ndhH*-району хлоропластной ДНК были получены фрагменты длиной 750 п.н. (рис. 2), по *18S/5S*-повтору митохондриальной ДНК – 250 п.н. Это свидетельствует о принадлежности данных районов к ржаному типу.

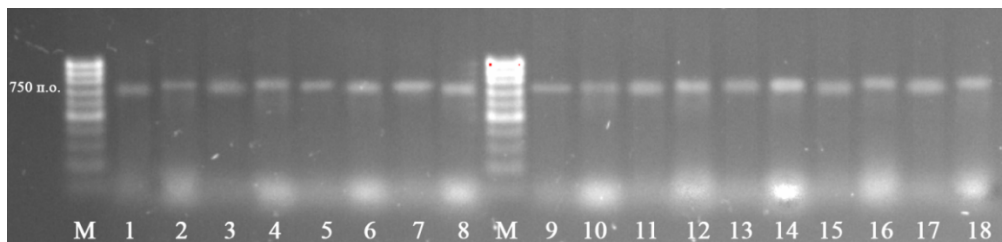


Рисунок 2. – Электрофореграмма детекции ПЦР-продуктов и продуктов рестрикции ПЦР-продуктов по *ndhH*-району хпДНК у линий секалотритикум

М – Маркер молекулярного веса (100 bp DNA Ladder)
 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 – ПЦР-продукт *ndhH*-района; 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17 – результат рестрикции ПЦР-продукта *ndhH*-района.

Выводы. В ходе молекулярно-генетического анализа в коллекции стабильных линий пшенично-ржаных амфидиплоидов выявлены формы с различной ядерно-цитоплазматической структурой. Полученные результаты позволили идентифицировать районы органелльных ДНК ржаного типа в гомоплазматическом состоянии у линий секалотритикум и пшеничного типа в гомоплазматическом состоянии у линий тетраплоидных и вторичных рекомбинантных гексаплоидных тритикале. Гетероплазматического состояния исследованных локусов митохондриальной и хлоропластной ДНК выявлено не было.

Список использованных источников

1. Гордей И.А., Люсиков О.М., Белько Н.Б., Хотылева Л.В., Каминская Л.Н., Корень Л.В., Орловская О.А., Дубовец Н.И., Сычева Е.А. Соловей Л.А., Бондаревич Е.Б., Гриб С.И., Буштевич В.Н. (2020). Тритикале. *Генетические основы селекции растений. В 4 т. Т. 2. Частная генетика растений.* под ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева; Нац. Акад. Наук Беларуси, Ин-т генетики и цитологии. 2-е издание, испр., перераб. и доп. Минск: Беларуская навука, 2020. С. 52-154.
2. Гордей И.А., Люсиков О.М., Гордей И.С. (2020). *Технология создания ржано-пшеничных амфидиплоидов с цитоплазмой ржи – секалотритикум: методические рекомендации.* Минск: Право и экономика. 34 с.
3. Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б. (2013). Создание и молекулярно-цитогенетическое маркирование вторичных хромосомно-замещенных форм гексаплоидных тритикале (*×Triticosecale* Wittm.). *Вестн НАН Беларуси. Сер. биял. навук.* 4. С. 35-44.
4. Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А., Штык Т.И., Бондаревич Е.Б., Кабашникова Л.Ф., Савченко Г.Е. (2010). Создание генетической коллекции тетраплоидных пшенично-ржаных амфидиплоидов и её использование в цитогенетических исследованиях. Сборник научных трудов Института генетики и цитологии НАН Беларуси «Молекулярная и прикладная генетика». 11. С. 26-33.
5. Трубачева Н.В., Кравцова Л.А., Девяткина Э.П., Ефремова Т.Т., Синявская М.Г., Шумный В.К., Першина Л.А. (2012). Гетеро- и гомоплазматическое состояние районов митохондриальной и хлоропластной ДНК у потомков отдаленных гибридов мягкой пшеницы разного происхождения. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 16 (1). С. 160-169.
6. Hattori N., Kitagawa K., Takumi S., Nakamura C. (2002). Mitochondrial DNA heteroplasmy in wheat, *Aegilops* and their nucleus cytoplasm hybrids. *Genetics.* 160 (4). P. 1619–1630.