

УДК 633.1;577.21

¹О.Н. Хапилина*, ¹М.Ж. Каирова,
²Р.Н. Календарь¹РГП «Национальный центр биотехнологии» КН МОН РК, г. Астана, Казахстан²Institute of Biotechnology MTT/BI Plant Genomics Lab, г. Хельсинки Финляндия

*e-mail: oksfur@mail.ru

Формирование коллекции пшеницы для поиска новых аллелей генома

Проблема сохранения биологического разнообразия на уровне генов, является весьма актуальной. Одной из первостепенных задач является выбор подходов, технологий и критериев оценки генетического разнообразия. К приоритетным направлениям науки относятся развитие технологий анализа геномов растений. Одним из важных аспектов генетики и практической селекции растений является детальная характеристика используемого материала. Для решения этой задачи внедряются новые технологии, которые базируются на анализе полиморфизма ДНК. Наиболее важным моментом в подобного рода исследованиях является формирование репрезентативных коллекций, содержащих все аллельные варианты и комбинации генов. Формирование коллекции пшеницы, являющееся целью проводимых исследований, было проведено для выявления генетических форм исследуемого вида.

Ключевые слова: пшеница, полиморфизм, коллекция, секвенирование, ДНК, ген, молекулярно-генетические маркеры, изоферменты

О.Н. Хапилина, М.Ж. Каирова,
Р.Н. Календарь**Геномның жаңа аллельдерін табу үшін бидайдың коллекциясын жасау**

Гендер деңгейінде биологиялық әртүрлілікті сақтау мәселесі өзекті болып табылады. Негізгі мәселелердің бірі генетикалық түрлілікті бағалау үшін технологиялар мен критерийлерді таңдау болып табылады. Ғылымның басты бағыттарына өсімдік геномын талдау технологияларын дамыту жатады. Өсімдіктер генетикасы мен практикалық селекцияның негізгі аспектілерінің бірі пайдалынатын материалды егжей-тегжейлі сипаттау болып табылады. Бұл мәселені шешу үшін ДНК полиморфизм талдауына негізделген жаңа технологиялар енгізілуде. Осындай зерттеулер кезіндегі негізгі мәселе гендердің барлық комбинациялары мен аллельді нұсқалары бар репрезентативті коллекция жасау болып табылады. Зерттеу мақсаты болып табылатын бидай жиынтығын құрастыру зерттелетін түрдің генетикалық формаларын анықтау үшін жасалған болатын.

Түйінді сөздер: бидай, полиморфизм, жиынтық, секвендеу, ДНК, ген, молекулярлы-генетикалық маркер, изоферменттер

O.N. Khapilina, M.Zh. Kairova,
R.N. Kalendar**Formation of a collection of wheat to search for new alleles genome**

The problem of the conservation of biological diversity at the level of genes is very important. One of the primary problems is the choice of approaches techniques and criteria for assessing genetic diversity. Priority areas include the development of science technology analysis of plant genomes. One of the important aspects of genetics and plant breeding practices in detail the material used. To solve this problem, introducing new technologies, which are based on the analysis of DNA polymorphism. The most important thing in this kind of research is the formation of representative collections containing all allelic variants and gene combinations. Formation of a collection of wheat, which is the aim of the research, was conducted to identify the genetic forms of the test species.

Keywords: wheat, polymorphism, collection, sequencing, DNA, gene, molecular genetic markers, isozymes

Проблема сохранения биологического разнообразия на уровне генов, является весьма актуальной. Одной из первостепенных задач является выбор подходов, технологий и критериев оценки генетического разнообразия. К приоритетным направлениям науки относятся развитие технологий анализа геномов растений.

Современные технологии секвенирования ДНК на сегодняшний день уже позволяют быстро и дешево секвенировать полностью последовательность нескольких геномов индивидуальных линий у данного вида. Использование единственной линии, у которой была почти полностью секвенирована вся ядерная ДНК, не достаточно, чтобы выяснить природу полиморфизма генов у исследуемого вида и выявить все его генетические формы. Кроме того, до сих пор имеется мало информации о природе различий в аллельных вариантах важнейших генов пшеницы, включая изоферменты, гены устойчивости к болезням и стрессам, запасных белков и другим генам [1].

На сегодняшний день гены, имеющие несколько копий, связанные с качественными характеристиками зерна, используемого для хлебопечения или изготовления макарон, а также быстро эволюционирующие гены, такие как гены устойчивости к болезням, и генов участвующих в регуляторных процессах, до сих пор не известны, хотя очень важно иметь полную информацию о генетическом разнообразии каждого вида.

Уникальная особенность генома пшеницы предопределяет необходимостью использования высокоразрешающего популяционного картирования и картирования с целью для идентификации генов *de novo*, являющихся уникальными для пшеницы и ячменя, а также генов, лежащие в основе QTLs. Использование параллельного секвенирования генетически-отдаленных линий, содержащих весь набор аллельных вариантов генома данного вида, позволит нам понять причину полиморфизма на уровне белка и использовать эти знания для разработки технологий быстрой и полной идентификации селекционных линий по всем исследуемым генам одновременно.

Проблемы секвенирования генома *T. aestivum*, по мнению ряда ученых, возникают ввиду его больших размеров, полиплоидности и боль-

шого количества повторяющихся элементов. Геном этого вида состоит из около 17 млрд нуклеотидов [2]. По современным текущим оценкам геном пшеницы состоит из 77 000 -295 900 генов [3, 4]. Кроме того, предполагается, что на 75-90% геном пшеницы состоит из повторяющихся последовательностей, в основном, состоящих из вложенных мобильных элементов [5]. Обилие повторяющихся последовательностей и связанное с этим увеличение размера генома еще больше усложняет его секвенирование, так как генные копии перемежаются с длинными полосами повторов, которые трудно развернуть в процессе сборки целого генома. Все это делает процесс секвенирования и анализа генома пшеницы одним из наиболее сложных.

Недавний прогресс в развитии технологий для быстрой детекции полиморфных маркеров в сочетании с новыми методами определения генетических и физических карт в сочетании с технологиями секвенирования последовательностей, представляет собой настоящий прорыв в получение генетических карт рода *Triticeae*. Для пшеницы, физические карты хромосом 1A, 1B, 3A, 3B, и 3D [6], а также предварительный анализ последовательности всех хромосом мягкой пшеницы уже доступны на сайте <http://urgi.versailles.inra.fr/Species/Wheat/Sequence-Repository>.

Знания разнообразия и закономерностей наследования различных форм ферментов или функционально сходных неферментативных белков расширяют возможности идентификации сортов, форм гибридов по генотипу.

В природных условиях республики сформировался специфический генофонд растений, отличающихся рядом ценных свойств: уникальной зимостойкостью; скороспелостью; устойчивостью к засухе в первой половине вегетации, устойчивостью к поздним весенним и ранним осенним заморозкам и к положительным пониженным температурам (холодостойкостью); быстрой восстанавливаемостью метаболических процессов после перенесенных заморозков и засухи, имеющих повышенную устойчивость к фузариозно-гельминтоспорозным болезням [7].

В этой связи формирование коллекции генетически отдаленных индий пшеницы было начато с поиска стародавних сортов, возделываемых в Казахстане в разное время.

Материалы и методы

Информация о родословной, ботанической характеристике, особенностях роста, определенных аллелях, реакции на биотические и абиотические стрессы были взяты в доступных базах доступа (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.vir.nw.ru/data/dbn, www.wheatpedigree.net). Анализ спектров амилазы проводили после экстракции из семян буфером, содержащим 0,02 М CaCl и 20% сахарозу в соответствии с методикой [8].

Результаты и их обсуждение

Формирование коллекции сортов пшеницы является одним из основополагающих этапов по изучению генетического разнообразия пшеницы. Важная роль в формировании коллекции принадлежит инорайонным и местным сортам, к которым были отнесены «старые, подвергшиеся длительному естественному отбору». Коллекционный материал, созданный на протяжении многих десятилетий имеет непреходящее значение как один из потенциальных источников и доноров уникальных признаков, сформированных в специфических условиях Казахстана.

В процессе длительного культивирования в определенных климатических условиях местные сорта накопили уникальные комбинации аллелей генов, контролирующую способность противостоять неблагоприятным факторам внешней среды. Благодаря разнообразию почвенно-климатических условий, спонтанному возникновению мутаций, дрейфу генов, связанному с расселением человека, действию бессознательного искусственного и естественного отборов, пшеница стала исключительно гетерогенной и полиморфной [1].

Стародавние сорта и местные формы сельскохозяйственных растений в результате длительного естественного и искусственного отбора лучше других приспособлены к локальным условиям произрастания и отличаются оптимальной для данной местности длиной вегетационного периода. Стародавние сорта наряду с сортами народной селекции имеют более высокий уровень популяционного полиморфизма в сравнении с современными, что делает их ценным источником генетического разнообразия для улучшения современных сортов.

В коллекцию вошли сорта пшеницы, возделываемые в период 1939-1979 гг. Также нами был проведен поиск ландрасов различного эко-

лого-географического положения. Так, среди сортов средневропейской зоны возделывания пшеницы, доминирующим общим предком является сорт Полтавка, в южноевропейском регионе доминирующим предком большинства возделываемых сортов является известный стародавний сорт Turkey Red, в дальневосточном регионе доминирует сорт Red Fife. Также в состав коллекции были включены линии пшеницы, относящиеся к различным видам пшеницы (*T. spelta*, *T. persicum*, *T. dicoccum*, *T. turgidum*, *T. araraticum* и др.). Данные виды отличаются прежде всего не только составом генома, но и различной адаптивной способностью к воздействию факторов внешней среды. Например, вид *T. turgidum* ($2n = 28$), незначительно распространенный, состоит из озимых и полуюзимых форм, отличается высокой продуктивностью, но имеет низкое хлебопекарное качество. Входит в родословную сорта Харьковская 46 (<http://www.wheatpedigree.net>).

Вид *T. spelta* состоит как из озимых, так и яровых форм, отличается скороспелостью, сравнительной зимостойкостью, неприхотливостью к почвам, однако имеет отрицательные признаки — ломкость колоса, малая урожайность. От других гексаплоидных видов пшеницы отличается рецессивным аллелем гена *q* в хромосоме 5A.

Одной из наиболее полиморфных известных систем пшеницы является система α -амилазы. Этот фермент может быть использован в качестве генетического маркера, а также для оценки полноты коллекции, для выяснения генеалогии сортов пшеницы, для уточнения хромосомных карт сцепления. Учитывая этот факт, а также то, что этот фермент принимает участие в процессах метаболизма веществ, определяющих технологические характеристики зерна, возникла необходимость исследовать его генетическую детерминацию.

Анализ межсортового полиморфизма и частоты встречаемости аллельных вариантов α -амилазных локусов, а также их сочетаний в коллекциях сортов отечественной селекции яровой и озимой мягкой и яровой твердой пшеницы выявил недостаточность коллекции по этому признаку.

По результатам экспериментов, было установлено, что коллекция состоит из генотипов, содержащих локусы α -Аму-А1; α -Аму-В1; α -

Аmy-B3; α -Аmy-D1 локусы, из которых преобладают α -Аmy-A1a; α -Аmy-B1a; α -Аmy-B3a; α -Аmy-D1a.

В результате нами выявлено, что доминирующими локусами в коллекции являются локусы α -Аmy-A1a (идентифицирован у 91%), α -Аmy-B1a (идентифицирован у 50% образцов), α -Аmy-D1a (встречается у 82%), локус α -Аmy-B3a (встречается у 86,4%). Наименьшей частотой встречаемости обладали локусы α -Аmy-A1e (менее 0.5%), α -Аmy-A1b, α -Аmy-A1a/b и α -Аmy-D1b – частоты встречаемости трех последних локусов не превышали 5%.

Таким образом, проведенные исследования показали важность данного этапа исследований – формирования коллекции, для того, чтобы выяснить природу полиморфизма генов у исследуемого вида и выявить все его генетические формы. Необходимо в дальнейшем детально

проанализировать выявленные аллельные варианты важнейших генов пшеницы, включая изоферменты, гены устойчивости к болезням и стрессам, запасных белков и другим генам. Это позволит выявить причину полиморфизма на уровне белков, с использованием методики параллельно секвенирования генетически-отдаленных линий пшеницы, содержащих весь набор аллельных вариантов изоферментов и других важных генов данного вида. В перспективе эти знания можно будет использовать для разработки технологий быстрой и полной диагностики селекционных линий по всем исследуемым генам одновременно.

Данная коллекция будет постоянно пополняться линиями пшеницы, поскольку необходимо выявить максимальное количество линий со всеми возможными комбинациями и вариациями генов.

Литература

- 1 Митрофанова О.П. Генетические ресурсы пшеницы в России: состояние и предселекционное изучение // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2012. – Т. 16, № 1. – С. 10 – 20.
- 2 Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C., Choulet F., Leroy P., Korol A., Michalak M., Kianian S., Spielmeier W., Lagudah E., Somers D., Kilian A., Alaux M., Vautrin S., Berges H., Eversole K., Appels R., Safar J. A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B // Science. – 2008. – Vol. 322. – P. 101 – 104.
- 3 Rabinowicz P.D., Citek R., Budiman M.A., Nunberg A., Bedell J.A., Lakey N., O’Shaughnessy A.L., Nascimento L.U., McCombie W.R., Martienssen R.A. Differential methylation of genes and repeats in land plants // Genome Res. – 2005. – Vol. 15. – P. 1431 – 1440.
- 4 Berkman P.J., Skarshewski A., Lorenc M.T., Lai K., Duran C., Ling E.Y.S., Stiller J., Smits L., Imelfort M., Manoli S., McKenzie M., Kubalakova M., Simkova H., Batley J., Fleury D., Dolezel J., Edwards D. Sequencing and assembly of low copy and genic regions of isolated *Triticum aestivum* chromosome arm 7DS // Plant Biotech J. – 2011. – Vol. 9. – P. 768 – 775.
- 5 Wanjugi H., Coleman-Derr D., Huo N.X., Kianian S.F., Luo M.C., Wu J.J., Anderson O., Gu Y.Q. Rapid development of PCR-based genome-specific repetitive DNA junction markers in wheat // Genome. – 2009. – Vol. 52. – P. 576 – 587.
- 6 http://urgi.versailles.inra.fr/gb2/gbrowse/wheat_phys_pub/
- 7 Гончаров П.Л. Генофонд сельскохозяйственных культур для селекции устойчивых сортов. – Новосибирск, 1999. – С. 3–6.
- 8 Scanolalios J. G., Chao S.E. Melville J. C. Biochemical characterization of the major amylase form coded by the Amy -1 gene in maize // Nature biotechnology. – 1978. – Vol. 69. – P. 149 – 154.