

# Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России

И.Г. Адонина<sup>1</sup>, И.Н. Леонова<sup>1</sup>, Е.Д. Бадаева<sup>2</sup>, Е.А. Салина<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

Для характеристики геномов 20 сортов мягкой пшеницы, созданных в различных регионах России, были использованы молекулярно-генетический и молекулярно-цитологический подходы. Молекулярно-генетический анализ проводился с применением 29 SSR-маркеров, охватывающих весь геном, и 41 ISBP-маркера, локализованного на хромосоме 5B. Анализ генетического сходства, проведенный на основании результатов молекулярного генотипирования, показал, что озимые пшеницы образуют общий кластер независимо от происхождения и зоны возделывания. Это, в первую очередь, объясняется тем, что при создании озимых сортов для Западно-Сибирского региона привлекались формы, происходящие из европейской части России. Сравнительный анализ индивидуальных дендрограмм, построенных на основании данных по одному-двум маркерам на каждую хромосому и с привлечением большего числа маркеров по хромосоме 5B, позволяет, помимо оценки генетического разнообразия, идентифицировать сорта, имеющие перестройки по изучаемой хромосоме. Показана кластеризация озимой пшеницы Васса с яровым сортом Челябинска 75, что может быть косвенным подтверждением использования озимых форм в селекции для повышения потенциала продуктивности яровой пшеницы. В результате молекулярно-цитологического анализа методами C-бэндинга и FISH у 8 из 20 изученных сортов были выявлены различные хромосомные перестройки, в том числе интрогрессии, происходящие от *S. cereale*, *Ae. speltoides* и *Th. intermedium*. Таким образом, сочетание двух подходов позволило более полно охарактеризовать геномные особенности сортового материала мягкой пшеницы различного происхождения.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*; озимые и яровые сорта; генотипирование; SSR- и ISBP-маркеры; C-бэндинг; флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH).

## Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions

I.G. Adonina<sup>1</sup>, I.N. Leonova<sup>1</sup>, E.D. Badaeva<sup>2</sup>, E.A. Salina<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia  
<sup>2</sup> Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

We used molecular-genetic and molecular-cytology approaches to characterize the genomes of 20 varieties of wheat created in different regions of Russia. A molecular-genetic analysis was performed using 29 SSR-markers covering the entire genome, and 41 ISBP-markers localized on chromosome 5B. Analysis of genetic similarity based on the results of molecular genotyping showed that the winter wheat varieties form a common cluster, regardless of the origin or area of cultivation. This is primarily due to the fact that the varieties originating from the European part of Russia were used to establish winter wheat varieties for West Siberia. Comparative analysis of individual dendrograms constructed using 1–2 markers per chromosome, and with the involvement of a larger number of 5B-chromosome markers allowed us to identify varieties with rearrangements of this chromosome and to assess genetic diversity. We found that winter wheat Vassa and spring wheat Chelyaba 75 were clustered closely together. This is an indirect confirmation of the use of winter wheat varieties in the breeding to improve the productive potential of spring wheat. Molecular-cytology analysis by C-banding and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed various chromosomal rearrangements in 8 of 20 cultivars studied, including translocations from *S. cereale*, *Ae. speltoides* and *Th. intermedium*. Thus, a combination of the two approaches allowed us to better characterize genomes of wheat varieties of various origin.

Key words: *Triticum aestivum*; winter and spring varieties; genotyping; SSR- and ISBP-markers; C-banding; fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107

### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1): 44-50. DOI 10.18699/VJ16.107

ORIGINAL ARTICLE

Received 16.07.2015 г.

Accepted for publication 17.12.2015 г.

© AUTHORS, 2016

**М**ягкая или хлебная пшеница (*Triticum aestivum* L.) относится к наиболее важным зерновым культурам. На территории России возделываются как озимая, так и яровая пшеница. Озимые сорта выращиваются преимущественно в Центрально-Черноземной зоне, на Северном Кавказе, в Среднем и Нижнем Поволжье, характеризующихся умеренными морозами и хорошим снежным покровом. Однако в последнее время озимая пшеница активно продвигается в Уральский и Сибирский регионы.

Задачи, направленные на создание сортов, сочетающих устойчивость к вредным биотическим и абиотическим факторам с высокой продуктивностью, остаются актуальными на протяжении многих лет. В последние годы в селекционной практике все активнее используют современные биотехнологические подходы. К числу наиболее важных методов относится генотипирование культивируемых сортов и линий с помощью молекулярных маркеров. Оно проводится для детальной характеристики геномов сортов и гибридов с целью выявления районов хромосом, содержащих селекционно-ценные гены; мониторинга селекционных процессов, охраны авторских прав и защиты продукции растениеводства от возможных фальсификаций. При генотипировании пшеницы и ее гибридов можно использовать два подхода: 1) молекулярно-генетический, связанный с изучением геномной ДНК; 2) молекулярно-цитологический, основанный на сравнительном анализе структуры хромосом.

В настоящее время спектр маркеров, используемых для молекулярно-генетического анализа, очень обширен. Один из наиболее известных типов – SSR-маркеры (Simple Sequences Repeats, синоним – микросателлитные маркеры), которые используются для оценки генетического разнообразия пшеницы в последние два десятилетия (Plaschke et al., 1995; Huang et al., 2002; Khlestkina et al., 2004; Salem, Mattar, 2014). Инструментом массового анализа линий и сортов пшеницы является также использование маркеров SNP (Single Nucleotide Polymorphism), выявляющих однонуклеотидный полиморфизм (Würschum et al., 2013; Bonman et al., 2015). Благодаря бурному развитию технологий геномного секвенирования относительно недавно появился новый тип маркеров – ISBP- (Insertion Site-Based Polymorphism) маркеры (Paux et al., 2010). Разработка ISBP-маркеров основана на уникальности встраивания мобильных элементов в геномную ДНК пшеницы, благодаря чему ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих точку инсерции мобильного элемента, дает специфичный продукт амплификации определенной длины (Paux et al., 2010).

Молекулярно-цитологический анализ представляет собой индивидуальное маркирование метафазных хромосом и чаще всего включает в себя С-дифференциальное окрашивание (С-бэндинг) и флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) с различными зондами.

С-бэндинг позволяет идентифицировать все хромосомы мягкой пшеницы и многих ее сородичей (Gill et al., 1991; Friebe, Gill, 1996), а также выявлять транслокации и другие структурные хромосомные перестройки (Badaeva et al., 2007).

FISH органично дополняет С-бэндинг. Для идентификации индивидуальных хромосом мягкой пшеницы обычно используются пробы pSc119.2 и pAs1, которые позволяют идентифицировать 17 из 21 хромосомы (Schneider et al., 2003). По некоторым сайтам гибридизации с pSc119.2 и pAs1 наблюдается межсортовой полиморфизм (Schneider et al., 2003). На настоящий момент известна локализация проб pSc119.2 и pAs1 на хромосомах ряда других злаков. Кроме того, для идентификации хромосом пшеницы и чужеродных хромосом в геноме сортов и линий, полученных путем отдаленной гибридизации, были разработаны новые геном-специфичные зонды, такие как Spelt1 и Spelt52 (Salina et al., 2006a), Fat (Badaeva et al., 2010), pTa535 (Komuro et al., 2013).

Целью данной работы была оценка эффективности разных подходов и методов для генотипирования сортов и применения в селекционной практике.

## Материалы и методы

### Растительный материал

Для проведения сравнительного анализа геномного состава было отобрано 20 сортов мягкой пшеницы *T. aestivum*, различающихся по типу развития (яровой/озимый), полученных и районированных в разных регионах России (таблица). В качестве стандарта при проведении молекулярно-генетического и молекулярно-цитологического анализа использовался сорт мягкой пшеницы Chinese Spring.

### Выделение ДНК и SSR-анализ

Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). В работе были использованы SSR-маркеры Xgwm (Röder et al., 1998), Xtaglgap (Devos et al., 1995) с известной локализацией на хромосомах гексаплоидной пшеницы *T. aestivum*. Список SSR-маркеров, использованных в данной работе, приведен в Доп. материалах 1<sup>1</sup>. Процедура проведения полимеразной цепной реакции опубликована в работе Родер с коллегами (Röder et al., 1998). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, США). Размер фрагментов рассчитывали с помощью компьютерной программы ABI GeneScan (версия 2.1), разработанной компанией Applied Biosystems.

### ISBP-анализ

В ISBP-анализ были взяты маркеры, разработанные по результатам частичного пиросеквенирования хромосомы 5В мягкой пшеницы (Sergeeva et al., 2014) с использованием программы IsbpFinder (Paux et al., 2010). Список маркеров и их характеристика приведены в Доп. материалах 2. Процедуру touchdown-ПЦР проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Paux et al., 2006). Полиморфизм между сортами проявлялся в наличии или отсутствии фрагмента ПЦР, который выявляли электрофорезом в 1%-м агарозном геле.

<sup>1</sup> Дополнительные материалы 1, 2 см. в Приложении 1 по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2016-20/appx1.pdf>

#### Common wheat varieties studied

Variety	Growth habit	Originator	Chromosomal rearrangements*
Filatovka	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	Translocation 1RS.1BL
Biyskaya ozimaya	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 9	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 32	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 40	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Novosibirskaya 51	Winter	SRIPIB and ICG SB RAS	–
Kulundinka	Winter	ICG SB RAS	–
Bagrationovskaya	Winter	ICG SB RAS	–
Fisht	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocations 5BS.5GL and 6BS.6GL; chromosomal substitutions 1D/1Dt and 6D/6Dt
Vassa	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocation 1RS.1BL
Tanya	Winter	Krasnodar Luk'yanenko RIA	Translocation 1RS.1BL
Chelyaba 75	Spring	RIA, Chelyabinsk	Translocation 2DS.2SL
Bezenchukskaya 98	Spring	RIA, Samara	Pericentric inversion of chromosome 2B
Tulaikovskaya 100	Spring	RIA, Samara	Chromosomal substitution 6Ai/6D
Omskaya 23	Spring	SRIA, Omsk	
Pamyati Vavenkova	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 15	Spring	SRIPIB	Change of the C-banding pattern of 5B(L)
Novosibirskaya 29	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 31	Spring	SRIPIB	
Novosibirskaya 44	Spring	SRIPIB	

\* Identified by C-banding and FISH.

ICG SB RAS, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk; SRIPIB, Siberian Research Institute of Plant Industry and Breeding – филиал ИЦиГ СО РАН (Novosibirsk oblast, Krasnoobsk); SRIA, Siberian Research Institute of Agriculture, Omsk; RIA, Research Institute of Agriculture.

#### Кластерный анализ

Данные SSR- и ISBP-анализа были использованы для исследования генетического сходства сортов. При помощи пакета программ PHYLIP (Version 3.69) (Felsenstein, 2006) были определены генетические расстояния для каждой пары образцов по Нею (Nei, Li, 1979). Построение дендрограмм выполнено по методу UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) (Sokal, Rohlf, 1995). Для оценки достоверности построенных деревьев проводили бутстреп (bootstrap) анализ для 100 повторностей с помощью программы SEQBOOT (Felsenstein, 2006).

#### С-дифференциальное окрашивание (С-бэндинг)

С-бэндинг проводили по ранее опубликованной методике (Badaeva et al., 1994). Препараты анализировали при помощи микроскопа Leitz Wetzlar. Для получения изображений использовали цифровую камеру CCD Leica DFC 280. Хромосомы классифицировали в соответствии со стандартной номенклатурой (Badaeva et al., 1990; Gill et al., 1991).

#### Флуоресцентная *in situ* гибридизация

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina

et al., 2006a). Для идентификации хромосом использовали меченые с помощью реакции ник-трансляции пробы: pSc119.2 (мономер 120 п.н., повтор выделен из генома ржи) (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (мономер 336 п.н., повтор выделен из генома *Aegilops tauschii* Coss.) (Rayburn, Gill, 1986). Дополнительно была проведена геномная *in situ* гибридизация (GISH) с ДНК ржи (*Secale cereale* L.) и пырея (*Thinopyrum intermedium* (Host) = *Agropyron intermedium* (Host)) и гибридизация с зондом Spelt1 (мономер 178 п.н.), повтор выделен из генома *Aegilops speltoides* Tausch. (Salina et al., 2004).

Зонды метили биотином или дигоксигенином. Детекция биотинилированных зондов осуществлялась с помощью авидина, конъюгированного с флуоресцеином (Fluorescein Avidin D, Vector Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>). Сигнал гибридизации усиливался с применением флуоресцеин анти-авидина (Fluorescein Anti-Avidin D, Vector Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>). Зонды, меченные дигоксигенином, выявляли с помощью антител к дигоксигенину, конъюгированных с родамином (Antidigoxigenin-rhodamine, Fab fragments, Sigma-Aldrich, США) (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Препараты заключали в среду, замедляющую выцветание флуоресценции (Vectashield mounting medium, Vector

Laboratories, США) (<http://vectorlabs.com>), содержащую 0,5 мкг/мл DAPI (4',6-diamидино-2-фенилиндол, Sigma-Aldrich, США) (<http://www.sigmaaldrich.com>), для окрашивания хромосом и анализировали с помощью микроскопа «Аxioskop» 2 Plus (Zeiss, Германия). Изображение регистрировалось CCD-камерой VC-44 (PCO).

Работа выполнена на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов СО РАН.

## Результаты

### Молекулярно-генетический анализ

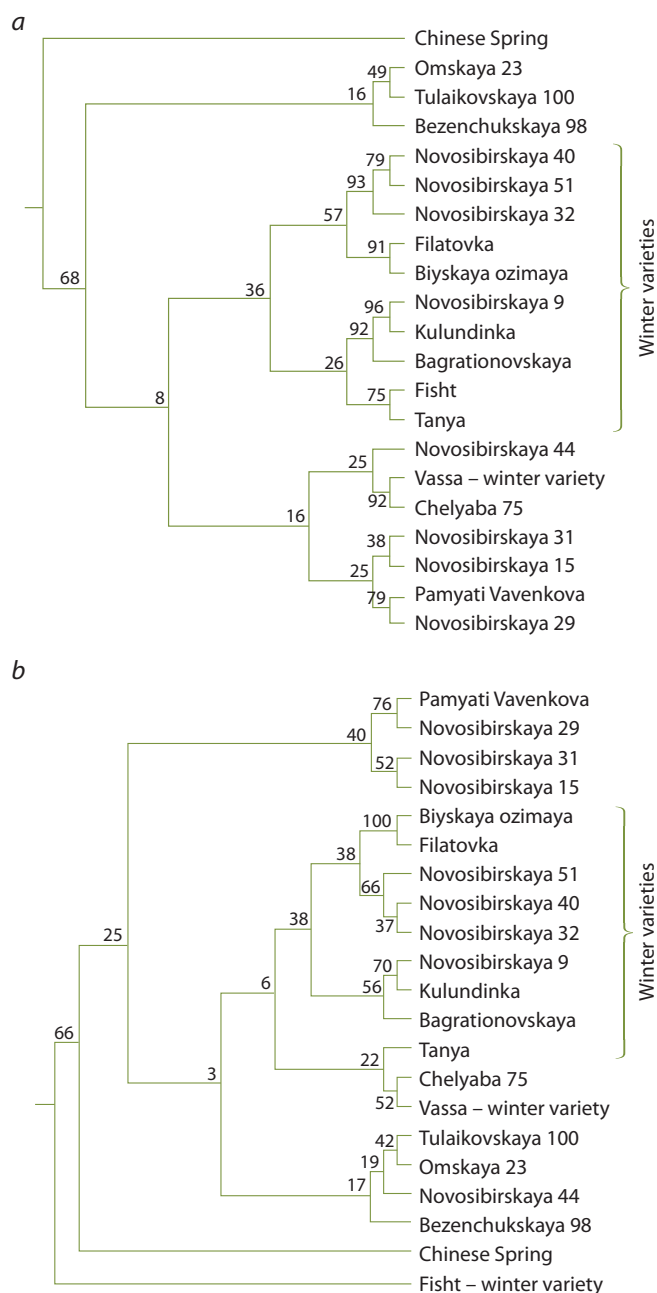
SSR-анализ с использованием 29 маркеров, охватывающих все хромосомы мягкой пшеницы (см. Доп. материала 1), выявил у изучаемых сортов 162 аллеля.

В отличие от SSR-маркеров, для каждого из которых обнаружено от двух (маркеры Xgwm192c, 192b, 1154) до 10 (маркер Xgwm619) аллелей, полиморфизм по ISBP-маркеру заключается только в наличии или отсутствии конкретного фрагмента амплификации. В ISBP-анализ был взят 41 маркер (см. Доп. материалы 2), разработанный для хромосомы 5В мягкой пшеницы (11 для короткого плеча и 30 для длинного). По результатам молекулярно-генетического анализа были построены дендрограммы, отражающие генетическое сходство сортов (рис. 1, а, б). Одна дендрограмма построена на основании данных только SSR-анализа (рис. 1, а), вторая – с учетом суммарных результатов SSR- и ISBP-анализов (рис. 1, б). Сравнительный анализ дендрограмм выявил общие закономерности. В обоих случаях сорта объединяются в крупные кластеры, к одному из которых относятся озимые пшеницы независимо от их происхождения, к другим – яровые. Яровые сорта в свою очередь делятся на два основных кластера. В одном из них представлены сорта главным образом новосибирской селекции, а другой объединил в себе остальные яровые пшеницы. При этом, по данным SSR- и ISBP-анализов, наблюдаются различия по сортам, входящим в субкластеры, что, видимо, отражает различный уровень дивергенции сортов по отдельным хромосомам в районах локализации маркеров. Контрольный сорт Chinese Spring отделяется от остальных сортов на обеих дендрограммах. На дендрограмме, построенной с учетом результатов SSR- и ISBP-анализов (рис. 1, б), сорт Фишт также образует отдельную ветвь.

### Цитогенетический анализ

Проведено индивидуальное маркирование метафазных хромосом 20 сортов мягкой пшеницы методами С-бэндинга и *in situ* гибридизации с зондами pSc119.2 и pAs1. Дополнительно были проведены геномная *in situ* гибридизация с ДНК ржи и пырея и гибридизация с зондом Spelt1. Хромосомные перестройки выявлены у восьми из 20 изученных сортов (рис. 2).

Транслокация 1RS.1BL от ржи выявлена у сортов Филатовка, Тая и Васса (рис. 2, а). Челябинка 75 имеет транслокацию 2DS.2SL от *Ae. speltoides* (рис. 2, е). Тулайковская 100 несет хромосому пырея (хромосомное замещение 6Ai/6D) (рис. 2, ж). Наибольшее число хромосомных перестроек выявлено у сорта Фишт, это транслокации 5BS.5GL (рис. 2, в) и 6BS.6GL (рис. 2, з), хромосомные замещения



**Fig. 1.** Dendrogram illustrating the genetic similarity between varieties of wheat according to the data of (a) SSR marker analysis and (b) SSR and ISBP marker analysis.

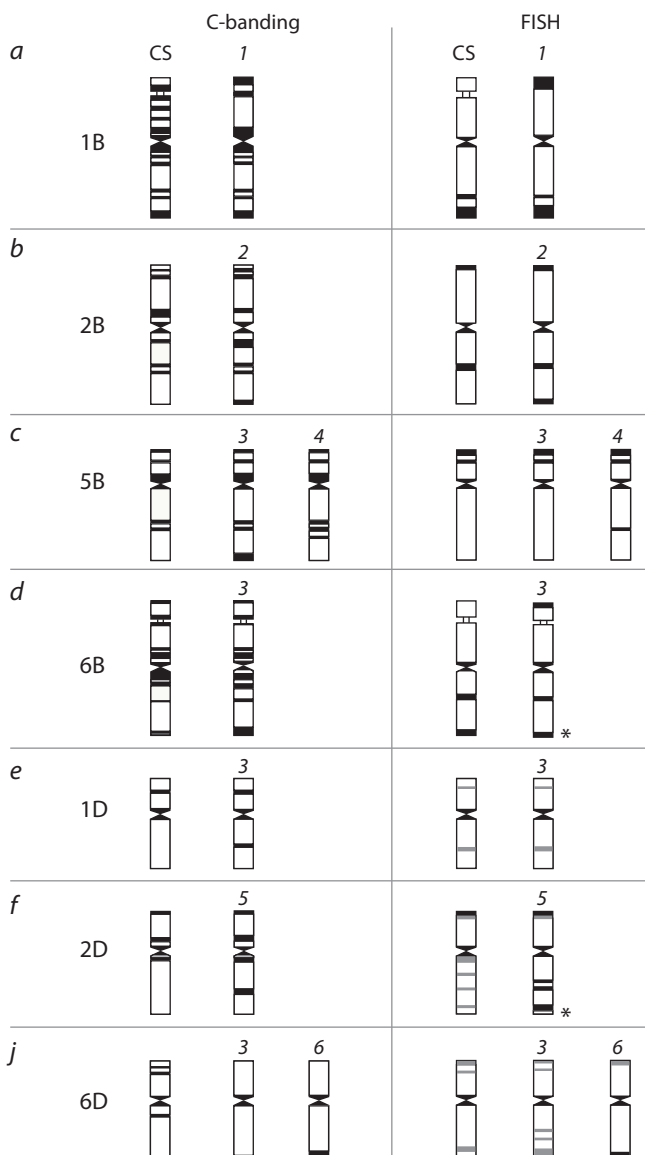
Bootstrap values are displayed above the branches.

1D/1Dt (рис. 2, д), 6D/6Dt (рис. 2, ж). В сорте Безенчукская 98 идентифицирована периферическая инверсия хромосомы 2В (рис. 2, б), а для сорта Новосибирская 15 выявлены изменения расположения С-бэндов на длинном плече хромосомы 5В (рис. 2, в).

### Обсуждение

Анализ родословных 91 сорта яровой мягкой пшеницы, перечисленных в «Каталоге районированных сортов сельскохозяйственных культур в Российской Федерации» (1992), показывает, что на долю сортов, созданных на





**Fig. 2.** Caryogram illustrating chromosomal rearrangements identified by C-banding and FISH in common wheat varieties used in the present study.

CS, Chinese Spring; 1, Filatovka, Tanya, Vassa; 2, Bezenchuskaya 98; 3, Fisht; 4, Novosibirskaya 15; 5, Chelyaba 75; 6, Tulaikovskaya 100. Black bands indicate sites of hybridization with the pSc119.2 probe; gray bands, with the pAs1 probe in the FISH section. Hybridization sites with the Spelt1 probe are indicated with asterisks.

основе гибридизации, приходится 95,6 % (Зыкин, 2001). Таким образом, основным методом создания сортов является рекомбинационная селекция, в основе которой лежит гибридизация с последующим отбором. По теории селекции родительские формы, выбираемые для скрещивания, должны отвечать следующим основным требованиям: 1) отдаленность по эколого-географическому происхождению; 2) генетическая разнокачественность; 3) комбинационная способность, т. е. успешность в передаче положительных свойств потомкам; 4) являться носителями тех или иных признаков и свойств (Шаманин, 2006). Кроме того, поскольку ограниченное число исходных форм сузило генетическое разнообразие мягкой пшеницы, в настоящее время для его увеличения и в качестве

источников эффективных генов устойчивости к патогенам используются сородичи пшеницы – дикие и культурные виды злаков. Одними из наиболее удачных и используемых в селекции являются транслокации короткого плеча хромосомы 1R ржи в хромосому 1A либо 1B пшеницы (Lukaszewski, 1990). Довольно интенсивно в гибридизацию вовлекаются различные виды пырея (Синниговцев, 1976; Sibikeev et al., 1995; Friebe et al., 1996). Достаточно часто в качестве доноров полезных генов выступают виды рода *Aegilops* (Friebe et al., 1996; Schneider et al., 2008).

В подборе родительских форм, контроле селекционного процесса и качества сортового материала значительную помощь селекционерам может оказать молекулярная генетика с ее обширным арсеналом маркеров.

Для генетической паспортизации сортов пшеницы, а также характеристики межсортовых замещений и рекомбинации генетического материала мягкой пшеницы наиболее подходящими являются маркеры индивидуальных локусов, картированные на хромосомах. В настоящий момент для анализа генома пшеницы часто используют SSR-, ISBP- и SNP-маркеры (Paux et al., 2012). SSR-маркеры отличает большое число аллелей в одном локусе, в то время как ISBP и SNP являются биаллельными. Они также различаются по частоте встречаемости в геноме: один SSR-маркер на 10 000 п. н.; один ISBP на 5 400 п. н.; один SNP на 99 п. н. (Paux et al., 2012).

В нашей работе для генотипирования сортов мягкой пшеницы, созданных в различных регионах России, использовали как мультиаллельные SSR-, так и биаллельные ISBP-маркеры. SSR-маркеры охватывают весь геном, при этом на каждую хромосому приходится один-два маркера (см. Доп. материалы 1). ISBP-маркеры локализованы на одной хромосоме 5B, их число достигает 41 (см. Доп. материалы 2). Сравнительный анализ дендрограмм, построенных с близким числом маркеров на каждую хромосому (см. рис. 1, а) и с привлечением дополнительно более обширного числа маркеров по одной из хромосом (см. рис. 1, б), показал, что увеличение числа маркеров позволяет помимо оценки генетического разнообразия сортов в целом идентифицировать сорта с перестройками по изучаемой хромосоме. Так, на дендрограмме, построенной по данным SSR-анализа (см. рис. 1, а), сорт Фишт лежит внутри кластера озимых сортов, а на второй дендрограмме (см. рис. 1, б) он выделяется в обособленный кластер. Это объясняется тем, что данный сорт несет транслокацию 5BS.5GL от *Triticum miguschovae* [*Triticum militinae* (A<sup>1</sup>A<sup>1</sup>GG) × *Aegilops tauschii* (DD)] Zhir (Davoyan, et al., 2015) (рис. 2, в), что выявляется при расширении числа маркеров на данную хромосому.

По результатам анализа генетического сходства, проведенного с помощью как SSR-, так и SSR-маркеров совместно с ISBP-маркерами, озимые пшеницы образуют общий большой кластер независимо от места получения сорта. Это, по-видимому, связано с тем, что в селекции озимой пшеницы в Сибири использовались сорта из европейской части России. Так, например, Краснодарская 39 присутствует в родословных таких сибирских сортов, как Филатовка, Новосибирская 40 и Новосибирская 51. Новосибирская 32 получена от озимой пшеницы Аврора (краснодарская селекция). При создании Бийской озимой про-

водилось скрещивание с известнейшим кубанским сортом Безостая 1. Только в одном случае озимый сорт (Васса) кластеризуется вместе с яровым (Челяба 75). При этом, как показано на рис. 1, б, они попадают в общий кластер озимых сортов, на рис. 1, а они оказываются в кластере яровых сортов новосибирской селекции. Объяснением этому может служить тот факт, что один из принципов подбора пар для скрещивания основан на эколого-географических различиях между родителями с целью объединения положительных признаков разных экотипов в новом сорте (Шаманин, 2006). Одним из примеров успешного применения описываемого принципа подбора пар для скрещиваний является использование озимых форм для повышения потенциала продуктивности яровой пшеницы (Рутц, 2004).

Другой подход, использованный нами для характеристики сортов, молекулярно-цитологический, связан со сравнительным анализом структуры хромосом. Следует особо подчеркнуть, что методы хромосомного маркирования позволяют преодолеть трудности, возникающие при использовании молекулярно-генетических маркеров, выявляемых на основе ПЦР и секвенирования. Прежде всего, использование молекулярно-цитологических маркеров (методы дифференциального окрашивания, гибридизация *in situ*) позволяет эффективно выявлять различные хромосомные перестройки, такие как внутригеномные транслокации, инверсии, образование изохромосом и моносомиков, делеции и т.д. Чужеродные интрогрессии также успешно определяются методами GISH, FISH и дифференциального окрашивания. Низкая эффективность идентификации чужеродных интрогрессий с помощью молекулярно-генетических маркеров объясняется тем, что маркеры разрабатываются обычно для генома мягкой пшеницы, и их присутствие в геноме дикорастущих видов злаков снижается на 50–99 % (Salina et al., 2006b).

Молекулярно-цитологический анализ изученных нами сортов пшеницы выявил иные их особенности, нежели молекулярно-генетический анализ. Так, например, сорта Васса и Челябинка 75 на обеих дендрограммах, построенных по данным молекулярно-генетического анализа, кластеризуются вместе, причем с достаточно высокими значениями бутстрепа, в то время как молекулярно-цитологический анализ показал значительные различия между этими сортами. Сорт Челябинка 75 создан при использовании линий с комплексной устойчивостью, полученных в ВИР с участием *Ae. speltoides* (Одинцова и др., 1991); по данным проведенного нами исследования, он несет транслокацию 2DS.2SL от *Aegilops* (рис. 2, е). У сорта Васса выявлена пшенично-ржаная транслокация 1RS.1BL (рис. 2, а). У сортов Филатовка и Тяня также обнаружена транслокация 1RS.1BL, что никак не сказывается на их местоположении на дендрограммах. С другой стороны, сорт Бийская озимая, не несущая транслокации 1RS.1BL, на обеих дендрограммах кластеризуется вместе с сортом Филатовка с очень высоким значением бутстрепа. Сорта Тулайковская 100 и Омская 23 также группируются вместе, несмотря на присутствие в геноме сорта Тулайковская 100 целой чужеродной хромосомы (6A1 от пырея), заместившей хромосому 6D (Salina et al., 2015). Даже сорт Фишт, характеризующийся множественными транслокациями от *T. miguschovae*, по результатам микро-

сателлитного анализа, объединяется с высоким значением бутстрепа с сортом Тяня, у которого не обнаружено никаких значительных хромосомных перестроек, кроме транслокации 1RS.1BL.

Молекулярно-цитологический анализ позволяет в ряде случаев выявлять неоднородность сортов. Так, транслокация 1RS.1BL от ржи присутствовала не у всех растений сортов Тяня и Филатовка. Причем родословная сорта Филатовка напрямую не включает источник ржаного хроматина, следовательно, обнаружение транслокации 1RS.1BL у отдельных растений данного сорта может являться результатом случайной спонтанной гибридизации. Следует отметить, что при проведении молекулярно-цитологического анализа именно сочетание двух подходов, С-бэндинга и FISH, позволило получить наиболее четкое представление о структурных хромосомных перестройках, имевших место при создании того или иного сорта. Так, например, перичентрическая инверсия хромосомы 2B у сорта Безенчукская 98 (рис. 2, б), транслокации 5BS.5GL (рис. 2, в), 6BS.6GL (рис. 2, з) и хромосомное замещение 1D/1Dt (рис. 2, д) у сорта Фишт определяются только методом С-дифференциального окрашивания. С другой стороны, выявляемое FISH присутствие блока повтора Spelt1 на длинном плече транслоцированной хромосомы 6BS.6GL у сорта Фишт свидетельствует о неполном замещении длинного плеча хромосомы 6B на плечо хромосомы 6G, поскольку ни у одного из исследованных до настоящего времени образцов пшениц группы Timopheevi сайты гибридизации со Spelt1 на длинном плече 6G-хромосомы не обнаружены, зато такие сайты имеются у некоторых сортов мягкой пшеницы (Salina et al., 2006a).

Таким образом, благодаря сочетанию двух подходов мы смогли получить более полную характеристику особенностей генотипов мягкой пшеницы разного происхождения. Молекулярно-цитологический анализ выявил различные хромосомные перестройки, а также чужеродные интрогрессии; молекулярно-генетический анализ позволил оценить сходство генетического материала мягкой пшеницы в представленных сортах.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Dr. M. Röder (IPK, Gatersleben, Germany), who generously provided us the SSR primers. They also acknowledge Dr. Bildanova's help in choosing ISBP-markers.

The study was done as part of the State Budgeted Program, project 0324-2015-0005, and supported by the Russian Foundation for Basic Research, project 14-04-00297.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 1994;192:117-145. DOI 10.1007/BF00985912
- Badaeva E.D., Dedkova O.S., Gay G., Pukhalskiy V.A., Zelenin A.V., Bernard S., Bernard M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome.* 2007;50:907-926. DOI 10.1139/G07-072
- Badaeva E.D., Zoshchuk S.A., Paux E., Gay G., Zoshchuk N.V., Röger D., Zelenin A.V., Bernard M., Feuillet C. Fat element – a new

- marker for chromosome and genome analysis in the Triticeae. Chromosome Res. 2010;18:697-709. DOI 10.1007/s10577-010-9151-x
- Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2
- Bonman J.M., Babiker E.M., Cuesta-Marcos A., Esvelt-Klos K., Brown-Guedira G., Chao S., See D., Chen J., Akhunov E., Zhang J., Bockelman H.E., Gordon T.S. Genetic diversity among wheat accessions from the USDA National Small Grains Collection. Crop Sci. 2015;55(3):1243-1253. DOI 10.2135/cropsci2014.09.0621
- Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Bespalova L.A., Puzirnyaya O.Y. Use of the synthetic form *Triticum miguschovae* for common wheat improvement. Proc. of the 3<sup>rd</sup> Intern. Conf. «Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology». PlantGen 2015. Novosibirsk, 17-21 June. 2015.
- Devos K.M., Bryan G.J., Collins A.J., Gale M.D. Application of two microsatellite sequences in wheat storage proteins as molecular markers. Theor. Appl. Genet. 1995;90:247-252.
- Felsenstein J. PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.66). 2006. Available from: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>.
- Friebe B., Gill B.S. Chromosome banding and genome analysis in diploid and cultivated polyploid wheats. Methods in Genome analysis in Plants. Boca Raton: CRC Press, 1996:39–60.
- Friebe B., Yang J., Raupp W.J., McIntosh A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87. DOI 10.1007/BF00035277
- Gill B.S., Friebe B., Endo T.R. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*). Genome. 1991;34:830-839. DOI 10.1139/g91-128
- Huang X.Q., Börner A., Röder M.S., Ganal M.W. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 2002;105:699-707. DOI 10.1007/s00122-002-0959-4
- Katalog rayonirovannykh sortov selskokhozyaystvennykh kultur v Rossiyskoy Federatsii. T. 1. [Catalog of zoned varieties agricultural crops in the Russian Federation. V.1. Moscow, Russian State Commission for variety testing of agricultural crops under the Ministry of Agriculture of the Russian Federation, 1992.
- Khlestkina E.K., Röder M.S., Efremova T.T., Börner A., Shumny V.K. The genetic diversity of old and modern Siberian varieties of common spring wheat as determined by microsatellite markers. Plant Breed. 2004;123:122-127. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00934.x
- Komuro S., Endo R., Shikata K., Kato A. Genomic and chromosomal distribution patterns of wheat with resistance to leaf rust revealed by a fluorescence *in situ* hybridization procedure. Genome. 2013;56:131-137. DOI 10.1139/gen-2013-0003
- Lukaszewski A.J. Frequency of IRS.1AL and IRS.1BL translocations in United States wheats. Crop Sci. 1990;30:1151-1153. DOI 10.2135/cropsci1990.0011183X003000050041x
- Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1979; 76:5269-5273.
- Odintsova I.G., Agafonova N.A., Boguslavskiy R.L. Introgressivnyye linii myagkoy pshenitsy s ustoychivostyu k buroy rzhavchine, peredannyi ot *Aegilops speltoides*. Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii [Introgression lines of wheat with resistance to leaf rust transferred from *Aegilops speltoides*. Bulletin of Applied Botany, of Genetics and Plant Breeding]. Leningrad, VIR, 1991;142:106-110.
- Paux E., Faure S., Choulet F., Röger D., Gauthier V., Martinant J.P., Sourdille P., Balfourier F., Le Paslier M-C., Chauveau A., Cakir M., Gandon B., Feuillet C. Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. Plant Biotechnol. 2010;8:196-210. DOI 10.1111/j.1467-7652.2009.00477.x
- Paux E., Röger D., Badavaeva E., Gay G., Bernard M., Sourdille P., Feuillet C. Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. Plant J. 2006;48:463-474. DOI 10.1111/j.1365-313X.2006.02891.x
- Paux E., Sourdille P., Mackay I., Feuillet C. Sequence-based marker development in wheat: Advances and applications to breeding. Biotechnol. Adv. 2012;30:1071-1088. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.09.015
- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007. DOI 10.1007/BF00223912
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. Plant. Mol. Biol. Rep. 1986;4:102-109. DOI 10.1007/BF02732107
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. Genetics. 1998; 149:2007-2023.
- Rutic R.I. Istoriya razvitiya selektsionnoy raboty i sorta selskokhozyaystvennykh kultur Sibirskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta selskogo khozyaystva [The history of breeding and crop varieties of the Siberian Research Institute of Agriculture]. Novosibirsk, Jupiter, 2004.
- Salem Kh.F.M., Mattar M.Z. Genetic diversity in old and modern Egyptian bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties revealed by simple sequence repeats Egypt. J. Genet. Cytol. 2014;43:143-156.
- Salina E.A., Adonina I.G., Badavaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat T.M.L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. Euphytica. 2015;204(1):91-101. DOI 10.1007/s10681-014-1344-5
- Salina E., Adonina I., Vatolina T., Kurata N. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch and related species. Genetica. 2004;122:227-237. DOI 10.1007/s10709-004-5602-7
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T., Röder M.S. Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization. Funct. Integr. Genomics. 2006b;6:71-80. DOI 10.1007/s10142-005-0001-4
- Salina E.A., Lim Y.K., Badavaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. Genome. 2006a;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* (goat-grass) species to widen the genetic diversity of cultivated wheat. Euphytica. 2008;163:1-19. DOI 10.1007/s10681-007-9624-y
- Sergeeva E.M., Afonnikov D.A., Koltunova M.K., Gusev V.D., Miroshnichenko L.A., Vrána J., Kubaláková M., Poncet C., Sourdille P., Feuillet C., Doležel J., Salina E.A. Common wheat chromosome 5B composition analysis using low-coverage 454 sequencing the plant genome. Plant Genome. 2014;7(2):1-16. DOI 10.3835/10.0031
- Shamanin V.P. Obschchaya selektsiya i sortovedenie polevykh kul'tur: uchebnoe posobie [General selection and creation of varieties of field crops: a manual]. Omsk: Omsk State Agrarian University Publ., 2006.
- Sibikeev S.N., Voronina S.A., Krupnov V.A. Genetic control for resistance to leaf rust in wheat-*Agropyron* lines: Agro 139 and Agro 58. Theor. Appl. Genet. 1995;90(5):618-620. DOI 10.1007/BF00222124
- Sinigovec M.E. Transfer of resistance to rust from wheat grass to the wheat by the addition and replacement of chromosomes. Genetika=Genetics (Moscow). 1976;12(9):13-20.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. Biometry. Ed. W.H. Freeman. N.Y., 1995.
- Würschum T., Langer S.M., Longin C.F.H., Korzun V., Akhunov E., Ebmeyer E., Schachschneider R., Schacht J., Kazman E., Reif J.C. Population structure, genetic diversity and linkage disequilibrium in elite winter wheat assessed with SNP and SSR markers. Theor. Appl. Genet. 2013;126:1477-1486. DOI 10.1007/s00122-013-2065-1
- Zikin V.A. Gibrizatsiya – osnova rekombinatsionnoy selektsii rasteniy: metod. rekomendatsii [Hybridization – the Basis of Recombination Breeding of Plants: Method. Recommendations]. Ufa, BNIISKH Publ., 2001.