



Разработка генетической классификации хромосом *Aegilops columnaris* Zhuk. на основании анализа интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*

А.А. Шишкина¹✉, А.Ю. Драгович¹, А.С. Рубан², С.Н. Сибикеев³, А.Е. Дружин³, Е.Д. Бадаева¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт сельского хозяйства Юго-Востока», Саратов, Россия

Aegilops columnaris Zhuk. – потенциальный источник новых генов для улучшения пшеницы, однако до настоящего времени этот вид в селекции не использовался. В данной работе впервые получены и охарактеризованы интрогрессивные линии *T. aestivum* × *Ae. columnaris*. Молекулярно-цитогенетический анализ 20 интрогрессивных линий показал, что в основном они цитологически стабильны и несут от одной до трех пар хромосом эгилопса, дополняющих или замещающих хромосомы пшеницы. В кариотипах 15 линий методами С-дифференциального окрашивания и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) были выявлены пять разных хромосом эгилопса, идентифицированных нами на основе анализа спектров замещений как 3Ae¹, 3Ae², 5Ae², 6Ae¹ и 6Ae². Помимо этого, в линии 2305/1 была обнаружена моносомно дополненная хромосома Ae-a, классифицировать которую на данном этапе исследования невозможно. В нескольких линиях также выявлены акроцентрические и телоцентрические хромосомы (Ae-b и Ae-c), предположительно образовавшиеся из неидентифицированных эгилопсных хромосом путем крупных делеций. Сравнение электрофоретических спектров глиадинов интрогрессивных линий Л-2310/1 и Л-2304/1 с замещениями хромосомы 6D на хромосомы 6-й гомеологической группы *Ae. columnaris* показало, что аллели глиадин-кодирующих локусов у них отличаются. Это подтверждает, что линии Л-2310/1 и Л-2304/1 содержат неидентичные 6Ae-хромосомы. С учетом результатов более ранних работ теперь возможна идентификация 8 из 14 хромосом *Aegilops columnaris*.

Ключевые слова: *Aegilops columnaris*; интрогрессивные линии; дифференциальное окрашивание; FISH; замещения; транслокации; глиадины; запасные белки.

Development of the genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. chromosomes based on the analysis of introgression lines *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*

A.A. Shishkina¹✉, A.Yu. Dragovich¹, A.S. Rouban², S.N. Sibikeev³, A.E. Druzhin³, E.D. Badaeva¹

¹ Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

² Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

³ Agricultural Research Institute for South-East Region, Saratov, Russia

Aegilops columnaris Zhuk. is a potential source of new genes for wheat improvement. However, this species has not yet been used in practical breeding. In the present work we have for the first time reported the development and molecular-cytogenetic characterization of *T. aestivum* × *Ae. columnaris* introgression lines. Analysis has not revealed alien genetic material in five of the 20 lines we have studied, while the remaining lines carried from 1 to 3 pairs of *Aegilops* chromosomes as addition(s) or substitution(s) to wheat chromosomes. Altogether, five different chromosomes of *Aegilops columnaris* have been detected in the karyotypes of 15 lines by C-banding and fluorescent *in-situ* hybridization (FISH). Based on substitution spectra, these chromosomes were identified as 3Ae¹, 3Ae², 5Ae², 6Ae¹ and 6Ae². In addition, another *Aegilops* chromosome has been found in the line 2305/1 as a monosomic addition; due to the lack of group-specific markers we were unable to assign this chromosome to a particular genome or a genetic group and therefore it was designated Ae-a. In several lines acrocentric and telocentric chromosomes have been revealed (Ae-b and Ae-c). It is most likely that these chromosomes were derived from unknown *Aegilops* chromosomes due to a large deletion. A comparison of electrophoretic spectra of gliadins in introgression lines L-2310/1 and L-2304/1 with substitutions of chromosome 6D with two different chromosomes of *Ae. columnaris* (these lines were assigned to the 6th homoeologous group

based on C-banding data) has shown that they carry different alleles of the gliadin loci. This observation confirmed that lines L-2310/1 and L-2304/1 contained non-identical 6Ae chromosomes. Taking into consideration our previous results of FISH analyses, three other *Ae. columnaris* chromosomes can be assigned to homoeologous groups 1, 5 and 7 of the U-genome based on the location of 5S and 45S rDNA loci (1U and 5U) or pSc119.2 probe distribution (7U). Thus, based on our current data as well as on the results of earlier work, we can identify eight out of the 14 chromosomes of *Aegilops columnaris*.

Key words: *Aegilops columnaris*; introgression lines; C-banding; FISH; substitution; translocation; gliadins; seed storage proteins.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Шишкина А.А., Драгович А.Ю., Рубан А.С., Сибикеев С.Н., Друзин А.Е., Бадаева Е.Д. Разработка генетической классификации хромосом *Aegilops columnaris* Zhuk. на основании анализа интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):241-249. DOI 10.18699/VJ17.243

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Shishkina A.A., Dragovich A.Yu., Rouban A.S., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Badaeva E.D. Development of the genetic classification of *Aegilops columnaris* Zhuk. chromosomes based on the analysis of introgression lines *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris*. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(2):241-249. DOI 10.18699/VJ17.243

А *egilops columnaris* Zhuk. – тетраплоидный вид злаков, относящийся к секции *Aegilops* рода *Aegilops* L. и произрастающий главным образом в Турции и на восточной части Дуги плодородия (Van Slageren, 1994). Показано, что один из геномов *Ae. columnaris* Zhuk. унаследован от диплоидного вида *Ae. umbellulata* Zhuk. (Kihara, 1954); ему был присвоен символ U. Вид, послуживший донором второго генома, до сих пор не установлен, в связи с чем он был обозначен символом X^c (Dvořák et al., 1998; Badaeva et al., 2004).

Ae. columnaris – одного из представителей диких сородичей мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) – можно использовать в селекционном процессе для улучшения генофонда хлебопекарной пшеницы как источник новых генов хозяйственно ценных признаков, в частности устойчивости к патогенам и неблагоприятным факторам окружающей среды. Для успешной интрогрессии чужеродного генетического материала и оценки ее влияния на характеристики селекционных линий необходима информация о локализации и размерах чужеродных фрагментов. Достоверную оценку характера интрогрессии можно получить при использовании маркерных систем разных типов (Салина и др., 2008).

Один из наиболее точных и надежных методов определения гомеологии хромосом видов, родственных пшенице, – комплексный анализ чужеродно-дополненных и чужеродно-замещенных линий. С целью идентификации чужеродных хромосом, определения их геномной принадлежности и гомеологической группы применяют морфо-биологические, генетические, цитогенетические и молекулярно-генетические, а также биохимические маркеры.

Морфо-биологические маркеры позволяют предположить наличие чужеродного генетического материала и оценить его влияние на морфологию и физиологические признаки растений непосредственно в поле. Удобной, быстрой и недорогой системой маркирования является электрофоретический анализ запасных белков зерновки пшеницы – глиадинов. Генетический контроль электро-

форетических компонентов глиадина осуществляется шестью независимыми локусами, *Gli-1A*, *Gli-1B*, *Gli-1D*, расположенными на хромосомах 1-й и 6-й гомеологических групп, аллели которых приведены в Каталоге генных символов пшеницы (McIntosh et al., 2010). Каждый локус контролирует синтез нескольких компонентов глиадина, которые наследуются сцепленными группами, получившими название блоков компонентов. Компоненты, входящие в блок и контролируемые одним локусом (кластером генов), различаются подвижностью в электрическом поле, интенсивностью окраски и молекулярной массой. Свободная комбинация аллелей *Gli*-локусов позволяет теоретически идентифицировать более 50 млн генотипов, что дает возможность с высокой точностью определять генотипы сортов и гибридов пшеницы по хромосомам 1-й и 6-й групп (Shepherd, 1968; Созинов, Попереля, 1979; Новосельская-Драгович, 2015).

Метод дифференциального окрашивания (С-бэндинг) выявляет районы конститутивного гетерохроматина на хромосомах. Рисунок С-бэндинга видоспецифичен, что позволяет четко идентифицировать чужеродные хромосомы в селекционном материале. Для решения этой задачи также широко применяют *in situ* гибридизацию. Этот метод, использующий флуоресцентную детекцию сигнала, позволяет напрямую картировать последовательности ДНК на хромосомах (Schneider et al., 2003; Salina et al., 2006; Badaeva et al., 2010).

На сегодняшний день серии линий с замещениями/дополнениями по хромосомам диких видов были получены для 15 диплоидных и полиплоидных видов рода *Aegilops* (Schneider et al., 2008; Zhang et al., 2015); сообщений о наличии таких линий с *Ae. columnaris* в литературе нет. Разработка генетической классификации хромосом этого вида – трудная задача, поскольку значительные преобразования его геномов в процессе эволюции привели к существенным структурным изменениям в них, что осложняет установление гомеологии или геномной принадлежности по сходству морфологических параметров хромосом и ри-

сунков С-бэндинга. В связи с этим особую важность приобретают получение и характеристика замещенных и/или дополненных линий *Ae. columnaris* с мягкой пшеницей.

Цель нашего исследования – анализ 20 интрогрессивных линий *T. aestivum* × *Ae. columnaris* для выявления чужеродных хромосом и определения их гомеологии с хромосомами мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Растительный материал. В работе были изучены с помощью молекулярно-цитогенетических и биохимических маркеров 20 пшенично-эгилопсных (*Ae. columnaris*) интрогрессивных линий, полученных в НИИСХ Юго-Востока (г. Саратов). В качестве материнских форм использованы сорта мягкой пшеницы Добрыня и Л503 (носители пшенично-пырейной транслокации T7DL-7Ai) и сорт Саратовская 68 с нормальным набором хромосом, а также линия к-1193 *Ae. columnaris* как отцовская форма. Линии отбирали по устойчивости к листовой ржавчине или наличию морфологических признаков, не свойственных пшенице. Схемы получения линий представлены в табл. 1.

Методы молекулярно-цитогенетического анализа.

Дифференциальное окрашивание хромосом проводили согласно протоколу, описанному в работе (Badaeva et al., 1994). Хромосомы пшеницы классифицировали в соответствии с генетической номенклатурой (Friebe, Gill, 1996), но для хромосом *Ae. columnaris* генетической классификации нет. В связи с этим при разработке номенклатуры хромосом этого вида мы исходили из тех же принципов, что и для классификации хромосом пшеницы. Хромосомы *Ae. columnaris* (обозначенные далее Ae) подразделили на семь гомеологических групп, в каждую из которых входили представители двух геномов: U и X^c (Badaeva et al., 2004). Принадлежность пяти хромосом *Ae. columnaris* к определенным генетическим группам установлена в настоящем исследовании на основании анализа спектров замещений. При обозначении этих хромосом номер группы ставили перед символом «Ae». Определить геномную принадлежность этих хромосом по спектрам замещений, однако, невозможно. В связи с этим для различения двух хромосом эгилопса, отнесенных к одной и той же группе, использовали верхние индексы 1 или 2. Хромосомы эгилопса с неизвестной классификацией обозначали как Ae-x, где x – условный номер (a-k), разный для разных типов хромосом.

Флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH) с использованием зондов на основе клонированных последовательностей ДНК – pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980), специфичного для хромосом В-генома, и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986), специфичного для хромосом D-генома, – проводили в соответствии с ранее опубликованными методиками (Salina et al., 2006; Badaeva et al., 2010).

Метод электрофореза глиадинов в полиакриламидном геле. Экстракцию глиадинов и электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГе) проводили согласно принятым в лаборатории методикам (Bushuk, Zillman, 1978; Новосельская и др., 1983). Идентификацию аллелей осуществляли в соответствии с каталогом аллелей глиадина (Metakovsky, 1991; Metakovsky, Novoselskaya, 1991).

Таблица 1. Исследованный материал и его происхождение

№ п/п	Образец	Родословная образца
1	Л-2304/1	F ₅ : Л503/ <i>Ae. colum.</i> //Л503/3/ Л503
2	Л-2305/1	»
3	Л-2306/3	»
4	Л-2307/1W	F ₄ : Доб./ <i>Ae. colum.</i> //Доб./3/Доб./4/Доб.
5	Л-2307/1w	»
6	Л-2310/1	F ₄ : Л503/ <i>Ae. colum.</i> //Л503/3/Л503/4/ Л503
7	Л-32	F ₅ : С.68/ <i>Ae. colum.</i> //С.68
8	Л-34	F ₆ : С.68/ <i>Ae. colum.</i> //С.68
9	Л-2185/1	С.68/ <i>Ae. colum.</i> *2//С.68
10	Л-2082/2	Доб./ <i>Ae. colum.</i> //С.68/3/Доб./4/С.68
11	Л-2081/3	»
12	Л-2309/9	F ₄ : Доб./ <i>Ae. colum.</i> //Доб./3/Доб./4/Доб.
13	Л-2311/4	F ₄ : Л503/ <i>Ae. colum.</i> //Л503/3/Л503/4/Л503
14	Л-2040/1	С.68/ <i>Ae. colum.</i> *2//С.68
15	Л-2039/1	»
16	Л-2185/2	»
17	Л-2034/3-1	Доб./ <i>Ae. colum.</i> *2//С.68
18	Л-2034/3-2	»
19	Л-2054/3	Л503/ <i>Ae. colum.</i> *2//Л503
20	Л-2308/5	F ₄ : Доб./ <i>Ae. colum.</i> //Доб./3/Доб./4/Доб.

Примечание. Доб. – Добрыня; С.68 – Саратовская 68; *Ae. colum.* – *Ae. columnaris* (к-1193).

Результаты

Дифференциальное окрашивание хромосом. Кариотип *Ae. columnaris* значительно отличается от кариотипа мягкой пшеницы по морфологии и рисункам дифференциального окрашивания хромосом (рис. 1). По полученным ранее данным (Badaeva et al., 2004), исследованный нами образец к-1193 характеризуется наличием реципрокной транслокации, затрагивающей две спутничные хромосомы – 1U и 5U (на рис. 1 показаны стрелками).

С-дифференциальное окрашивание хромосом не выявило наличия чужеродного генетического материала в 5 из 20 исследованных линий: Л-2039/1, Л-2040/1, Л-2185/2, Л-2309/9, Л-2311/4 (табл. 2). В кариотипах 15 линий идентифицированы несколько типов замещений, дополненные хромосомы или фрагменты отдельных хромосом *Ae. columnaris*.

Кариотип линии Л-2308/5 состоял из 40 хромосом и характеризовался наличием замещения пары хромосом 6A на пару хромосом эгилопса, обозначенную нами 6Ae¹. Хромосома 1D отсутствовала, но при этом была выявлена транслокация с участием хромосомы 4В. Методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (см. далее) данная транслокация была идентифицирована как Т4ВL-1D. Кариотип линии Л-2054/3 включал 41 хромосому; линия

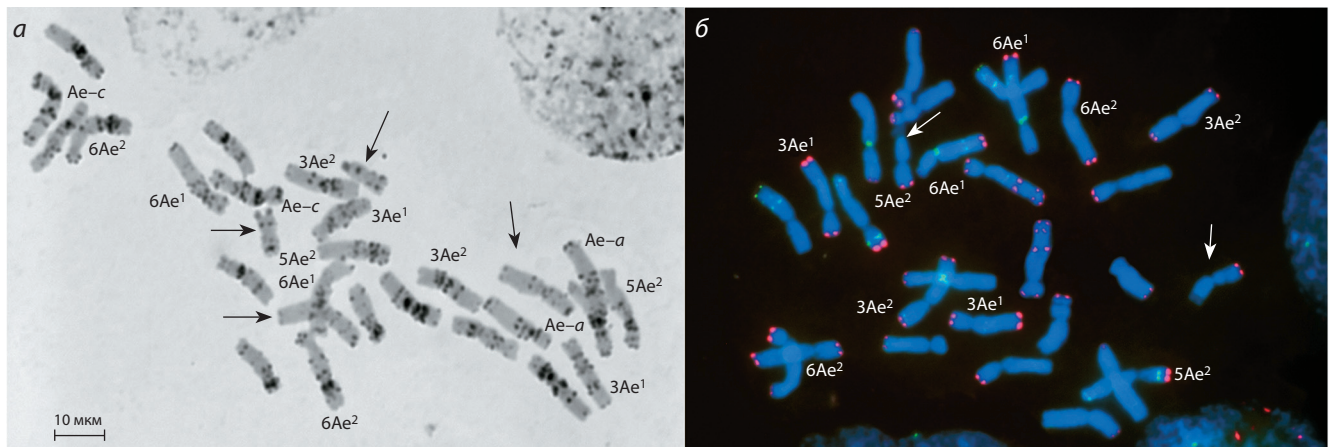


Рис. 1. С-окрашивание (а) и FISH (б) с пробями pSc119.2 (красная) и pAs1 (зеленая) на метафазных пластинках *Ae. columnaris* Zhuk. Хромосомы обозначены в соответствии с генетической классификацией, определенной в настоящей работе. Хромосомы 1U и 5U, участвующие в реципрокной транслокации, указаны стрелками (на рис. б отмечена только одна из двух пар транслоцированных хромосом, маркированных наличием спутников).

Таблица 2. Варианты чужеродной интрогрессии в кариотипах изученных линий

Линия	Число хромосом	Особенности кариотипа
Л-2308/5	40	6A(6Ae ¹); нулли-1D; T4BL-1D
Л-2054/3	41–42	6D(6Ae ¹); ди-/моносомик по 4B
Л-32	42	3D(3Ae ¹)
Л-34	42	3D(3Ae ¹)
Л-2034/3–1	42	3D(3Ae ²), 5D(5Ae ²), 6A(6Ae ²), T6DL.6DS-Ae ²
Л-2034/3–2	42	3D(3Ae ²) 6D(6Ae ^{2del})
Л-2304/1	42	5D(5Ae ²) 6D(6Ae ²)
Л-2306/3	42	Ди-/моносомное замещение 6D/ 6Ae ¹
Л-2185/1	43–44	Моно-/дисомно дополненная хромосома 3Ae ¹
Л-2305/1	43	Моносомно дополненная хромосома Ae-a, генетическая группа не установлена
Л-2307/1w	43	Дисомно дополненная хромосома 6Ae ¹ ; T4BL-1D
Л-2307/1W	44	Дисомно дополненная хромосома 6Ae ¹ ; T4BL-1D расщепляется по наличию/отсутствию 4B
Л-2039/1	42	Чужеродный генетический материал не обнаружен
Л-2040/1	42	Чужеродный генетический материал не обнаружен
Л-2311/4	42	Чужеродный генетический материал не обнаружен
Л-2309/9	42	Чужеродный генетический материал не обнаружен
Л-2185/2	42	Чужеродный генетический материал не обнаружен
Л-2310/1	42	Моносомное 6D/6Ae ¹ замещение, 1D-терминальная транслокация
Л-2081/3	42+1 ⁺ +2 ^a	Пара неклассифицированных акроцентриков ^a Ae-b+ телоцентрик ⁺ Ae-c
Л-2082/2	42+2 ^m +2 ^a	Две пары неклассифицированных акроцентриков ^a Ae-b и мелких метацентриков ^m Ae-c

была моносомной по хромосоме 4B. В этой линии хромосомы 6D замещены на 6Ae¹, аналогично Л-2308/5.

В линиях Л-32 и Л-34 (2n = 42) обнаружен другой вариант замещения, включающий хромосому 3D. Геномная принадлежность чужеродной хромосомы не известна, в связи с чем ее обозначили 3Ae¹.

Образец Л-2034/3 (2n = 42) расщеплялся по типам замещений и, соответственно, был разделен на две отдель-

ные линии: Л-2034/3-1 с тройным замещением по 3D-, 5D- и 6D-хромосомам (рис. 2, з), и Л-2034/3-2 с двойным замещением по хромосомам 3D и 6D. Хромосома, замещающая хромосому 6D, отличалась от таковой, выявленной в линиях Л-2308/5, Л-2054/3 и Л-2306/3. Логично предположить, что она происходит из другого генома, и ее обозначили 6Ae². На хромосоме 6Ae² линии Л-2034/3-2 терминальная половина длинного плеча была делетирована.

Следует отметить, что в этих линиях хромосома эгилопса, заместившая хромосому 3D, принадлежала к другому геному, в отличие от хромосомы 3Ae¹ в линиях Л-32 и Л-34, и была обозначена как 3Ae². Спектр замещений линии Л-2034/3-1 можно, соответственно, обозначить, как 3D(3Ae²) 5D(5Ae²) 6D(6Ae²), а линии Л-2034/3-2 – 3D(3Ae²) 6D(6Ae^{2del}).

Линии Л-2304/1 и Л-2306/3 имели в своих кариотипах по 42 хромосомы. Линия Л-2304/1 (см. рис. 2, а) являлась носителем двойного замещения 5D(5Ae²) 6D(6Ae²), при этом хромосома 5Ae² была идентична таковой, обнаруженной в линии Л-2034/3-2. В связи с тем что у родительской линии *Ae. columnaris* хромосомы 1U и 5U перестроены в результате транслокации (Badaeva et al., 2004) и существенно отличаются от 5Ae², можно предположить, что хромосома 5Ae² относится к X^c-геному.

Линии Л-2306/3 и Л-2310/1 (2n = 42) – моносомно замещенные по 6D/6Ae¹ хромосомам. Линия Л-2310/1 также несла неидентифицированную транслокацию крупного блока гетерохроматина в терминальную часть длинного плеча 1D хромосомы.

Линии Л-2185/1, Л-2305/1, Л-2307/1w, Л-2307/1W, Л-2081/3, Л-2082/2 характеризовались наличием дополненных хромосом или их фрагментов – акро- и телоцентриков. Так, число хромосом в линии Л-2185/1 варьировало от 43 до 44 за счет добавления одной или двух хромосом эгилопса, соответствующих 3Ae¹ (см. рис. 2, б). Кариотип линии Л-2305/1 (2n = 43) содержал одну добавочную хромосому эгилопса. Гомеологию этой хромосомы на текущем этапе исследования установить не удалось из-за отсутствия маркеров, специфичных для определенных гомеологических групп, и значительного отличия чужеродной хромосомы от хромосом мягкой пшеницы по морфологии и рисунку распределения С-блоков. В связи с этим хромосоме было присвоено условное обозначение Ae-a.

Линия Л-2307/1w (2n = 43) содержала моносомно дополненную хромосому 6Ae¹, а линия Л-2307/1W (2n = 44) была дисомно дополненной по той же хромосоме. Следует отметить, что по рисунку дифференциального

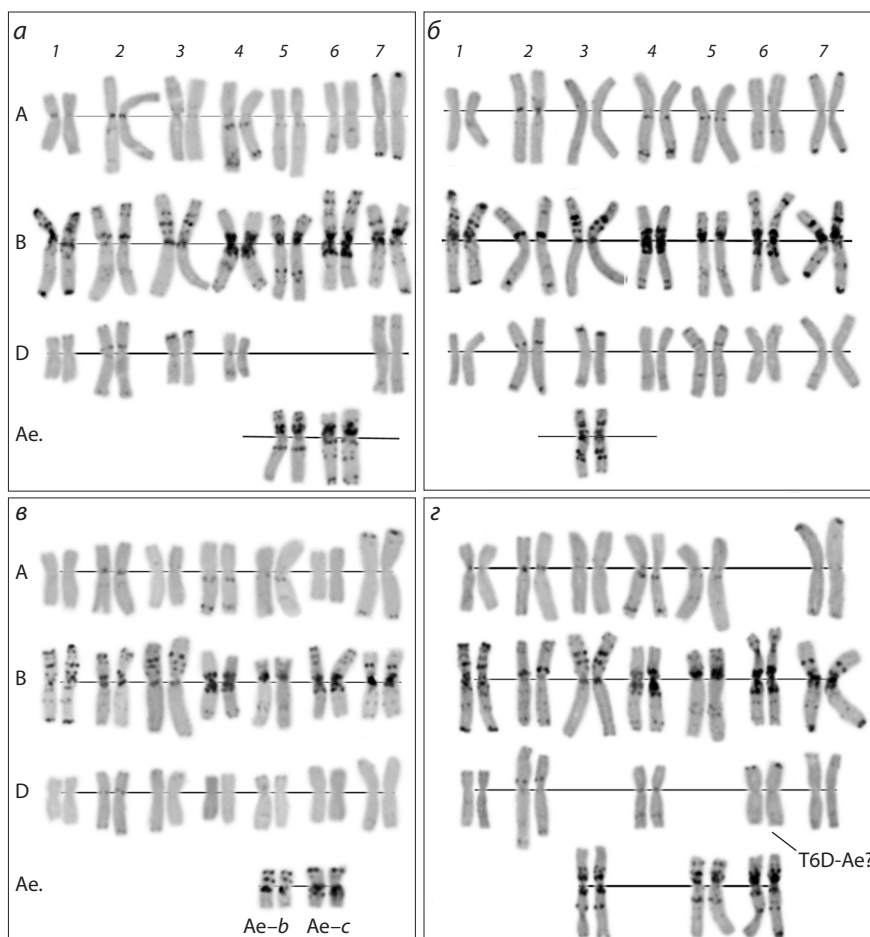


Рис. 2. Варианты интрогрессии в пшенично-эгилопсных линиях, выявленные методом С-бэндинга.

а – кариотип линии Л-2304/1; хромосомы 5D и 6D замещены хромосомами *Ae. columnaris* – 5Ae² и 6Ae²; б – кариотип линии Л-2185/1 с парой дополненных хромосом 3Ae¹ *Ae. columnaris*; в – кариотип линии Л-2082/2 с двумя парами акроцентрических хромосом *Ae. columnaris* Ae-b и Ae-c; з – кариотип линии Л-2034/3-1 с тройным замещением хромосом 6A, 3D и 5D хромосомами 3Ae², 5Ae² и 6Ae² *Ae. columnaris*.

окрашивания дополненные хромосомы были идентичны чужеродным хромосомам линий Л-2308/5, Л-2054/3, Л-2306/3 и, соответственно, их классифицировали как 6Ae¹. У обеих линий также обнаружена транслокация T4BL-1D.

Кариотипы линий Л-2081/3 и Л-2082/2 содержали 45 или 46 хромосом: 42 хромосомы пшеницы, дополненные парой неидентифицированных акроцентрических хромосом и одним телоцентрическим фрагментом (42+2+1 хромосомы) в Л-2081/3, и двумя парами акроцентриков (42+2+2 хромосомы) в линии Л-2082/2 (рис. 2, в). Дополненные хромосомы были обозначены Ae-b и Ae-c соответственно.

Таким образом, цитогенетическое исследование гибридов пшеницы с *Ae. columnaris* показало, что линии в основном цитологически стабильны и несут от одной до трех пар хромосом эгилопса, дополняющих или замещающих хромосомы пшеницы. Всего в изученной выборке выявлено пять разных эгилопсных хромосом, а в двух линиях найдены акроцентрические или телоцентрические хромосомы, предположительно, образовавшиеся из неидентифицированных эгилопсных хромосом путем крупных делеций.

С целью более точной идентификации хромосом эгилопса была использована флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация. FISH в линиях Л-32 и Л-34 (2n = 42) не выявила хромосому 3D. Вместо нее обнаружена субметацентрическая хромосома с крупными сигналами pSc119.2 зонда в субтеломерных районах

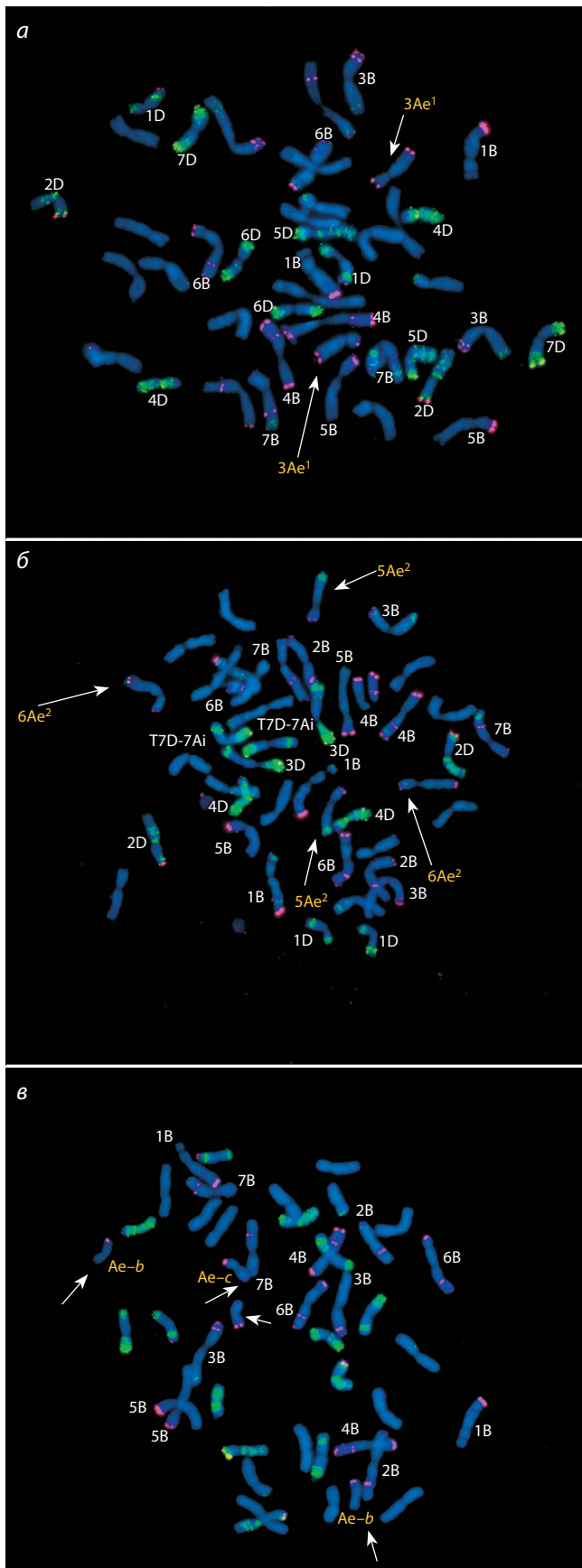


Рис. 3. FISH с зондами pSc119.2 (красный) и pAs1 (зеленый) на метафазных хромосомах линий: а – Л-32; б – Л-2304/1; в – Л-2082/2. Стрелками показаны хромосомы *Ae. columnaris*.

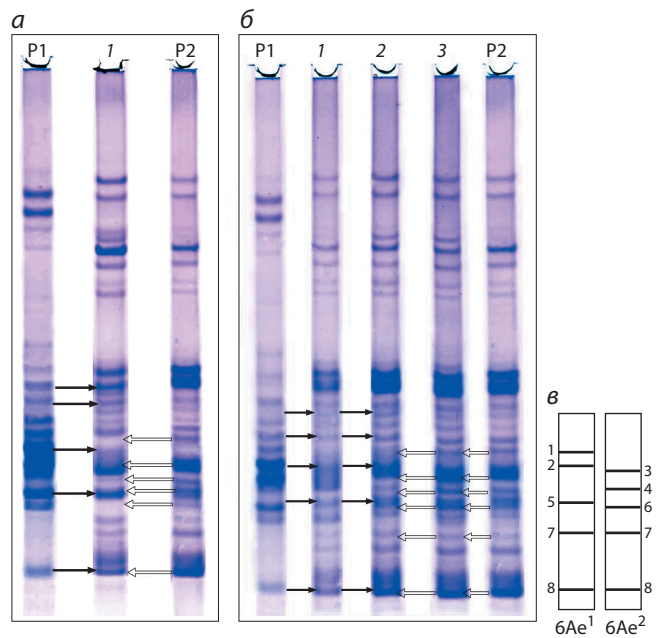


Рис. 4. Электрофоретические спектры глиадина, подтверждающие замещение хромосомы 6D *T. aestivum* (Л503) на хромосомы 6-й гомеологической группы *Ae. columnaris* в линиях Л-2310/1 (а) и Л-2304/1 (б). в – схемы электрофоретических компонентов глиадина, контролируемых хромосомами 6Ae¹ и 6Ae² *Ae. columnaris*.

Черными стрелками обозначены компоненты глиадина, контролируемые 6-й хромосомой *Ae. columnaris*; белыми стрелками – хромосомой 6D *T. aestivum*. P1 – *Ae. columnaris* (к-1193); P2 – *T. aestivum* (Л503); 1 – спектр образца с полным замещением; 2 – спектр гетерозиготы; 3 – спектр образца, идентичный спектру *T. aestivum* (без замещения).

обоих плеч, обозначенная нами как 3Ae¹ (рис. 3, а). Таким образом, было подтверждено наличие замещения хромосомы 3D на пару хромосом *Ae. columnaris* и определены особенности FISH-окрашивания чужеродной хромосомы. В линии Л-2185/1 ($2n = 43$) FISH показала наличие полного набора хромосом пшеницы и одной хромосомы эгилопса 3Ae¹, сходной с таковой в линиях Л-32 и Л-34.

Гибридизация с зондами pSc119.2 и pAs1 подтвердила наличие двойного дисомного 5D(5Ae²) 6D(6Ae²) замещения у линии Л-2304/1 ($2n = 42$): чужеродные хромосомы 5Ae² несли крупные pSc119.2 сигналы в субтеломерных районах короткого и длинного плеч, тогда как у хромосомы 6Ae² в теломере короткого плеча выявлен крупный pSc119.2 сигнал, а в терминальной части длинного – сигнал pAs1 повтора (см. рис. 3, б). Так как у *Ae. columnaris* хромосом с таким рисунком гибридизации обнаружено не было (Badaeva et al., 2004), можно предположить, что 6Ae² хромосома в линии Л-2304/1 несет небольшую терминальную транслокацию от хромосомы 6D.

Линия Л-2305/1 ($2n = 43$) была дополнена другой хромосомой эгилопса, условно обозначенной Ae-a. Она значительно отличалась от хромосом мягкой пшеницы по морфологии и рисунку распределения FISH-проб. Крупный сигнал pSc119.2 повтора располагался в теломере короткого плеча, а более слабый – в теломере длинного плеча Ae-a.

В двух родственных линиях, Л-2081/3 ($2n = 42+1+2$) и Л-2082/2 ($2n = 42+2+2$), хромосомный набор пшеницы был дополнен телоцентриками или акроцентриками, обра-

зовавшимися, предположительно, от хромосом эгилопса. Небольшая акроцентрическая хромосома *Ae-b*, присутствовавшая в обеих линиях, содержала четкий *pSc119.2* сигнал в теломере только короткого плеча. В кариотипе линии Л-2082/2 была выявлена небольшая метацентрическая хромосома *Ae-c* с одним крупным и одним мелким теломерными сигналами (см. рис. 3, в). Телоцентрическая хромосома, обнаруженная в линии Л-2081/3 и содержащая только небольшой теломерный сигнал пробы *pSc119.2*, скорее всего, образовалась из хромосомы *Ae-c* в результате разрыва в перичентромерной области.

На основании сравнения результатов С-бэндинга и FISH можно предположить, что хромосома *Ae-c* могла образоваться в результате делеции основной части длинного плеча хромосомы, предположительно, 7U, тогда *Ae-b*, возможно, представляет собой фрагмент хромосомы 3*Ae*¹. Точка разрыва, по-видимому, располагается на границе проксимального С-блока и эухроматинового фрагмента длинного плеча.

В линиях Л-2306/3 ($2n = 42$), Л-2307/1W ($2n = 44$), Л-2307/1w ($2n = 43$), Л-2308/5 ($2n = 40$) и Л-2054/3 ($2n = 41-42$) методом С-бэндинга идентифицирована транслокация, включающая хромосому 4В. Флуоресцентная гибридизация *in situ* с пробами *pSc119.2* и *rAs1* позволила идентифицировать другую хромосому – 1D, участвующую в данной перестройке, и уточнить структуру транслоцированной хромосомы. Оказалось, что она состоит из большей части хромосомы 1D и длинного плеча хромосомы 4В; точки разрывов находятся в районе дистального *rAs1* сайта хромосомы 1D и в перичентромерном районе хромосомы 4В. Чужеродная хромосома 6*Ae*¹, идентифицированная в кариотипах этих линий методом С-бэндинга, характеризовалась наличием *pSc119.2* сигнала только в теломере длинного плеча, в прицентромерной области которого также наблюдался четкий сигнал *rAs1* повтора.

В линии Л-2310/1 ($2n = 42$) методом С-бэндинга обнаружен необычный вариант окрашивания хромосомы 1D, содержащей крупный гетерохроматиновый сегмент в теломере длинного плеча. FISH-анализ показал наличие в этом же участке хромосомы четкого сайта *pSc119.2* повтора, который у родительских сортов отсутствовал, таким образом, подтвердив наличие транслокации.

Электрофоретический анализ глиадинов. В связи с тем что гены, контролирующие запасные белки пшеницы, локализованы на хромосомах 1-й и 6-й гомеологических групп, у интрогрессивных линий Л-2310/1 и Л-2304/3, в которых цитологически были идентифицированы замещения по двум разным хромосомам 6*Ae*, дополнительно проведен анализ спектров запасных белков в сравнении с родительскими формами и определены аллели глиадинокодирующих локусов.

Обе линии были созданы на основе сорта мягкой пшеницы Л503, у которого генетический контроль электрофоретических компонентов глиадина описывается следующими аллелями глиадинокодирующих локусов: *Gli-A1(m+i)*, *Gli-B1e*, *Gli-D1a*, *Gli-A2q*, *Gli-B2q+w*, *Gli-D2e* (Новосельская-Драгович и др., 2003). Локусы *Gli-A1* и *Gli-B2* могут быть представлены как одним (*Gli-A1m*, *Gli-B2q*), так и другим (*Gli-A1i*, *Gli-B2w*) аллелем. Материн-

ская форма, использованная в скрещивании с эгилопсом, представляла собой один из четырех биотипов – *Gli-A1i*, *Gli-B1e*, *Gli-D1a*, *Gli-A2q*, *Gli-B2q*, *Gli-D2e* – без примеси других сортов или видов, т.е. по глиадинокодирующим локусам была генетически однородным материалом. Генетический контроль электрофоретических компонентов глиадина у *Ae. columnaris* не изучен.

Гибриды, у которых полностью или частично отсутствовали компоненты, контролируемые хромосомой 6D (некоторые электрофоретические компоненты, контролируемые локусами 6D и 6*Ae*, имеют одинаковую подвижность), и появлялись компоненты, характерные для спектра эгилопса, классифицировали как гомозиготы по замещению (рис. 4, а, б). Гибриды, в спектре которых присутствовали компоненты, кодируемые как хромосомой 6D, так и хромосомой эгилопса, и выявленные у гомозигот по замещению, классифицировали как гетерозиготы по замещению (см. рис. 4, б).

Показано, что все исследованные зерна интрогрессивной линии Л-2310/1 представляют собой генотипы с полным замещением хромосом 6D пшеницы на хромосому 6*Ae*¹ эгилопса (см. рис. 4, а). В линии 2304/1 обнаружены как генотипы с полным 6D/6*Ae*² замещением, так и гетерозиготные формы (см. рис. 4, б).

Сравнение электрофоретических спектров глиадинов интрогрессивных линий Л-2310/1 и Л-2304/1 с замещениями хромосомы 6D на хромосомы 6-й гомеологической группы *Ae. columnaris* показало, что аллели глиадинокодирующих локусов у них отличаются (рис. 4, в), что подтверждает наличие в линиях Л-2310/1 и Л-2304/1 неидентичных хромосом 6*Ae*.

Обсуждение

Aegilops columnaris – потенциальный источник новых генов селекционно-ценных признаков для генетического улучшения пшеницы. Использование этого вида в селекционной практике осложняется тем, что классификация его хромосом не разработана, а происхождение до сих пор не установлено. По структуре кариотипа и рисункам дифференциального окрашивания хромосом *Ae. columnaris* значительно отличается от других диплоидных и полиплоидных видов *Aegilops*, обнаруживая некоторое сходство лишь с *Ae. triaristata* (Badaeva et al., 2004).

С другой стороны, отдельные хромосомы в кариотипе *Ae. columnaris* похожи на хромосомы таких видов, как *Ae. geniculata* Roth. и *Ae. biuncialis* Vis., U-геном которых унаследован от *Ae. umbellulata*. Однако эти виды настолько различаются структурой кариотипов, рисунками С-окрашивания хромосом и гибридизации проб 5S и 18S–26S рДНК и других маркеров, что говорить об их непосредственном родстве не представляется возможным (Badaeva et al., 2004). Видимо, в процессе эволюции геном от *Ae. umbellulata* претерпел настолько существенные изменения, что для установления генетических связей хромосом этого вида с хромосомами U-геномов других представителей рода *Aegilops* простого сравнения хромосом недостаточно.

Опубликованная в предыдущей работе (Badaeva et al., 2004) классификация хромосом *Ae. columnaris*, основанная на сравнении рисунков их окрашивания с хромосома-

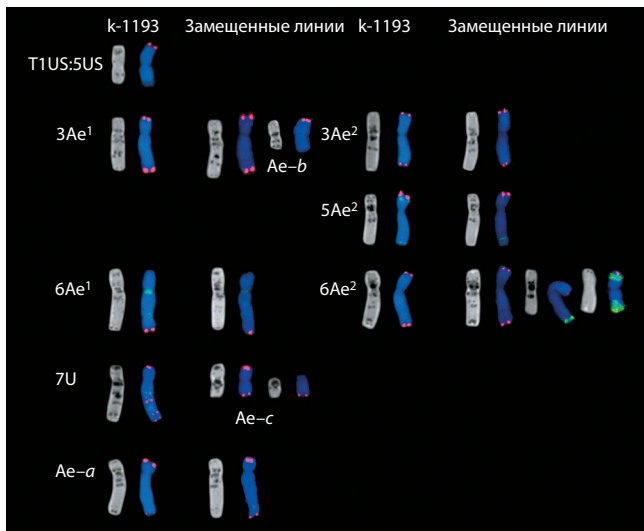


Рис. 5. Сравнение хромосом *Ae. columnaris* (k-1193) с хромосомами, выявленными в интрогрессивных линиях.

ми пшеницы, лишь частично соответствует полученным в настоящей работе данным. Так, например, хромосомы 3U и 5X соответствовали хромосомам 3Ae¹ и 5Ae² по нашей классификации, тогда как хромосома 6Ae² ранее была классифицирована как 2U, 6Ae¹ – как 3X, а идентифицированную нами 3Ae² ранее относили к 7-й группе.

Способность хромосом разных видов злаков замещать хромосомы пшеницы в геноме гибридов считается одним из наиболее надежных методов определения их генетического родства (Моррис, Сирс, 1970). Именно этот подход мы использовали при создании классификации хромосом *Ae. columnaris*. На основании анализа спектров замещений в 15 линиях *Triticum aestivum* × *Ae. columnaris* были идентифицированы пять разных вариантов интрогрессии, т. е. всего из 14 хромосом эгилопса у изученных линий было представлено 5: 3Ae¹, 3Ae², 5Ae², 6Ae¹ и 6Ae² (рис. 5). Еще одна хромосома (Ae-a) выявлена в линии 2305/1 в виде моносомного дополнения; определить соответствующую ей гомеологическую группу на данном этапе исследования невозможно.

Помимо анализа спектров замещений, для определения гомеологии хромосом видов семейства Triticeae можно использовать другие типы маркеров, в том числе молекулярно-цитогенетические. Одними из наиболее распространенных маркеров являются локусы 5S и 45S рРНК генов. У злаков основные локусы 45S рДНК располагаются на хромосомах 1, 5 и 6-й гомеологических групп, а локусы 5S рДНК – на хромосомах 1-й и 5-й групп (Dvořák et al., 1984, 1989). При этом известно, что у *Ae. umbellulata* – предка U-генома *Ae. columnaris* – кластеры рРНК генов находятся на хромосомах 1-й и 5-й групп (Badaeva et al., 1996). На основании этого две спутничные хромосомы *Ae. columnaris* были отнесены к U-геному, 1-й и 5-й гомеологическим группам, однако известно, что в кариотипе исследованного нами образца эти две хромосомы перестроены в результате реципрокной транслокации (см. рис. 1, а, б, отмечены стрелками). Ранее было показано, что специфический рисунок распределения зонда рSc119.2 с

двумя четкими интерстициальными сайтами в длинном плече характеризует хромосому 7U диплоидных и полиплоидных видов *Aegilops* (Badaeva et al., 2004). Две хромосомы с аналогичным рисунком гибридизации выявлены и в кариотипе исследованной нами линии *Ae. columnaris*; вероятно, их следует классифицировать как 7U.

Исходя из описанного выше и основываясь на результатах анализа пшенично-эгилопсных замещенных линий и особенностях рисунков гибридизации доступных ДНК-зондов, на сегодняшний день представляется возможным определить гомеологию 8 из 14 хромосом *Ae. columnaris*: 1U, 3Ae¹, 3Ae², 5U, 5Ae², 6Ae¹, 6Ae², 7U. Работы по определению гомеологических групп шести оставшихся хромосом в настоящее время продолжаются.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 15-04-00296.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

- Моррис Е.Р., Сирс Э.Р. Цитогенетика пшеницы и родственных форм. Пшеница и ее улучшение. Под ред. М.М. Якубцинера М.: Колос, 1970;84-90.
- Новосельская А.Ю., Метаковский Е.В., Созинов А.А. Изучение полиморфизма глиадинов некоторых сортов пшеницы методами одномерного и двумерного электрофореза. Цитология и генетика. 1983;17(5):45-50.
- Новосельская-Драгович А.Ю. Генетика и геномика пшеницы: запасные белки, экологическая пластичность и иммунитет. Генетика. 2015;51(5):568-583. DOI 10.7868/S0016675815050045.
- Новосельская-Драгович А.Ю., Крупнов В.А., Сайфулин Р.А., Пухальский В.А. Динамика генетического разнообразия саратовских сортов мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. по глиадин-кодирующим локусам за 80-летний период научной селекции. Генетика. 2003;39(10):1338-1346.
- Салина Е.А., Егорова Е.М., Адонина И.Г., Добровольская О.Б., Будашкина Е.Б., Леонова И.Н. ДНК-маркеры для генотипирования линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch. и *Triticum timopheevii* Zhuk. Информ. вестник ВОГиС. 2008;12(4):620-628.
- Созинов А.А., Попереля Ф.А. Полиморфизм проламинов и селекция. Вестник с.-х. науки. 1979;10:21-34.
- Badaeva E.D., Amosova A.V., Samatadze T.E., Zoshchuk S.A., Shostak N.G., Chikida N.N., Zelenin A.V., Raupp W.J., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 4. Evolution of the U-genome cluster. Plant Syst. Evol. 2004;246:45-76. DOI 10.1007/s00606-003-0072-4.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. Plant Syst. Evol. 1994;192(1):117-145. DOI 10.1007/BF00985912.
- Badaeva E.D., Friebe B., Gill B.S. Genome differentiation in *Aegilops*. 2. Physical mapping of 5S and 18S-26S ribosomal RNA gene families in diploid species. Genome. 1996;39(6):1150-1158. DOI 10.1139/g96-145.
- Badaeva E.D., Zoshchuk S.A., Paux E., Gay G., Zoshchuk N.V., Roger D., Zelenin A.V., Bernard M., Feuillet C. Fat element – a new marker for chromosome and genome analysis in the Triticeae. Chrom. Res. 2010;18(6):697-709. DOI 10.1007/s10577-010-9151-x.
- Bedbrook R.J., Jones J., O'Dell M., Thompson R.J., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560.

- Bushuk W., Zillman R.R. Wheat cultivar identification by gliadin electrophoregrams. 1. Apparatus, method, and nomenclature. *Can. J. Plant Sci.* 1978;58:505-515.
- Dvořák J., Lassner M.W., Kota R.S., Chen K.C. The distribution of the ribosomal RNA genes in the *Triticum speltooides* and *Elytrigia elongata* genomes. *Can. J. Genet. Cytol.* 1984;62(5):628-632.
- Dvořák 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;148:423-434.
- Dvořák J., Zhang H.-B., Kota R.S., Lassner M. Organization and evolution of the 5S ribosomal RNA gene family in wheat and related species. *Genome.* 1989;32(6):1003-1016.
- Friebe B., Gill B.S. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats. *Methods in genome analysis in plants: their merits and pitfalls.* Ed. P.P. Jauhar. N.Y.; L.; Tokyo: Boca Ration: CRC Press, 1996;39-60.
- Kihara H. Considerations on the evolution and distribution of *Aegilops* species based on the analyser-method. *Cytologia.* 1954;19(4):336-357.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2010. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
- Metakovsky E.V. Gliadin allele identification in common wheat. 2. Catalogue of gliadin alleles in common wheat. *J. Gen. Breed.* 1991;45:325-344.
- Metakovsky E.V., Novoselskaya A.Yu. Gliadin allele identification in common wheat I. Methodological aspects of the analysis of gliadin patterns by one dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Gen. Breed.* 1991;45:317-324.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Report.* 1986;4(2):102-109.
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.R. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome.* 2006;49:1023-1035. DOI 10.1139/G06-050.
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breeding.* 2003;122:396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.x.
- Schneider A., Molnar I., Molnar-Lang M. Utilisation of *Aegilops* (goatgrass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. *Euphytica.* 2008;163:1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y.
- Shepherd K.W. Chromosomal control of endosperm proteins in wheat and rye. *Proc. 3rd Int. Wheat Genet. Symp.* Eds. K.W. Finlay, K.W. Sherherd. Canberra. Austral. Acad. Sci., 1968;86-96.
- Van Slageren M.W. Wild Wheats: a monograph of *Aegilops* L. and *Amblyopyrum* (Jaub. et Spach) Eig (*Poaceae*). Wageningen: Wageningen Agricultural University and ICARDA, Aleppo, Syria, 1994.
- Zhang P., Dundas I.S., McIntosh R.A., Xu S.S., Park R.F., Gill B.S., Friebe B. Wheat–*Aegilops* Introgressions. *Alien Introgression in Wheat Cytogenetics, Molecular Biology, and Genomics.* Ed. M. Molnar-Lang, C. Ceoloni, J. Dolžel. Springer International Publishing Switzerland, 2015;221-243. DOI 10.1007/978-3-319-23494-6.