

УДК 576.354.4:575.222.73

ИНТРОГРЕССИЯ ХРОМАТИНА РЖИ В ГЕНОМ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ: ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

© 2014 г. О.Г. Силкова¹, Д.Б. Логинова¹, Ю.Н. Иванова (Кабаненко)¹,
Е.Б. Бондаревич², Л.А. Соловей², Т.И. Штык², Н.И. Дубовец²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: silkova@bionet.nsc.ru;

² Государственное научное учреждение Институт генетики и цитологии
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: nadezhdadubovets@gmail.com

Поступила в редакцию 26 сентября 2014 г. Принята к публикации 20 октября 2014 г.

Интрогрессия чужеродного хроматина в геном мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. является наиболее эффективным способом обогащения генофонда этой культуры. Для повышения селекционно ценных свойств пшеницы в качестве источника признаков используется рожь *Secale cereale* L. Передача генетического материала ржи имеет свои особенности. Объединение геномов двух злаков в одном ядре приводит к дисбалансу в работе всех генетических систем. Формирование новых интрогрессивных форм начинается с восстановления фертильности амфигаплоидов, а затем сопровождается реорганизацией гибридного генома, во время которой достигается цитологическая и генетическая стабильность у диплоидных потомков. В данной работе собраны и проанализированы результаты, полученные при изучении двух этапов реорганизации пшенично-ржаного генома: 1) преодоление стерильности гибридов F₁ (цитогенетические механизмы образования нередуцированных гамет); 2) реорганизация субгеномов пшеницы при интрогрессии единичных хромосом ржи.

Ключевые слова: пшенично-ржаные гибриды, цитогенетика, FISH, иммуноокрашивание, С-окрашивание, реорганизация геномов, мейотическая реституция, модификация хромосом.

ВВЕДЕНИЕ

История интрогрессии генетического материала ржи в геном мягкой пшеницы насчитывает более 100 лет. В 1891 г. немецким селекционером Rimpau было описано 12 растений, выращенных из завязавшихся зерновок на полученном им пшенично-ржаном гибриде, которые принято считать первыми тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack) (Rimpau, 1891). Спонтанные тритикале с высокой плодовитостью были обнаружены в конце 1920-х годов в Саратове в богатом материале пшенично-ржаных гибридов. Растения имели «промежуточные» признаки и описаны Г.К. Мейстером как новый ботанический вид «*Triticum Secalotriticum saratoviense* Meister» (Левитский, 1978а). Ци-

тологический анализ тритикале, созданных в России и Германии, показал, что соматический набор хромосом растений равен 56 (Мюнтцинг, 1963; Левитский, 1978б). Таким образом, геном новой культуры объединил геномы пшеницы и ржи AABBDDRR.

Тритикале оказались привлекательным объектом для селекционеров благодаря повышенному иммунитету к фитопатогенам, устойчивости к неблагоприятным факторам среды и более высоким продуктивным качествам. Однако новая культура была несовершенна из-за своей низкой озерненности и фенотипической неоднородности (Писарев, 1964). Были предприняты попытки в получении более перспективных форм, которыми оказались гексаплоидные тритикале, в результате чего достигнуты определенные

успехи. Первичные гексаплоидные тритикале с геномным составом AABBRR создавались путем скрещивания тетраплоидных видов пшениц (*T. turgidum* L., *T. durum*) с рожью *S. cereale* L. Однако они характеризовались низкой озерненностью, щуплостью зерен, поздними сроками созревания. Для улучшения этих агрономически важных признаков для зерновой культуры расширялся генофонд тритикале: в скрещивания вовлекались октоплоидные формы и сорта мягкой пшеницы. Вторичные гексаплоидные формы имели улучшенные агрономические характеристики и получили широкое использование в качестве новой сельскохозяйственной культуры. Именно этот тип плоидности имеют все созданные к настоящему времени коммерческие сорта, возделываемые в Польше, Беларуси, Германии, Франции, Австралии, Китае (Mergoum *et al.*, 2009). Геномный состав тритикале характеризуется D(A), D(B) и D(R) замещениями либо транслокациями, которые влияют на повышение качества хозяйственно ценных признаков (Дубовец и др., 1995; Леонова и др., 2005; Mergoum *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2012).

Поиск причин пониженной плодовитости первичных октоплоидных и гексаплоидных тритикале и фенотипической неоднородности их популяций способствовал началу изучения цитогенетики пшенично-ржаных гибридов в разных странах (Хвостова и др., 1972; Weimarck, 1974; Шкутина, 1977; Shchapova *et al.*, 1984; Щапова, Кравцова, 1990). Цитологические исследования показали, что растения, имеющие отличия по фенотипу, чаще всего являются анеуплоидами. В популяциях тритикале с низкой озерненностью также обнаружены анеуплоиды с числом хромосом от 54 до 58, что могло быть вызвано мейотической нестабильностью. Ранее цитологические исследования, проводимые в Саратове в 1930-х годах, показали нарушения мейоза у всех имевшихся в то время константных тритикале (Левитский, 1978б). В лаборатории цитогенетики ИЦиГ СО АН СССР (1963–1975) был проведен детальный анализ мейоза у *Triticale* ($2n = 42$ и $2n = 56$) (Шкутина, 1977) и неполных пшенично-пырейных амфидиплоидов ($2n = 56$) (Хвостова и др., 1972). У всех изученных форм была нарушена конъюгация хромосом. Униваленты являлись

результатом десинапсиса, что было выяснено при изучении диакинеза, во время которого происходило преждевременное исчезновение хиазм между бивалентами.

Таким образом, при введении генетического материала ржи в культурные сорта пшеницы путем добавления целых геномов к полному хромосомному набору не были получены ожидаемые результаты. Отсутствие генетической и цитологической стабильности у первичных октоплоидных и гексаплоидных амфидиплоидов и связанная с этим невозможность получить ожидаемые результаты от новой зерновой культуры вызвали развитие нового направления в хромосомной инженерии пшеницы. Был взят курс на получение форм пшеницы с небольшим количеством генетического материала ржи: пшенично-ржаных дополненных, замещенных, транслоцированных линий (Голубовская, 1971; Щапова, Кравцова, 1990; Першина, 2014). Эти работы внесли большой вклад в генетику пшеницы и в разработку единой номенклатуры хромосом в подтрибе Triticeae (Sears, 1952, 1954), однако линии не использовались непосредственно в селекции по тем же причинам, что и амфидиплоиды. Успех многочисленных сортов со спонтанно включенными транслокациями 1RS.1BL и 1RS.1AL (Lukaszewski, 1990; Villareal *et al.*, 1998; Mater *et al.*, 2004) не был повторен. Линии пшеницы с чужеродной интрогрессией в виде замещений и модификаций хромосом стали включать в селекционные программы в качестве промежуточных форм.

Ранее на основе большого количества данных, полученных в экспериментах Г.Д. Карпеченко было показано, что «для того, чтобы гамета была способной к участию воспроизведения потомства, или зигота была способна к развитию, они должны обладать не только определенной цитологической, но и генетической конституцией» (Карпеченко, 1971. С. 82). Эти выводы впоследствии получили подтверждение. С появлением новых методов и подходов в изучении геномов растений тритикале как эволюционно «молодая» культура, родительские формы которой имеются в доступном пользовании, является значимым объектом исследования эволюционных механизмов видообразования (Voylovokov, Tikhenko, 2002). Стали доступны знания о механизмах

реорганизации и стабилизации гибридных геномов (Дубовец и др., 2008; Ma, Gustafson, 2008). После объединения в одном ядре геномов пшеницы и ржи происходят генетические и эпигенетические изменения. Однако они идут интенсивнее и быстрее, чем у других аллополиплоидов, в основном это касается генома ржи, что, в первую очередь, приводит к элиминации последовательностей ДНК (Ma *et al.*, 2004; Ma, Gustafson, 2006). Существует немного информации о природе изменений генома, которые требуются для успешного видообразования посредством аллополиплоидии. В особенности это касается механизмов, с помощью которых несколько геномов добиваются гармоничного сосуществования в одном и том же ядре (генетическая диплоидизация), и механизмов, вызывающих быструю дифференциацию гомеологичных хромосом, при которой отсутствует возможность для спаривания в мейозе и рекомбинации (цитологическая диплоидизация). Механизмы генетической диплоидизации способны запускать генный сайленсинг в основном через метилирование ДНК, элиминацию удвоенных генов или активацию генов, которые обычно молчат на диплоидном уровне, а цитологическая диплоидизация может включать элиминацию последовательностей ДНК, которая, возможно, вовлечена в поиск гомологов и инициацию спаривания в мейозе (Feldman, Levy, 2005; Ma, Gustafson, 2005).

Несмотря на трудности в передаче хромосом ржи в геном пшеницы, большой потенциал генетической изменчивости этого вида остается востребованным. На сегодняшний день накоплен значительный опыт по созданию разнообразных по геномному составу интрогрессивных пшенично-ржаных форм, однако для получения новых ценных форм пшеницы с чужеродным хроматином необходимо продолжение исследований по изучению механизмов реорганизации гибридного генома. В настоящей работе представлены и проанализированы данные, касающиеся реорганизации гибридных геномов на первом и последнем этапах интрогрессии хромосом ржи в геном пшеницы: 1) восстановление фертильности гибридов первого поколения (анализ мейотических механизмов образования нередуцированных гамет)

и 2) реорганизация субгеномов пшеницы при интрогрессии единичных хромосом ржи.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ФЕРТИЛЬНОСТИ У ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИГАПЛОИДОВ: МЕЙОТИЧЕСКАЯ РЕСТИТУЦИЯ

Преодоление стерильности гибридов F_1 является главным барьером включения хромосом ржи в геном пшеницы на начальном этапе. Для безошибочного распределения хромосом в мейозе необходимо наличие пары гомологов, в то время как у гибридов первого поколения, геном которых образуется из нескольких гаплоидных геномов, мейоз проходит с многочисленными нарушениями, что и вызывает стерильность. Несмотря на это у амфигаплоидов (межродовой гибрид F_1 , $4x = 28$, геномная формула ABDR) иногда завязываются зерна при самоопылении. Жизнеспособность гаметам обеспечивает однократное деление унивалентных хромосом на сестринские хроматиды в первом или втором делении мейоза (Силкова и др., 2011). Такие гаметы обеспечивают частичную фертильность и образование полиплоидного организма, амфидиплоида ($2x = 56$, AABBD DRR). Процесс, который приводит к формированию нередуцированных гамет, называется мейотической реституцией. Этот феномен вызвал интерес исследователей к изучению механизмов мейоза, приводящих к нередукции числа хромосом в гаметах.

РАЗЛИЧНЫЕ ТИПЫ ПОВЕДЕНИЯ ХРОМОСОМ В МЕЙОЦИТАХ ПШЕНИЧНО-РЖАНЫХ АМФИГАПЛОИДОВ

Ранее проведенные исследования выявили аномалии мейоза, связанные с мейотической реституцией у амфигаплоидов в подтрибе Triticeae. Они вызывали блокирование либо первого, либо второго мейотического деления (Силкова и др., 2011). В первом случае в МI сестринские кинетохоры ориентируются биплярно, но когезия между сестринскими центромерами сохраняется до АII (Cai *et al.*, 2010), это является причиной нерасхождения хромосом в АI и образования диад в конце мейоза. Такой

тип поведения хромосом был назван реституцией в первом делении (first-division restitution, FDR) (Xu, Joppa, 1995), затем единственным делением мейоза (single division meiosis, SDM) (Matsuoka, Nasuda, 2004) и недавно описан как нередуционное мейотическое деление (unreductional meiotic cell division, UMCD) (Cai *et al.*, 2010). Во втором случае сестринские хроматиды унивалентных хромосом расходятся в AI, второе деление блокируется, диады образуются как конечный продукт мейоза (Aase, 1930; Maan, Sasakuma, 1977; Щапова и др., 1987; Силкова и др., 2003; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Olesczuk, Lukaszewski, 2014).

Однако с 1968 г. сохраняется приоритет за одним цитологическим механизмом мейотической реституции – FDR, SDM, UMCD (Wagenaar, 1968; Islam, Shepherd, 1980; Xu, Joppa, 1995; Matsuoka, Nasuda, 2004; Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). Поведение хромосом описывается как «аномальная пролонгация метафазы I», в течение которой униваленты, первоначально разбросанные по клетке, постепенно меняя ориентацию с униполярной на биполярную, собираются на экваторе. Затем первое деление блокируется, а второе протекает нормально, в завершение его образуются диады. Предполагается, что причиной блокирования первого деления является коллапс веретена деления (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). При использовании в качестве маркера антител phSer10H3 (фосфорилирование гистона H3 на остатках Ser10), которые имеют различную локализацию на хромосомах в первом и втором делениях мейоза, было показано, что расхождение унивалентов на хроматиды происходит именно в AII (Matsuoka *et al.*, 2013). Таким образом, до сих пор преобладает мнение о невозможности образования реституционных ядер после эквационного деления унивалентов в AI, так как после биполярной ориентации хромосом происходит коллапс сформированного веретена, следовательно, деление и расхождение сестринских хроматид возможны только во втором делении мейоза.

Образование гамет с соматическим числом хромосом у межвидовых и межродовых гибридов в трибе Triticaceae – не случайный процесс, он контролируется действием и/или взаимодействием генов родительских видов (Wagenaar,

1968; Щапова и др., 1987; Xu, Joppa, 1995; Силкова и др., 2003; Zhang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). С целью определения хромосомного контроля FDR были получены гибриды в результате скрещивания 14 линий тетраплоидной пшеницы сорта Langdon, в геноме которых пара хромосом D-генома замещала гомеологи A или B геномов, с рожью сорта Gazelle и *Ae. squarrosa* L. (Xu, Joppa, 2000). На основании полученных результатов было показано, что хромосома 4A T. durum сорта Langdon, вероятно, несет ген, регулирующий высокую частоту образования FDR, а хромосомы 3A и 6A могут нести гены, контролирующие прохождение второго деления после FDR у гибридов, полученных от скрещивания с рожью. Показано также, что у гибрида линии 1D(1A) с *Ae. squarrosa* L. в первом делении мейоза наблюдалось эквационное деление хромосом с высокой частотой.

У отдаленных гибридов показана высокая вариабельность в поведении хромосом. Выявлены различия по характеристикам микроспорогенеза между растениями (Islam, Shepherd, 1980; Xu, Joppa, 1995, 2000; Силкова и др., 2003), а также индивидуальными колосьями одного растения, и пыльниками в пределах одного колоса (Силкова и др., 2003). В связи с этим многочисленность разнообразных аномалий вызывает трудности в понимании регуляции мейоза и выявлении закономерностей в поведении хромосом у амфигаплоидов.

Результаты работы по изучению мейоза у амфигаплоидов, полученных путем скрещивания с рожью мягкой пшеницы и пшенично-ржаных замещенных линий 1R(1A), 1Rv(1A), 2R(2D)₁, 2R(2D)₂, 2R(2D)₃, 5R(5D), 5R(5A), 6R(6A) (Щапова, Кравцова, 1990; Силкова и др., 2006; Силкова и др., 2007), показали, что объединение четырех гаплоидных геномов ABDR приводит к двум типам мейотического цикла (Silkova *et al.*, 2011) – это двухступенчатое деление, подобное мейозу, и одноступенчатое, с блокированием первого или второго делений (рис. 1). В результате последнего типа деления образуются функциональные нередуцированные гаметы. Эти данные выявили зависимость паттерна мейотического цикла от типа расхождения унивалентных хромосом. Следствием случайного распределения хромосом к полюсам (пар сестринских хроматид, соединенных в районе

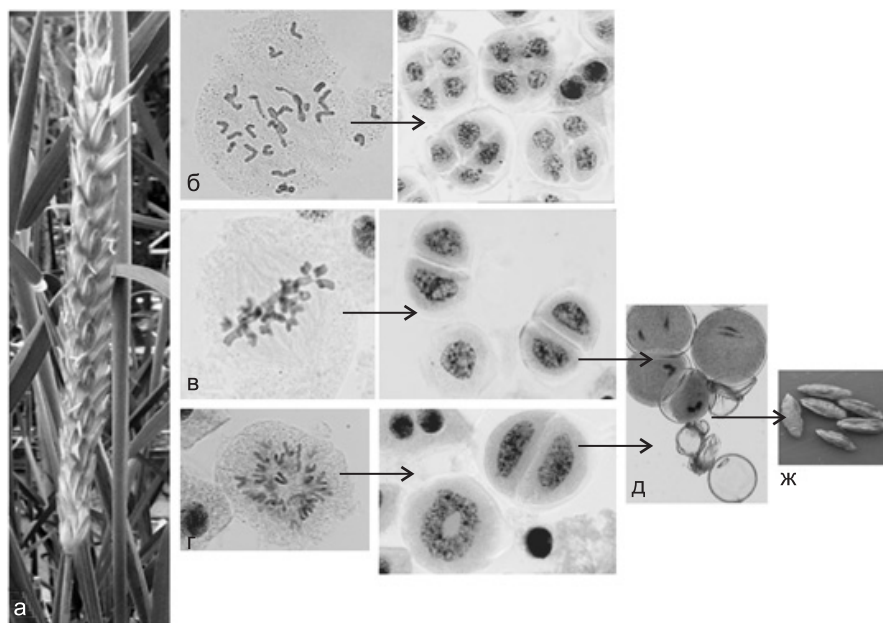


Рис. 1. Типы деления хромосом в мейоцитах пшенично-ржаных гибридов с полигаплоидным геномом ABDR.

а – колос гибрида F_1 ; б – редуционный тип деления; в – эквационный тип деления; г – блокирование первого деления; д – фертильная пыльца; ж – гибридные зерна.

центромеры, редуционный тип расхождения) являются прохождением второго деления и образование стерильной пыльцы (рис. 1, б).

Разделение унивалентных хромосом на сестринские хроматиды и распределение последних к полюсам в первом делении мейоза (эквационный тип расхождения) (рис. 1, в) блокируют второе деление, и образуются диады (нередуцированные микроспоры), которые формируют фертильную пыльцу (рис. 1, д). Блокирование первого деления с характерным радиальным расположением хромосом (рис. 1, г) завершается вторым делением, в результате чего также

образуются нередуцированные микроспоры. Вследствие этого у частично фертильных гибридов на стадии телофазы II преобладают диады (рис. 1, в, г).

Расхождение хромосом в мейоцитах, фенотипически схожих с «продливающей метафазой I», классифицировано как самостоятельный тип деления – эквационно-редуционный (рис. 2). Такой тип поведения хромосом завершался вторым делением мейоза с многочисленными нарушениями.

Выявленные паттерны мейоза у амфигаплоидов ABDR генетически регулируются. Заме-

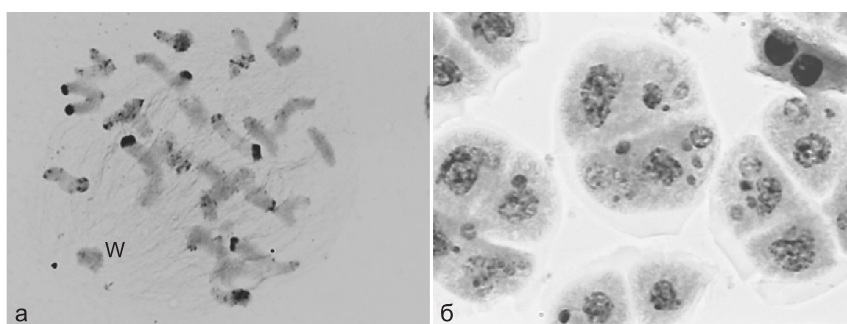


Рис. 2. Эквационно+редуционный тип деления хромосом.

а – метафаза I (С-бэндинг); б – микроспоры с микроядрами (ацетокармин).

щение 2R/2D контролирует деление, подобное мейозу, а замещения 5R/5D, 6R/6A и 1Rv/1A – одноступенчатое деление и образование нередуцированных гамет (Silkova *et al.*, 2011).

ОСОБЕННОСТИ ПОВЕДЕНИЯ ХРОМОСОМ, ПОДОБНОГО МИТОЗУ, В МЕЙОЦИТАХ ГИБРИДОВ: СПАРИВАНИЕ ХРОМОСОМ И СТРУКТУРА ЦЕНТРОМЕРНОГО РАЙОНА

Спаривание хромосом в профазе мейоза является ключевым событием для их рекомбинации и последующего правильного расхождения. Возможность образования бивалентов в мейозе пшенично-ржаных гибридов F_1 исключается из-за отсутствия гомологов и супрессии спаривания между негомологами системой генов *Ph* (*pairing homoeologous*) (Sears, 1976), однако в некоторых случаях формируются гомеологичные и гетерологичные биваленты (Miller *et al.*, 1994; Benavente *et al.*, 1996).

Ранее исследователями отмечалось, что одной из особенностей регуляции мейоза,

подобного митозу (эквационный тип деления и расхождения хромосом в анафазе I, блокирование второго деления и формирование нередуцированных гамет), является почти полное отсутствие образования бивалентов (Maan, Sasakuma, 1977; Щапова и др., 1987; Xu, Jorppa, 1995, 2000). Нами изучен характер образования бивалентов в мейоцитах с различным поведением хромосом (Silkova *et al.*, 2013). Геномный состав гибридов F_1 (замещенные линии $\times$ рождь *S. cereale* L.) гарантирует присутствие пары ржаных гомологов в геноме каждого из гибридов и образование ими бивалента; в генотипе гибридного материала присутствовали локусы *Ph*. Разделение унивалентов по центромерам имело место в мейоцитах двух типов: с эквационным и эквационно+редукционным делением, а формирование бивалентов в мейоцитах одного и того же генотипа зависело от типа деления унивалентных хромосом (рис. 3).

В мейоцитах с делением по типу мейоза биваленты образовывались значительно чаще, в то время как в мейоцитах с делением по типу митоза биваленты были единичны или отсутствовали (рис. 3, а). Среди последних

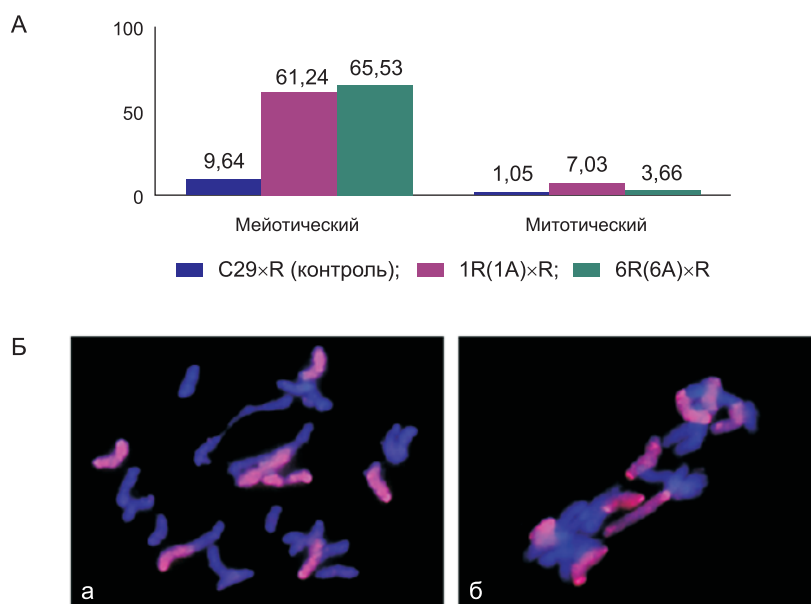


Рис. 3. Характер спаривания хромосом в мейозе амфигаплоидов.

А – процент клеток с бивалентами среди мейоцитов с мейотическим и митотическим паттернами мейоза у гибридов F_1 C29×R, 1Rv(1A)×R и 6R(6A)×R. Б – поведение хромосом в метафазе I в мейоцитах с делением по типу мейоза (а) и митоза (б): а – образование бивалентов хромосомами пшеницы и ржи (биваленты указаны стрелками); б – 8 унивалентных хромосом ржи, включая гомологи 1R1R. Геномная *in situ* гибридизация (хромосомы ржи окрашены красным).

обнаружено более 90 % мейоцитов без бивалентов. Гомологи ржи в этом случае также не формировали биваленты (рис. 3, Б, б).

Так как центромерный район играет ключевую роль в ориентации, делении и расхождении хромосом, нами была изучена структура центромеры в мейозе частично фертильных пшенично-ржаных амфигаплоидов ABDR ($4x = 28$) с использованием центромероспецифичных проб pAWRC1 и *Ae. tauschii* pAet 6-09 (Логонова, Силкова, 2014). Сравнительный анализ паттернов локализации проб в митозе, нормальном мейозе у пшеницы *T. aestivum* L. и ржи *S. cereale* L. и в мейозе амфигаплоидов выявил различия в структуре центромер у монополярно и биполярно ориентированных хромосом (рис. 4).

В первом делении мейоза гибридизационные сайты наблюдались в виде плотных точек на первичных перетяжках хромосом в диплотене и метафазе (рис. 4, А, а), а в митозе и втором делении мейоза сайты выглядели как натянутые бэнды с диффузной структурой, расположенные поперек центромерного района (рис. 4, А, б).

Эти данные были экстраполированы на характер локализации повтора pAet6-09 в мейозе пшенично-ржаных амфигаплоидов. Было выявлено три типа мейоцитов, отличающихся по характеру распределения сигналов гибридизации на центромерах (рис. 4, Б, В): 1) в МІ сайты гибридизации на всех хромосомах имели вид плотных точечных сигналов (рис. 4, Б, б). Такая организация центромер отражает монополярную ориентацию сестринских кинетохоров в мейоцитах с редукционным типом деления; 2) в МІ одни хромосомы имели точечные, а другие – растянутые диффузные сигналы гибридизации (рис. 4, Б, а). Мейоциты данного типа соответствовали мейоцитам с эквационно+редукционным типом деления; 3) почти все хромосомы, за исключением 1–3, располагаясь в эквационной плоскости, имели натянутые диффузные сигналы гибридизации в мейоцитах эквационного типа деления (рис. 4, В, а). Хромосомы в АІ делились на сестринские хроматиды, которые расходились к противоположным полюсам (рис. 4, В). Следовательно, паттерны локализации pAet6-09 предполагают структурные и функциональные особенности центромерных районов в мейозе пшенично-

ржаных амфигаплоидов, это отражает особую регуляцию поведения хромосом во время эквационного деления.

Похожие результаты получены при сравнительном анализе поведения хромосом в АІ мейоза пшенично-ржаных гибридов с использованием мутантов пшеницы Chinese spring по локусам *Ph1* и *Ph2* (Aragon-Alcaide *et al.*, 1997). Диффузные сигналы гибридизации центромероспецифичной пробы CCS1 обнаружены у хромосом с биполярной ориентацией и последующим делением их на хроматиды. Однако такие хромосомы присутствовали только в мейоцитах гибридов с высоким уровнем спаривания (отсутствие локуса *Ph1*). Полагается, что диффузные сигналы гибридизации CCS1 отражают особенности в структуре центромерного хроматина в генотипах с отсутствием *Ph1*. Наши данные не подтверждают эти выводы. Влияние на частоту формирования бивалентов оказывал тип расхождения хромосом при наличии *Ph1*, так же, как и на характер локализации сигналов гибридизации пробы pAet6-09 (плотные точечные либо диффузные натянутые). Следовательно, формирование структуры центромерного района – это сложно регулируемый процесс, особенно в мейозе амфигаплоидов, на который не может влиять только локус *Ph1*.

Таким образом, нами получены дополнительные доказательства того, что в археспориальных клетках пыльника амфигаплоидов возможна модификация регуляции клеточного цикла при запуске или во время мейотического деления, в котором мы наблюдали характерные для митоза признаки: отсутствие бивалентов и особую структуру центромерного района.

ФОРМИРОВАНИЕ ВЕРЕТЕНА ДЕЛЕНИЯ В МЕЙОЦИТАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ТИПАМИ РЕСТИТУЦИИ

В настоящее время нет окончательно сформированного представления об образовании веретена деления в мейозе, когда образуются нередуцированные микроспоры. Биполярное веретено в мейоцитах с эквационным делением унивалентных хромосом в анафазе I описано, однако авторы полагают, что такое веретено нефункционально, впоследствии в

MI-AI претерпевает коллапс, в результате чего блокируется первое деление мейоза (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013). Причины этого не найдены. В нашем эксперименте в мейоцитах

с делением, подобным митозу, образовывалось дивергентное веретено, а унивалентные хромосомы располагались на экваторе, ориентируясь биполярно (рис. 5, а).

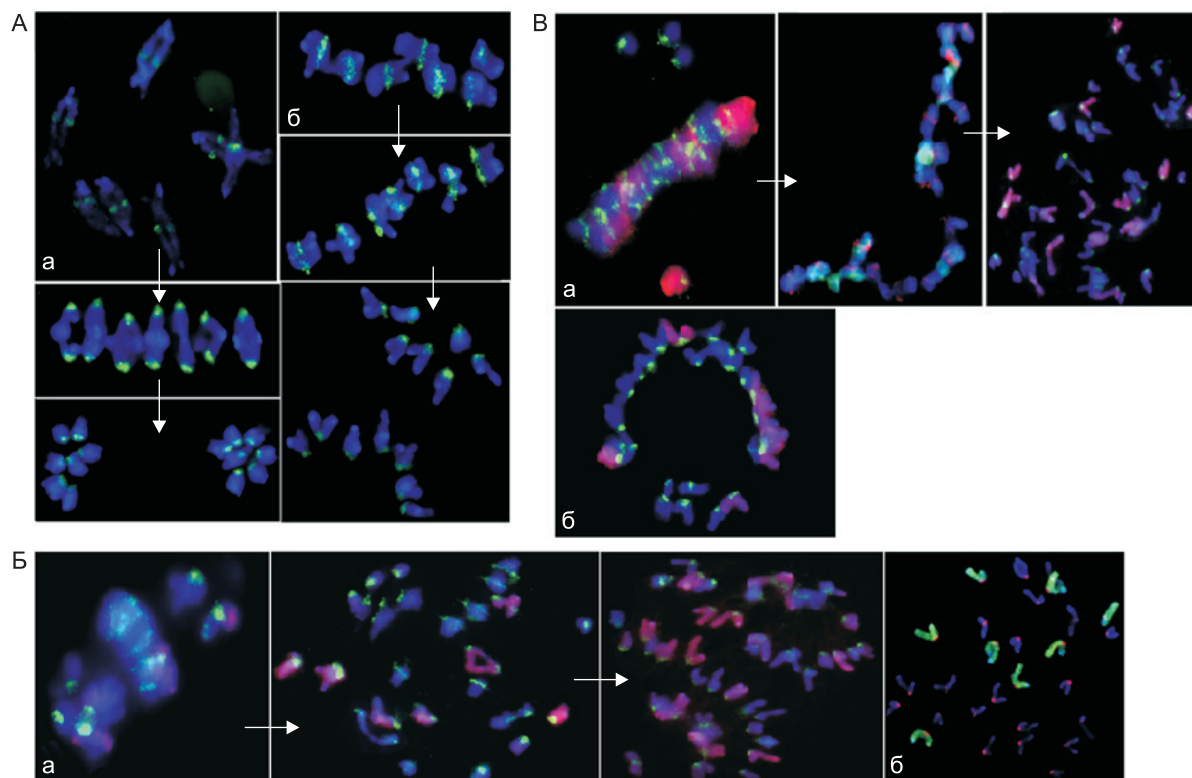


Рис. 4. Локализация центромероспецифичной пробы pAet6-09.

А – мейоз ржи, норма: а – первое деление; б – второе деление; Б – мейоз у стерильных амфигамиплоидов: а – эквационно+редукционный тип деления; б – редукционный тип деления; В – мейоз у частично фертильных амфигамиплоидов: а – эквационный тип деления; б – блокирование первого деления. Центромеры окрашены зеленым, хромосомы ржи – красным. Б, б – хромосомы ржи окрашены зеленым, центромеры – красным.

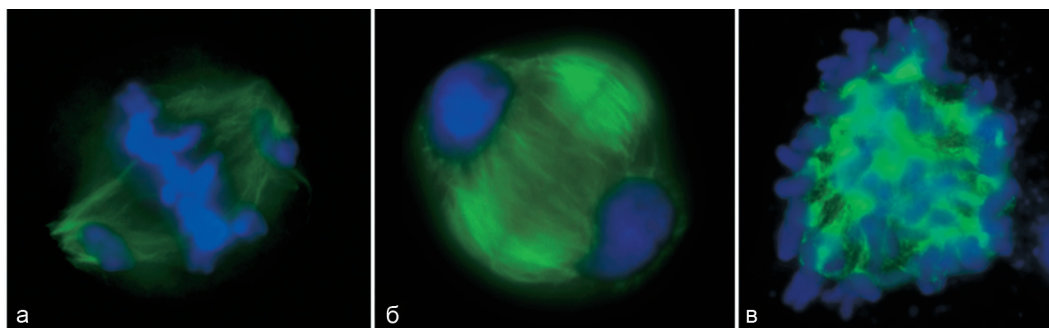


Рис. 5. Образование веретена деления в микроспорогенезе с мейотической реституцией.

а – биполярное дивергентное веретено в MI, хромосомы расположены на экваторе; б – образование фрагмопласта в телофазе I; равные группы хромосом у полюсов; в – монополярное веретено в MI, хромосомы ориентированы центромерами к одному полюсу. Иммуноокрашивание, синим окрашены хромосомы, зеленым – веретено.

Первое деление проходило без аномалий, веретено перемещало к полюсам сестринские хроматиды, в результате чего образовывались равные по величине телофазные группы (рис. 5, б). У частично фертильных гибридов присутствовали также мейоциты с радиальным расположением хромосом (рис. 1, г), что блокировало первое деление. Иммуноокрашивание на α -тубулин показало, что в таких случаях микротрубочки формируют монополярное веретено с полюсом в центре группы хромосом (моноастральное веретено) (рис. 5, в). Точечные сигналы гибридизации центромероспецифичного повтора pAet6-09 на хромосомах, расположенных таким образом (рис. 4, В, б), дают дополнительное доказательство их монополярной ориентации. Однако общепризнано, что монополярные веретена не характерны для растений, а такие картины возможны из-за раздавливания мейоцита по направлению от полюсов к экватору клетки. Существует и мнение, что вследствие коллапса биполярного веретена таким образом блокируется первое деление (Cai *et al.*, 2010; Matsuoka *et al.*, 2013).

Расположение хромосом по кругу, подобное таковому у пшенично-ржаных гибридов, описано у мутантов дрозофилы *mgr*, *polo*, *aurora*. Показано, что такое поведение хромосом возможно благодаря образованию именно монополярного веретена (Gonzalez *et al.*, 1998).

Таким образом, мы предполагаем, что экстремальные условия гибридного полигаплоидного генома вскрывают возможность для прохождения различных способов деления клетки, апробированных на разных этапах эволюции. Так, в процессе эволюции растительных организмов могут быть отобраны и закреплены механизмы одноступенчатого деления в мейозе межродовых гибридов, обеспечивающие им выживание.

ИНТРОГРЕССИЯ ХРОМОСОМЫ 1R: ИЗМЕНЕНИЯ СТРУКТУРЫ ХРОМОСОМ СУБГЕНОМОВ ПШЕНИЦЫ

Источником хроматина ржи в селекции на устойчивость являются пшенично-ржаные замещенные линии и линии с транслоцированными хромосомами. К настоящему времени широкое распространение сохраняется за сортами мягкой пшеницы, несущими пшенично-ржаную

транслокацию 1RS.1BL и в меньшей степени – транслокацию 1RS.1AL и пшенично-ржаное замещение 1R(1B) (Landjeva *et al.*, 2006; Shlegel, 2010; Yediay *et al.*, 2010; Трубочеева и др., 2011). Большая часть исследований по использованию чужеродной изменчивости посвящена поиску новых источников хромосомы 1R (Ren *et al.*, 2009) и получению форм пшеницы с небольшими сегментами этой хромосомы во избежание передачи нежелательных признаков. В технологии фрагментации хромосомы ржи нашли применение гаметоцидные гены (Tsuchida *et al.*, 2008).

Во время трансмиссии хромосом ржи в геном пшеницы происходит их модификация (Badaeva *et al.*, 1986; Alkhimova *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2010). Однако информация об изменении структуры хромосом субгеномов интрогрессивной пшеницы очень ограничена (Bolsheva *et al.*, 1986; Силкова и др., 2006; Fu *et al.*, 2013).

В ходе кариотипирования потомства F_2 комбинации скрещивания пшенично-ржаной замещенной линии 1Rv(1A) с сортом Саратовская 29 были выявлены различные aberrации хромосом пшеницы и ржи. Кроме телоцентрической хромосомы 1RS, у двух растений был обнаружен второй продукт поперечного разрыва унивалентной хромосомы 1R – телоцентрик 1RL (рис. 6, а). Кариотип одного растения содержал телоцентрическую хромосому 1DL (рис. 6, в). Модификации такого типа возникли из-за поперечного деления в районе центромеры (misdivision) унивалентных хромосом ржи в мейозе гибридов F_1 (Силкова и др., 2014).

В проанализированном потомстве отмечались также aberrации хромосом пшеницы в виде делеций крупных фрагментов одного из плеч (рис. 6, г). Появление хромосомных aberrаций подобного типа, по-видимому, связано с присутствием чужеродного хроматина ржи, вызывающего у пшенично-ржаных гибридов различные нарушения мейотического цикла. В частности, образование описанных делеций может быть результатом незавершенности процесса спаривания гомеологов, который останавливается на этапе образования контактов в результате двуцепочечных разрывов. При этом репарации разрывов не происходит, что приводит к отделению терминального фраг-

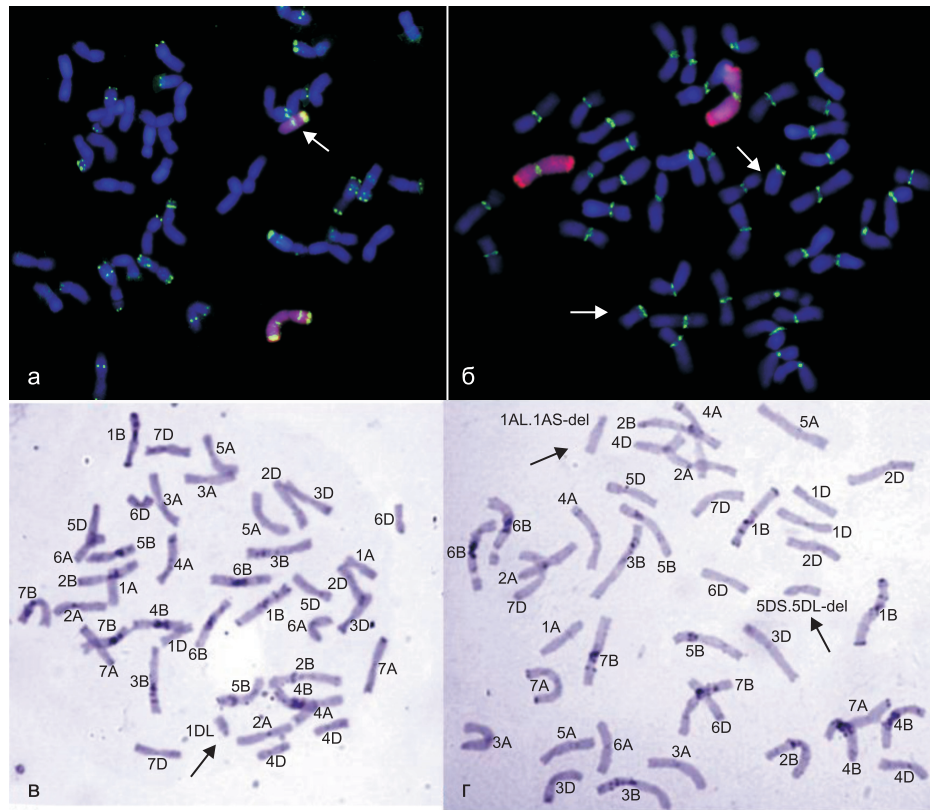


Рис. 6. Кариотипы растений F_2 двойного моносомика 1R-1A.

а – телоцентрик длинного плеча хромосомы 1R (1RL); б – два телоцентрика хромосом пшеницы; в – телоцентрик длинного плеча хромосомы 1D (1DL); г – две модифицированные хромосомы пшеницы 1A и 5D (делеции терминальных районов плеч). а, б – FISH и GISH (а, б – красным окрашены хромосомы ржи, зеленым – pSc 119.1 (а); центромероспецифичный повтор pAet06-09 (б)); в, г – С-окрашивание. Модификации хромосом указаны стрелками.

мента хромосомы (Bai *et al.*, 1999). Возможно, механизмы разрывов хромосом аналогичны действию гаметоцидных генов в митозе пылевых зерен (Nasuda *et al.*, 1998).

Особо следует отметить тот факт, что интрогрессия хромосомы 1R вызвала у отдельных растений моносомию по хромосомам 3D, 4A, 6A, а у двух растений – трисомию по хромосоме 7D. Возможной причиной элиминации хромосом может быть асинописис. Однако линия 1Rv(1A) цитологически стабильна (Силкова и др., 2007), что свидетельствует о компенсационной способности хромосомы ржи, а в мейозе димоносомиков 1Rv-1A среднее число унивалентов на клетку не превышало значений 2,01–2,05 (Силкова и др., 2014). В целом из 28 идентифицированных кариотипов 12 содержали aberrantные хромосомы либо были нестабильны по хромосомному составу.

Разрывы и элиминация хромосом пшеницы

также были обнаружены у пшенично-ржаных моносомно дополненных линий (Fu *et al.*, 2013). В кариотипах самоопыленного потомства линии с хромосомой 7R присутствовали три хромосомы 4A и aberrantная 2D, с хромосомой 6R – aberrantная 3D, а хромосомы 1A и 4B элиминировали.

Таким образом, присутствие лишь одной хромосомы ржи в геноме пшеницы вызывает различные структурные изменения в кариотипе.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта VI.53.1.5, гранта РФФИ (13-04-00679), интеграционного проекта СО РАН № 2 и Б12СО-018.

ЛИТЕРАТУРА

Голубовская И.Н. Цитогенетика отдаленных гибридов пшеницы и перспективы их использования в селекции // Цитогенетика пшеницы и ее гибридов / Под ред.

- П.М. Жуковского, В.В. Хвостовой. М.: Наука, 1971. С. 243–286.
- Дубовец Н.И., Дымкова Г.В., Соловей Л.А. и др. Реконструкция кариотипа гексаплоидных тритикале путем межгеномных замещений хромосом // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1394–1399.
- Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Соловей Л.А. и др. Рекомбинантный геном злаков – закономерности формирования и роль в эволюции полиплоидных видов // Генетика. 2008. Т. 44. № 1. С. 54–61.
- Карпеченко Г.Д. Избранные труды. М.: Наука, 1971. С. 303.
- Левитский Г.А. К истории плодовых промежуточных константных пшенично-ржаных гибридов // Цитогенетика растений / Ред. Н.П. Дубинин. М.: Наука, 1978а. С. 251–253.
- Левитский Г.А. Цитология пшенично-ржаных амфидиплоидов // Цитогенетика растений / Ред. Н.П. Дубинин. М.: Наука, 1978б. С. 224–250.
- Леонова И.Н., Добровольская О.Б., Каминская Л.Н. и др. Молекулярный анализ линий тритикале, содержащих различные системы VRN-генов, с помощью молекулярных маркеров и гибридизации *in situ* // Генетика. 2005. Т. 41. № 9. С. 1014–1020.
- Логинова Д.Б., Силкова О.Г. Митотическое поведение центромер в мейозе как механизм восстановления фертильности у пшенично-ржаных амфигаплоидов // Генетика. 2014. Т. 50. № 8. С. 930–939.
- Мюнтцинг А. Генетические исследования. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1963. 488 с.
- Першина Л.А. Хромосомная инженерия растений – направление биотехнологии // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2014. Т. 18. № 1. С. 139–146.
- Писарев В.Е. Селекция зерновых культур. М.: Колос, 1964. 317 с.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И. и др. Создание пшенично-ржаных замещенных линий с идентификацией хромосомного состава кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 6. С. 793–802.
- Силкова О.Г., Добровольская О.Б., Дубовец Н.И. и др. Получение пшенично-ржаных замещенных линий на основе озимых сортов ржи с идентификацией кариотипов методами С-бэндинга, GISH и SSR-маркеров // Генетика. 2007. Т. 43. № 8. С. 1149–1152.
- Силкова О.Г., Кабаненко Ю.Н., Логинова Д.Б. Влияние пшенично-ржаного замещения на элиминацию хромосом: анализ поведения унивалентов в мейозе пшеницы с диносомией и тетраиносомией // Генетика. 2014. Т. 50. № 3. С. 282–290.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Кравцова Л.А. Механизмы мейотической реституции и их генетическая регуляция у пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 2003. Т. 38. № 11. С. 1514–1523.
- Силкова О.Г., Щапова А.И., Шумный В.К. Мейотическая реституция у амфигаплоидов в трибе Triticeae // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 437–448.
- Трубачеева Н.В., Россеева Л.П., Белан И.А. и др. Особенности сортов яровой мягкой пшеницы Западной Сибири, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL // Генетика. 2011. Т. 47. № 1. С. 18–24.
- Хвостова В.В., Голубовская И.Н., Шкутина Ф.М. Цитогенетика аллополиплоидов в подтрибе Triticinae на примере Triticale и 56-хромосомных ППГ (неполных амфидиплоидов) // Полиплоидия и селекция / Под ред. Н.В. Турбина. Минск, 1972. С. 95–105.
- Шкутина Ф.М. Цитогенетика и селекция тритикале // Цитогенетика гибридов, мутаций и эволюция кариотипа. Новосибирск: Наука, 1977.
- Щапова А.И., Кравцова Л.А. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов. Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние, 1990. 164 с.
- Щапова А.И., Потапова Т.А., Кравцова Л.А. Генетическая обусловленность нерасхождения хромосом в мейозе пшенично-ржаных полигаплоидов // Генетика. 1987. Т. 23. № 3. С. 473–481.
- Aase H.C. Cytology of Triticum, Secale, and Aegilops hybrids with reference to phylogeny // Res. Stud. State Coll. Wash. 1930. V. 2. P. 5–60.
- Alkhimova A.G., Heslop-Harrison J.S., Shchapova A.I., Vershinin A.V. Rye chromosome variability in wheat-rye addition and substitution lines // Chromosome Res. 1999. V. 7. P. 205–212.
- Aragón-Alcaide L., Reader S., Miller T., Moore G. Centromeric behaviour in wheat with high and low homeologous chromosomal pairing // Chromosoma. 1997. V. 106. P. 327–333.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Bolsheva N.L., Zelenin A.V. Chromosome alterations in the karyotype of triticales in comparison with the parental forms 1. Heterochromatic regions of R genome chromosomes // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 72. P. 518–523.
- Bai X., Peirson B.N., Dong F. *et al.* Isolation and characterization of *SYN1*, a *RAD21*-like gene essential for meiosis in Arabidopsis // Plant Cell. 1999. V. 11. P. 417–430.
- Benavente E., Fernandez-Calvin B., Orellana J. Relationship between the levels of wheat-rye metaphase I chromosomal pairing and recombination revealed by GISH // Chromosoma. 1996. V. 105. P. 92–96.
- Bento M., Gustafson P., Viegas W., Silva M. Genome merger: from sequence rearrangements in triticales to their elimination in wheat-rye addition lines // Theor. Appl. Genet. 2010. V. 121. P. 489–497.
- Bolsheva N.L., Badaeva E.D., Badaev N.S., Zelenin A.V. Chromosome alterations in the karyotype of triticales in comparison with the parental forms 2. Heterochromatin of the wheat chromosomes // Theor. Appl. Genet. 1986. V. 73. P. 66–71.
- Cai X., Xu S.S., Zhu X. Mechanism of haploidy-dependent meiotic cell division of polyploid wheat // Chromosoma. 2010. V. 119. P. 275–285.
- Feldman M., Levy A.A. Allopolyploidy – a shaping force in the evolution of wheat genomes // Cytogenet. Genome Res. 2005. V. 109. P. 250–258.
- Fu S., Yang M., Fei Y. *et al.* Alterations and abnormal mitosis of wheat chromosomes induced by wheat-rye monosomic addition lines // PLoS ONE. 2013. V. 8. No. 7. e70483. doi:10.1371/journal.pone.0070483
- Gonzalez G., Sunkel C.E., Glover D.M. Interactions between *mgr*, *asp*, and *polo*: *asp* function modulated by *polo* and needed to maintain the poles of monopolar and bipolar spindles // Chromosoma. 1998. V. 107. P. 452–460.

- Islam A.K.M.R., Shepherd K.W. Meiotic restitution in wheat-barley hybrids // *Chromosoma*. 1980. V. 79. P. 363–372.
- Landjeva S., Korzun V., Tsanev V. *et al.* Distribution of wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria // *Plant Breed.* 2006. V. 125. P. 102–104.
- Lukaszewski A.J. Frequency of 1RS.1AL and 1RS.1BL translocations in United States wheats // *Crop Sci.* 1990. V. 30. P. 1151–1153.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Genome evolution of allopolyploids: a process of cytological and genetic diploidisation // *Cytogenet. Genome. Res.* 2005. V. 109. P. 236–249.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Timing and rate of genome variation in triticales following allopolyploidization // *Genome*. 2006. V. 49. P. 950–958.
- Ma X.F., Gustafson J.P. Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in triticales // *Ann. Bot.* 2008. V. 101. P. 825–832.
- Ma X.F., Fang P., Gustafson J.P. Polyploidization-induced genome variation in triticales // *Genome*. 2004. V. 47. P. 839–848.
- Maan S.S., Sasakuma T. Fertility of amphihaploids in Triticinae // *J. Hered.* 1977. V. 57. P. 76–83.
- Mater Y., Baenziger S., Gill K. *et al.* Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from 'Amigo' and 'Kavkaz' wheat-rye translocations of chromosome 1RS.1AL // *Genome*. 2004. V. 47. P. 292–298.
- Matsuoka Y., Nasuda S. Durum wheat as candidate for the unknown female progenitor of bread wheat: an empirical study with a highly fertile F₁ hybrid with *Aegilops tauschii* Coss. // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 109. P. 1710–1717.
- Matsuoka Y., Nasuda S., Ashida Y. *et al.* Genetic basis for spontaneous hybrid genome doubling during allopolyploid speciation of common wheat shown by natural variation analyses of the paternal species // *PLoS ONE*. 2013. 8(8): e68310. doi:10.1371/journal.pone.0068310
- Mergoum M., Singh P.K., Pena R.J. *et al.* Triticale: A «New» Crop with Old Challenges // *Cereals*. 2009. DOI: 10.1007/978-0-387-72297-9 / Ed. M.J. Carena. Springer Science + Business Media, LLC.
- Miller T.E., Reader S.M., Purdie K.A., King I.P. Determination of the frequency of wheat-rye chromosome pairing in wheat × rye hybrids with and without chromosome 5B // *Theor. Appl. Genet.* 1994. V. 89. P. 255–258.
- Nasuda S., Friebe B., Gill B.S. Gametocidal genes induce chromosome breakage in the interphase prior to the first mitotic cell division of the male gametophyte in wheat // *Genetics*. 1998. V. 149. P. 1115–1124.
- Oleszczuk S., Lukaszewski A.J. The origin of unusual chromosome constitutions among newly formed allopolyploids // *AJB*. 2014. V. 101. P. 318–326.
- Rimpau W. Kreuzungsprodukte landwirtschaftlicher Kulturpflanzen // *Landwirtsch. Jahrb.* 1891. V. 20. No. 4. P. 335–371.
- Ren T.H., Yang Z.J., Yan B.J. *et al.* Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat // *Euphytica*. 2009. V. 169. P. 207–213.
- Sears E.R. Genetic control of chromosome pairing in common wheat // *Annu. Rev. Genet.* 1976. V. 10. P. 31–51.
- Sears E.R. Homoeologous chromosomes in *Triticum aestivum* (abstr.) // *Genetics*. 1952. V. 37. P. 624.
- Sears E.R. The aneuploids of common wheat // *Res. Bull. Mis. Agric. Exptl. Stat.* 1954. V. 572. P. 1–8.
- Shchapova A.I., Potapova T.A., Kravtsova L.A., Numerova O.M. Karyotype stabilization in intergeneric hybrids of the subtribe Triticinae // *Theor. Appl. Genet.* 1984. V. 68. P. 289–296.
- Shlegel R. Current list of wheats with rye and alien introgression. 2010. V05-08, 1–14. <http://www.desicca.de/Wheat-rye-introgression>.
- Silkova O.G., Adonina I.G., Krivosheina E.A. *et al.* Chromosome pairing in meiosis of partially fertile wheat/rye (ABDR) hybrids // *Plant Reprod.* 2013. V. 26. P. 33–41.
- Silkova O.G., Shchapova A.I., Shumny V.K. Patterns of meiosis in ABDR amphihaploids depend on the specific type of univalent chromosome division // *Euphytica*. 2011. V. 178. P. 415–426.
- Tsuchida M., Fukushima T., Nasuda S. *et al.* Dissection of rye chromosome 1R in common wheat // *Genes Genet. Syst.* 2008. V. 83. P. 43–53.
- Villareal R.L., Banuelos O., Mujeeb-Kazi A., Rajaram S. Agronomic performance of chromosome 1B and 1BL.1RS near-isolines in the spring bread wheat Seri M82 // *Euphytica*. 1998. V. 103. P. 195–202.
- Voylovkov A.V., Tikhenko N.D. Triticale as a model for study of genomic interaction and genome evolution in allopolyploids plants // *Proc. of the 5th Intern. Triticale Symp. Poland*. 2002. V. 1. P. 63–70.
- Wagenaar E.B. Meiotic restitution and the origin of polyploidy. I. Influence of genotype on polyploid seedset in a *Triticum crassum* × *Triticum turgidum* hybrid // *Can. J. Genet. Cytol.* 1968. V. 10. P. 836–843.
- Weimarck A. Elimination of wheat and rye chromosomes in a strain of octoploid triticales as revealed by Giemsa banding technique // *Hereditas*. 1974. V. 77. P. 281–286.
- Xu S.J., Joppa L.R. Mechanisms and inheritance of first division restitution in hybrids of wheat, rye, and *Aegilops squarrosa* // *Genome*. 1995. V. 38. P. 607–615.
- Xu S.J., Joppa L.R. First division restitution in hybrids of Langdon durum disomic substitution lines with rye and *Aegilops squarrosa* // *Plant Breed.* 2000. V. 119. P. 233–241.
- Yediay F.E., Baloch F.S., Kilian B., Ozkan H. Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2010. V. 57. P. 119–129.
- Zhang L., Chen Q., Yuan Z. *et al.* Production of aneuha-ploid and euploid sporocytes by meiotic restitution in fertile hybrids between durum wheat Langdon chromosome substitution lines and *Aegilops tauschii* // *J. Genet. Genom.* 2008. V. 35. P. 617–623.
- Zhang L., Yen Y., Zheng Y., Liu D. Meiotic restriction in emmer wheat is controlled by one or more nuclear genes that continue to function in derived line // *Sex. Plant Reprod.* 2007. V. 20. P. 159–166.
- Zhou J., Zhang H., Yang Z. *et al.* Characterization of a new T2DS.2DL-?R translocation triticales ZH-1 with multiple resistances to diseases // *Genet. Resour. Crop. Evol.* 2012. V. 59. P. 1161–1166.

RYE CHROMATIN INTROGRESSION IN THE BREAD WHEAT GENOME: CYTOGENETIC ASPECTS

O.G. Silkova¹, D.B. Loginova¹, Yu.N. Ivanova (Kabanenko)¹,
E.B. Bondarevich², L.A. Solovei², T.I. Shtyk², N.I. Dubovets²

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: silkova@bionet.nsc.ru;

² Institute of Genetics and Cytology, National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus,
e-mail: nadezhdadubovets@gmail.com

Summary

Alien chromatin introgression into the genome of common wheat *Triticum aestivum* L. is the most efficient way to enrich the gene pool of this crop. To improve the breeding value of wheat accessions, rye *Secale cereale* L. is used as a donor of characters. Transfer of rye genetic material has certain specific features. The combination of the two cereal genomes in a single nucleus results in imbalance in all genetic systems. Fertility restoration in amphihaploids is the first step in the formation of introgression accessions. It is followed by the hybrid genome reorganization, which leads to cytological and genetic stability in the diploid progeny. In this paper, we present and analyze results that were obtained in the study of the two steps of wheat-rye hybrid genome reorganization: (1) breaching of F₁ hybrid sterility (cytogenetic mechanisms of unreduced gamete formation) and (2) reorganization of wheat subgenomes during the introgression of single rye chromosomes.

Key words: wheat-rye hybrids, cytogenetics, FISH, immunostaining, C banding, genome reorganization, meiotic restitution, chromosome modification.