АЛЛЕЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ АНДРОГЕНЕЗА *IN VITRO* У ГЕКСАПЛОИДНОГО ТРИТИКАЛЕ

ALLELIC STATUS OF MICROSATELLITE LOCI AND EFFICIENCY OF *IN VITRO* ANDROGENESIS IN HEXAPLOID TRITICALE

Лемеш В.А. [1], Зайцева О.И. [1], Буштевич В.Н. [2], Гриб С.И. [2]
Lemesh V.A.[1], Zaitseva O.I.[1], Bushtevich V.N.[2], Grib S.I.[2]

[1]ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси»
[2]РУП «НПЦ по земледелию НАН Беларуси»
[1] State Scientific Institution "Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus"
[2] Republican Unitary Enterprise "Scientific and Practical Center of NAS of Belarus for Agriculture"
e-mail:v.lemesh@igc.by

A high correlation was established between the allelic status of several microsatellite loci in chromosomes 2A, 2B, 5A, 5B and the capacity of triticale anther for androgenesis in in vitro culture. In addition, we demonstrated a possibility of efficient use of SSR markers developed for wheat to study the embryogenic potential of triticale. In F_2 triticale populations resulted from crossing genotypes that were contrasting in terms of in vitro androgenesis, forms with low responsiveness prevailed. Most of them were plants with heterozygous microsatellite loci. Although the examined microsatellite loci are not genes directly responsible for embryogenesis and in vitro regeneration, but are only linked to such, the information acquired can be used to map desirable genes.

Метод культуры пыльников лежит в основе современных технологий создания новых рекомбинантных генотипов и сортов растений и является перспективным для повышения эффективности селекции тритикале. Однако масштабы применения биотехнологических подходов при создании линий удвоенных гаплоидов остаются невысокими, в том числе из-за того, что до настоящего времени не идентифицированы гены, контролирующие признаки, характеризующие способность растений к перестройке морфогенетических процессов в культуре гаметофитных тканей и последующей регенерации растений.

Гексаплоидное тритикале является сложным объектом для генетических исследований, так как представляет собой пшенично-ржаной аллополиплоид. В связи с тем, что тритикале включает А- и В- геномы пшеницы, для скрининга по локусам, связанным с контролем параметров пыльцевого эмбриогенеза у тритикале, целесообразно использовать ДНК-маркеры, разработанные для пшеницы.

Материалом для исследований служили четыре линии удвоенных гаплоидов ярового гексаплоидного тритикале, полученные методом культуры пыльников *in vitro* (Dh-3-1-09, Dh-11-2-09, Dh-12-1-09, Dh-27-1-08-1), контрастные по параметрам андрогенеза *in vitro*, а также гибриды F_2, полученные на их основе. Гибриды F_2 (четыре популяции) выращены в фитотронно-тепличном комплексе. Нами отобраны 35 микросателлитных локусов, которые не имеют повторов на других хромосомах: 8 для хромосомы 2А, 7 для хромосомы 2В и по 10 для хромосом 5А и 5В.

При изучении полиморфизма локуса Xgwm312 хромосомы 2А у линий Dh-3-1-09, Dh-11-2-09 и Dh-12-1-09 выявлен фрагмент размером 189 п.н., у линии Dh-27-1-08-1 выявлялся дополнительный фрагмент размером 234 п.н.

Полиморфизм по локусу *Xbarc318* хромосомы 2В проявился в наличии фрагмента размером 284 п.н. у линий Dh-3-1-09, Dh-11-2-09 и Dh-27-1-08-1 и фрагмента 256 п.н. у линии Dh-12-1-09.

Анализ микросателлитных локусов хромосомы 5А выявил наличие полиморфизма по локусу *Xgwm156*, проявившееся в отсутствии фрагмента размером 321 п.н. Также обнаружен полиморфизм по локусу *Xgwm291*: у линий Dh 3-1-09 и Dh 27-1-08-1 детектировался фрагмент размером 137 п.н., тогда как у линий Dh 11-2-09 и Dh 12-1-09 обнаружен фрагмент размером 183 п.н.

Изучение полиморфизма микросателлитных локусов хромосомы 5В позволило выявить у исследуемых генотипов два полиморфных локуса. По локусу *Xgwm67* размер полученных фрагментов составил 118 п.н. для линий Dh-3-1-09, Dh-12-1-09, Dh-27-1-08-1 и 10 п.н. для линии Dh-11-2-09.

При анализе локуса *Xgwm 540* детектировались фрагменты размером 114 п.н. для линий Dh-3-1-09, Dh-12-1-09, Dh-27-1-08-1 и 125 п.н. для линии Dh-11-2-09, отсутствие у линии Dh-27-1-08-1 фрагмента размером 278 п.н., присутствующего у остальных исследуемых линий, и наличии у данной линии уникального фрагмента.

Полученные данные свидетельствуют о присутствии у изученных линий удвоенных гаплоидов, контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro*, межлинейного полиморфизма по 6-ти из 35 проанализированных микросателлитных локусов: *Xgwm312* хромосомы 2А, *Xbarc318* хромосомы 2В, *Xgwm156*и*Xgwm291* хромосомы 5А, *Xgwm67*и*Xgwm540* хромосомы 5В. Выявление межлинейного полиморфизма свидетельствует о возможности эффективного использования разработанных для пшеницы SSR-маркеров для исследования эмбриогенного потенциала тритикале.

С использованием ПЦР-анализа 35 SSR-локусов у исследованных линийтритикале выявлено

5 полиморфных маркерных локусов *Xgwm156*, *Xgwm291* (хромосома 5А); *Xgwm540*, (хромосома 5В); *Xgwm312* (хромосома 2А); *Xbarc318* (хромосома 2В). Обнаружена высокая степень корреляции между аллельным состоянием указанных микросателлитных локусов и эффективностью андрогенеза *in vitro* у гексаплоидного тритикале. Наиболее высокая корреляция (до 99%) наблюдалась для локусов *Xgwm291, Xgwm540* и *Xbarc318* и таких параметров андрогенеза *in vitro* как «выход растений-регенерантов», «частота регенерации зеленых растений», «частота регенерации альбиносных растений». Установлено, что гетерозиготное аллельное состояние исследуемых локусов, как правило, коррелирует с низкими значениями параметров андрогенеза *in vitro* у тритикале.

Для оценки наличия либо отсутствия связи между аллельным состоянием микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro* были рассчитаны линейные коэффициенты корреляции Пирсона (r-Пирсона). Выявлена корреляционная зависимость между аллельным состоянием исследуемых микросателлитных локусов и параметрами андрогенеза *in vitro*.

Таким образом, установлена высокая корреляция между аллельным состоянием ряда микросателлитных локусов, расположенных на хромосомах 2А, 2В, 5А, 5В и способностью к андрогенезу в культуре пыльников *in vitro* тритикале, а также показана возможность эффективного использования SSR-маркеров, разработанных на пшенице, для исследования эмбриогенного потенциала тритикале.

Следует отметить, что в популяциях F_2 тритикале, полученных в результате скрещивания контрастных по параметрам андрогенеза *in vitro* генотипов, преобладали формы с низкой отзывчивостью. При этом большую их часть составляли растения, у которых микросателлитные локусы находились в гетерозиготном состоянии. По-видимому, это связано с доминированием аллелей, обуславливающих низкую отзывчивость в культуре пыльников *invitro*, что значительно затрудняет преодоление проблемы низкого выхода эмбриоидов и растений-регенерантов у тритикале. Это необходимо учитывать при планировании комбинаций скрещиваний, заранее отсеивая генотипы с низкой отзывчивостью *in vitro*.

Несмотря на то, что исследованные микросателлитные локусы не являются генами, непосредственно отвечающими за эмбриогенез и регенерацию *invitro*, а только сцеплены с таковыми, полученная информация может быть применена для картирования искомых генов. При этом указанные локусы могут быть использованы в качестве маркеров для отбраковки низкоотзывчивых генотипов и получения высокоотзывчивых сортов и линий тритикале в культуре пыльников *in vitro*, что позволит существенно повысить эффективность данного метода.

HYBRIDIZATION BETWEEN HEXAPLOID TRITICALE AND SYNTHETIC WHEAT

Mehdiyeva S.P., Aminov N.Kh.

Genetic Resources Institute of ANAS
e-mail: mora-kasper@rambler.ru

We present here the results of hybridization and morphotype formation studies in the generated hybrid populations (F_1 – F_5) obtained from the cross between hexaploid triticale ABDR and synthetic wheat ABD and their comparision with other hybrid combinations derived by the employing of the same hexaploid triticale accession. Triticale ABR (genome AABBRR, 2n = 42) is locally produced in the Genetic Resources Institute of ANAS by the second author of this abstract in 1974 and was used in all crosses of current study as a female or maternal plant. This triticale differentiated from other triticales by its originating from hybridization between Kihara's synthetic wheat ABS (*T.durum* × *Ae. squarrosa,* genome AABBDD, 2n = 42) and *Secale cereale* ssp. *segetale* (genome RR, 2n = 14). The paternal synthetic wheat plant ABD [(*T.beoticum*× *Ae.taushii*) × *Ae.speltoides,* genome AADDSS, 2n = 42)], which is used in the cross to triticale ABDR, also have been locally produced in the Genetic Resources Institute of ANAS by the same author in 1982. Other employed paternal plants were presented by 3 botanical varieties of *T. aestivum* species*:* var. *lutescens* (cultivar Bezostaya 1, genome AABBDD, 2n = 42), var. *graecum* (local cultivar Grekum 75/50, genome AABBDD, 2n = 42), var. *velutinum* (genome AABBDD, 2n = 42) and by local Georgian wheat species *T. macha* Dek. et Men. (2n = 42, AABBDD). Field works including hybridization and phenotype analysis of hybrid populations within five generations carried out for a period of 6 years (2007-2013). The emasculation and pollination in the field were carried out during the months of April-May 2007. No embryo rescue or hormone treatment was applied for the production of F_0 seeds. Seeds (shriveled and weak) were obtained from all hybrid combinations, with the average seed set 17,82% ranging from 11,79% to 22,45% and average seed germination rate 36,15% ranging from 12,5% to 52,5%. The combination of ABDR with synthetic wheat ABD showed nearly the high seed set (22,37%) and germination rate equal to 45%. F_1 hybrids from all subjected crosses had a morphology that is intermediate between that of