

На правах рукописи

ДИВАШУК МИХАИЛ ГЕОРГИЕВИЧ

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХРОМОСОМНЫХ ТРАНСЛОКАЦИЙ И
ЗАМЕЩЕНИЙ У НЕКОТОРЫХ ФОРМ ЯРОВОЙ
ТРИТИКАЛЕ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена на кафедре генетики и в центре молекулярной биотехнологии Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К. А. Тимирязева

Научный руководитель:

кандидат биологических наук **А. А. Соловьев**

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук **В. В. Пыльнев**

кандидат сельскохозяйственных наук **А. В. Сергеев**

Ведущая организация: кафедра генетики Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Защита состоится « 24 » мая 2007 г. в 13 час. на заседании диссертационного совета Д.220.043.10 при Российском государственном аграрном университете – МСХА имени К.А. Тимирязева по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49.
Факс: (495)-976-0894

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке им. Н.И. Железнова РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Автореферат разослан « ____ » апреля 2007 г.
и размещен на сайте <http://www.timacad.ru>

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук

Г.И. Карлов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Яровая тритикале обладает высоким потенциалом продуктивности и в сочетании с высоким качеством зерна может быть использована в различных направлениях. Недостаточная селекционно-генетическая проработка этой культуры препятствует широкому внедрению этой культуры в производство. Об этом, в частности, свидетельствуют данные о присутствии в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в 2007 г. лишь двух сортов этой культуры.

Для яровой тритикале показано широкое использование хромосомных замещений и транслокаций с уменьшением доли генетического материала ржи (Zillinsky, 1980; Gustafson, Lukaszewsky, 1984). Замещения и транслокации хромосом позволяют решать проблемы, характерные для яровой тритикале, как показано в отношении признаков хлебопекарных качеств зерна, устойчивости к прорастанию на корню, толерантности к ионам алюминия, и другие (Rybka, 2003; Oracka and Łapiński, 2006; Wos et al, 2006). Оптимальный хромосомный состав, создаваемый на основе гомеологов А, В, D и R геномов или их плеч и отдельных участков, может служить основой для создания новых ценных форм тритикале с уникальными наборами хромосом и с определенными характеристиками в зависимости от направления использования и места выращивания (Mergoum, 2004).

Важным этапом в работе с линиями яровой тритикале, несущими замещения и транслокации является четкая идентификация замещения или транслокации с определением вовлеченных хромосом. Идентификация хромосом и их участков может быть выполнена с использованием различных методов – дифференциального окрашивания, молекулярного маркирования, геномной гибридизации *in situ*. Применение комплексного подхода с использованием разных методов позволяет осуществлять надежную идентификацию хромосомных наборов тритикале.

Цель и задачи. Цель исследований состояла в комплексном молекулярно-цитогенетическом анализе линий яровой гексаплоидной тритикале из коллекции кафедры генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, характеризующихся по ряду хозяйственно-ценных признаков.

Исходя из этого, были поставлены следующие задачи:

1. Цитогенетическое изучение линии яровой тритикале 131/7, несущей пшенично-ржаную транслокацию, методами дифференциального окрашивания и геномной *in situ* гибридизации.
2. Разработка комплексной методики идентификации и генетического картирования ржано-пшеничной транслокации на примере линии тритикале 131/7.
3. Определение геномного состава линий и образцов яровой тритикале PI-587512, Л-22, S-17, Л-24, к-1433, Л-8-4, Л-8-6, Л-26, S-17-4, Л-8-1, Л-8-3, Л-12, Л-13, Л-15.
4. Выявление замещений у отобранных линий и образцов с использованием микросателлитных маркеров и геномной гибридизации *in situ*.
5. Скрининг данных отобранных линий и образцов на наличие хроматина D-генома с помощью микросателлитных маркеров и их цитогенетическое изучение с помощью геномной *in situ* гибридизации.

Научная новизна результатов исследования. Впервые с помощью комплексного подхода, включающего микросателлитный анализ, дифференциального окрашивания и геномной *in situ* гибридизации проведен анализ 15 образцов яровой гексаплоидной тритикале. Модифицирован метод совмещения дифференциального окрашивания и геномной гибридизации *in situ* для идентификации ржано-пшеничных транслокаций. Разработана и апробирована методика быстрого скрининга коллекции тритикале на наличие генетического материала генома D на основе хромосом специфичных микросателлитных маркеров. Впервые установлено наличие

замещения 2B/2D и 2RS.2RL-2BL-транслокации у линии 131/7. Впервые установлено наличие 2R/2D замещения у 7 образцов яровой тритикале. Показано наличие четырех вариантов по микросателлитным маркерам хромосомы 2D.

Практическая значимость. Методика скрининга коллекции на присутствие генетического материала D-генома на основе отобранных микросателлитных маркеров может быть использована для быстрого поиска замещенных и транслоцированных форм тритикале с участием этого генома. Оптимизированный метод совмещения дифференциального окрашивания и геномной гибридизации *in situ* рекомендуется для идентификации ржано-пшеничных транслокаций.

Выявленные формы с 2R/2D-замещением могут быть использованы в качестве исходного материала в селекционном процессе яровой тритикале.

Апробация результатов работы. Результаты работы апробированы на V Международном совещании и Школе молодых ученых по кариологии, кариосистематике и молекулярной систематике растений «Кариология, кариосистематика и молекулярная филогения растений» (Санкт Петербург, 2005), Международной конференции молодых ученых (Республика Сербия и Черногория, Чачак, 2005), Международной научной конференции РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, посвященной 190-летию со дня рождения первого директора Петровской земледельческой и лесной академии академика Н.И. Железнова (Москва, 2006).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 4 печатных работы.

Объем и структура диссертации. Материалы диссертации изложены на __ страницах машинописного текста и включает _ рисунков, _ таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, выводов и списка литературы. Список цитируемой литературы включает __ наименований, из них __ иностранных.

УСЛОВИЯ, МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Экспериментальная работа выполнена в 2004-2007 годах на кафедре генетики и в Центре молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

Для изучения были взяты: 15 селекционных образцов яровой тритикале из коллекции кафедры генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; яровая гексаплоидная тритикале линия к-1242 без R/D-замещений; яровая гексаплоидная тритикале линия к-1185, несущая 2R/2D-замещение; один образец октаплоидной тритикале ПРАО-1, сорт яровой ржи Селенга, сорт озимой ржи Данковская золотистая, сорта яровой мягкой пшеницы Иволга и Chinese spring; *Aegilops tauschii*; *Ae. speltooidos*, *Triticum monococum*, пшеница твердая сорт Безенчукская янтарная и линия IG82775.

Изучение хромосомного состава линии яровой гексаплоидного тритикале 131/7 проводили с применением С-метода дифференциального окрашивания хромосом по методике, разработанной в лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии РАН (Бадаев и др., 1983; Badaev et al., 1990) с некоторыми модификациями.

Геномную *in situ* гибридизацию осуществляли по стандартной методике (Карлов с соав., 1999), с некоторыми модификациями. Анализ флуоресцентного сигнала был проведен на флуоресцентном микроскопе “Ахиорфот” (“Zeiss”, Германия) с соответствующей системой фильтров. Для анализа изображений, производили фотосъемку на пленку Fuji 400. После проявки пленку сканировали в компьютер и обрабатывали изображение, используя программу Photoshop CS.

ДНК выделяли из молодых проростков по методу Bernatzky и Tanksley (1986) с некоторыми модификациями.

Микросателлитный анализ образцов и картирование точки рекомбинации у линии 131/7 выполняли с помощью следующих SSR-маркеров: Xbarc271, Xbarc149, Xgwm349, Xbarc228, Xbarc1143, Xgwm539, Xgwm301, Xgwm102, Xgwm157, Xbarc168, Xgwm484, Xwmc111, Xgwm261, Xbarc270, Xbarc6, Xbarc1183,

Xbarc1148, Xgwm194, Xwmc285, Xbarc110, Xwmc233, Xbarc96, Xbarc1030, Xbarc53, Xwmc506, Xwmc317, Xwmc361, Xwmc332, Xgwm120, Xwmc441, Xbarc167, Xbarc1064, Xbarc1147, Xwmc498, Xwmc592, Xwmc477, Xbarc13, Xgwm429 (Röder et al., 1998, Somers, Isaac P, 2004, <http://wheat.pw.usda.gov>).

Идентификацию замещений в линиях тритикале проводили с помощью STS-маркера на локус Sec-2, локализованного в коротком плече 2R хромосомы.(Lee et al., 1994) и микросателлитных маркеров специфичных для хромосомы 2D.

Все праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол» (Москва).

Аmplификацию осуществляли на амплификаторах «Терцик» («ДНК-технология», Москва). Условия проведения амплификации были индивидуальны для каждого SSR-маркера. В некоторых случаях производили оптимизацию условий амплификации.

Продукты ПЦР разделяли в 2% агарозном геле с буфером TBE при напряженности поля 6 V/см. В качестве маркера молекулярного размера использовали «100 bp leader» (Fermentas).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Идентификация хромосомного состава линии яровой гексаплоидной тритикале 131/7

1.1 Разработка стратегии поиска генетического материала D-генома в геноме яровой тритикале

В процессе селекционно-генетических исследований, выполняемых на кафедре генетики РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева, создана коллекция яровой тритикале. Ранее для линии 131/7 методом геномной *in situ* гибридизации было показано, что она несет транслокацию пшеничной хромосомы в ржаную (Карлов с соавт., 2000). Однако хромосомы, вовлеченные в эту транслокацию, не идентифицированы. Данная линия была выбрана в качестве модельной для выработки стратегии по идентификации замещений и транслокаций в линиях яровой гексаплоидной тритикале. Линия является мейотически

стабильной, практически все микроспороциты в метафазе-I имели 21 закрытый бивалент (Соловьев, 2000). Это косвенно свидетельствует о наличии в ее геноме хромосом или участков хромосом D-генома.

На основе литературных данных нами были подобраны микросателлитные маркеры на каждое плечо хромосом D-генома (Röder et al., 1998). По результатам анализа амплификации этих маркеров было установлено, присутствие SSR-маркеров, специфичных для хромосомы 2D в геноме линии 131/7. На рис. 1 и 2 представлены результаты электрофоретического разделения продуктов амплификации микросателлитных маркеров Xgwm349 и Xwmc111, соответственно специфичных для длинного и короткого плеча хромосомы 2D.

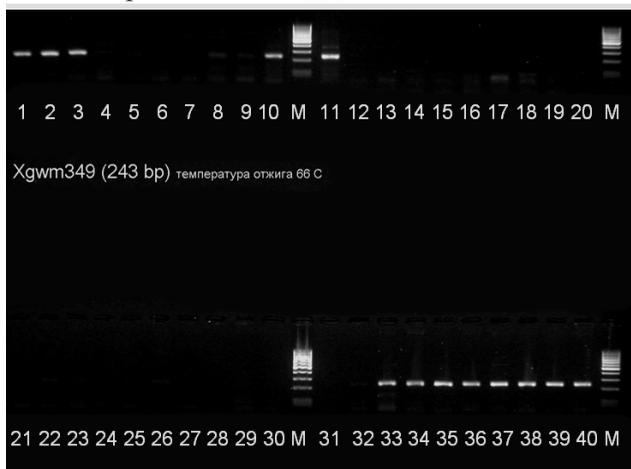


Рис. 1. 1, 2 – мягкая пшеница сорт Иволга; 3 – октаплоидная тритикале сорт ПРАО-1; 5, 6, 7, 8 – твердая пшеница сорт Безенчукская янтарная; 8, 9 – твердая пшеница линия IG-82775; 10, 11 – гибрид F₁ линия 131/7 × яровая рожь сорт Селенга; 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – озимая рожь Данковская золотистая; 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 – яровая рожь сорт Селенга; 31, 32 – гексаплоидная тритикале к-1242, 33, 34 – гексаплоидная тритикале линия к-1185; 35, 36, 37, 38, 39, 40 – гексаплоидная тритикале линия 131/7, М – маркер молекулярного размера (100 bp ladder).

Маркеры присутствовали в данной линии, гибриде с ее участием, в образцах мягкой пшенице сорте Иволга и октаплоидной тритикале линии ПРАО-1, несущих D-геном, а

также образце гексаплоидной тритикале к-1185, у которого имеется 2R/2D замещение. У форм пшеницы, тритикале и ржи, у которых геном D отсутствует, продуктов амплификации выявлено не было. Других хромосом генома D в линии 131/7 не выявлено (таблица 1).

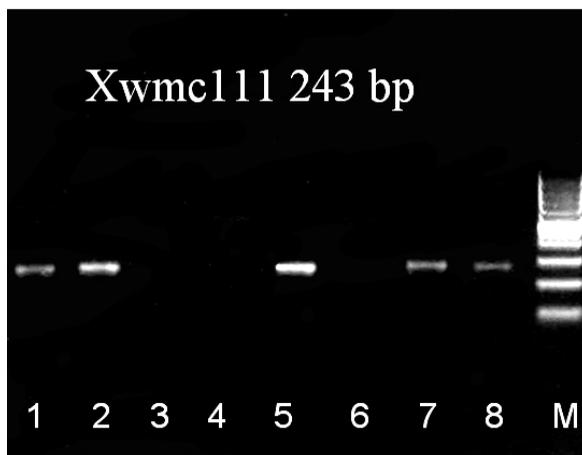


Рис.2. 1 – мягкая пшеница сорт Иволга; 2 – октаплоидная тритикале сорт ПРАО-1; 3 – гексаплоидная тритикале линия к-1242; 4 – твердая пшеница сорт Безенчукская янтарная; 5 – гексаплоидная тритикале линия к-1185; 6 – гексаплоидная тритикале линия к-1242; 7 – гексаплоидная тритикале линия 131/7; 8 – гибрид F₁ линия 131/7 × яровая рожь сорт Селенга, М – маркер молекулярного размера (100 bp ladder).

Таким образом, с использованием набора SSR-маркеров, специфичных для хромосом D-генома, установлено присутствие в геноме линии тритикале 131/7 генетического материала хромосомы 2D. Данные, полученные на линии к-1185, для которой 2R/2D замещение было установлено ранее (Соловьев, 2000), подтверждают эффективность и корректность выбранной нами стратегии.

Для дальнейшего изучения линии 131/7 были использованы микросателлитные маркеры, специфичные для хромосомы 2D, распределенные по всей хромосоме, и удовлетворяющие условию отсутствия перекрестной амплификации на других пшеничных и ржаных хромосомах (табл. 2). Данное условие связано с тем, что в родословной этой линии

присутствуют неизвестные образцы тритикале. Это не позволяет использовать высокий полиморфизм микросателлитных маркеров для определения участия родительских геномов в формировании линии.

Таблица 1.

Результаты амплификации микросателлитных маркеров, специфичных для D-генома у линии тритикале 131/7

Локализация	SSR-маркер	Наличие амплификации	Локализация	SSR-маркер	Наличие амплификации
1DL	Xbarc271	-	4DS	Xwmc285	-
1DS	Xbarc149	-	5DL	Xbarc110	-
2DL	Xgwm349	+	5DS	Xwmc233	-
2DS	Xwmc111	+	6DL	Xbarc1030	-
3DL	Xbarc270	-	6DS	Xbarc196	-
3DS	Xbarc6	-	7DL	Xbarc53	-
4DL	Xbarc1183	-	7DS	Xwmc506	-

Примечание: здесь и далее + маркер присутствует, -- маркер отсутствует.

Таблица 2.

Результаты амплификации микросателлитных маркеров, специфичных для хромосомы 2D у линии тритикале 131/7

SSR-маркер	Xwmc111	Xgwm261	Xgwm484	Xbarc168	Xgwm102	Xgwm157	Xbarc228	Xgwm539	Xgwm349	Xgwm301	Xbarc1143
Локализация*	11,0	23,3	40,7	46,7	48,2	73,1	81,0	90,9	93,2	107,0	**
Наличие амплификации	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Примечание: * – локализация маркеров дана по карте сцепления Wheat, Consensus, SSR, 2004.

**Xbarc1143 – физически картирован Gill и Singh в локусе 2DL3~9.

Анализ результатов показал наличие практически всех отобранных маркеров. Отсутствие амплификации маркера Xbarc228 может быть объяснено присутствием нуль-аллеля по

данному маркеру, либо наличием микроделеции в месте его локализации.

Использование маркеров, специфичных для хромосомы 2D, распределенных по всей ее длине, позволило установить присутствие в геноме линии 131/7 целой хромосомы 2D.

1.2 Идентификация ржано-пшеничной транслокации

Геномной *in situ* гибридизацией показано наличие в геноме линии 131/7 28 пшеничных хромосом, 12 ржаных и одной пары транслоцированных хромосом. Транслокация включает короткое плечо, центромеру, и часть длинного плеча ржи, и часть длинного плеча пшеницы. Линия мейотически стабильна. В связи с этим нами было высказано предположение, что произошло замещение одной пары пшеничных хромосом А или В генома на пару 2D хромосом, а заместившаяся пара участвует в транслокации в ржаную хромосому. Для подтверждения этой гипотезы нами было проведено совмещение дифференциального окрашивания с геномной *in situ* гибридизацией линии 131/7 (рис. 3).

Было выявлено, что у транслоцированной хромосомы длинное плечо представлено на ~ 80% материалом пшеницы, а на ~ 20% материалом ржи. Нами четко установлен рисунок дифференциального окрашивания транслоцированной хромосомы. Гетерохроматиновые бэнды в этой хромосоме располагаются в следующем порядке: относительно крупный теломерный бэнд ржаного гетерохроматина в коротком плече, слабый бэнд в проксимальной части длинного плеча в пограничной области, пара средних бэндов пшеничного гетерохроматина (при высокой конденсации хромосом сливающихся в один) в середине длинного плеча.

После анализа рисунка дифференциального окрашивания хромосом нами определено, что в геноме линии 131/7 присутствует замещение 2В хромосомы на 2D хромосому и транслокация длинного плеча хромосомы 2В в хромосому 2R.

Кариотип яровой гексаплоидной тритикале полученный методом С-бэндинга представлен на рисунке 4.

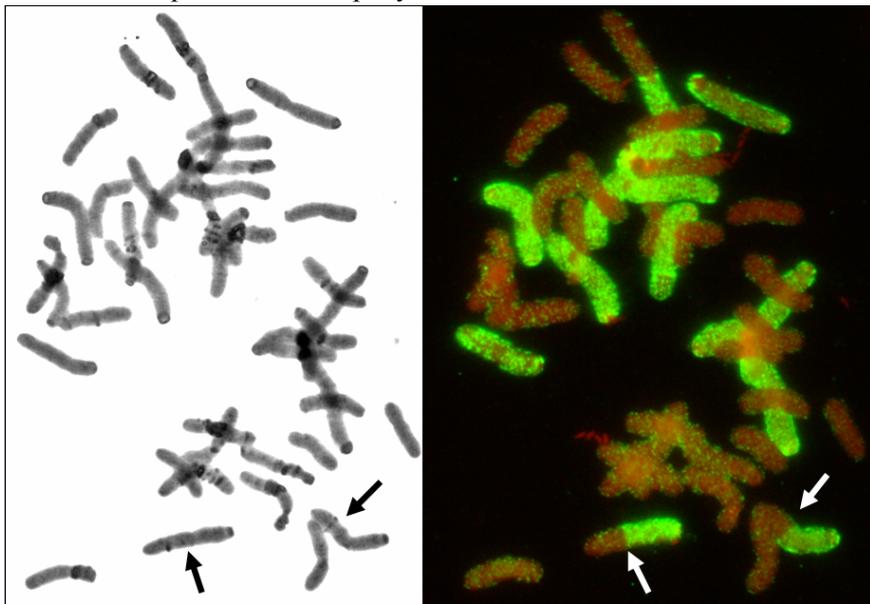


Рис. 3. Совмещение дифференциального окрашивания и гибридизации *in situ* на одной и той же метафазной пластинке хромосом линии тритикале 131/7 (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный).

Применение только цитологических маркеров для характеристики хромосом не может полностью исключить ошибок в процессе получения и идентификации генетического материала (Devos et al., 2000, Pestsova et al., 2000; Salina et al., 2003). Для проверки данных, полученных методом совмещения С-бэндинга и геномной *in situ* гибридизации, а так же для картирования точки рекомбинации пшеничного и ржаного хроматина, нами были подобраны следующие микросателлитные маркеры на длинное и короткое плечи 2В хромосомы: Xwmc317, Xwmc361, Xwmc332, Xgwm120, Xwmc441, Xbarc167, Xbarc1064, Xbarc1139, Xwmc592, Xwmc477, Xbarc13, Xgwm429 (рис. 5).

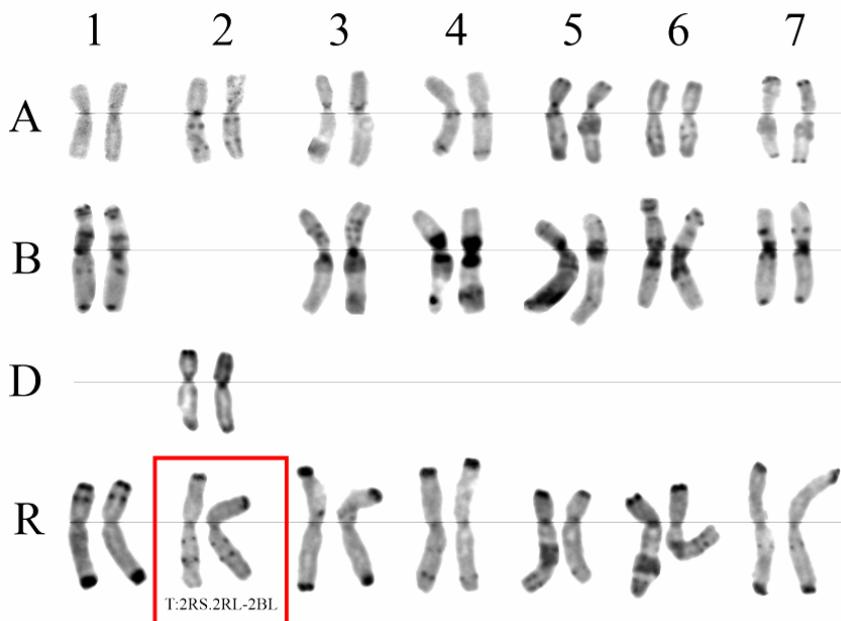


Рис. 4. Кариотип дифференциально окрашенных хромосом линии тритикале 131/7.

Маркеры Xwmc317, Xwmc361, Xwmc332, Xgwm120, Xwmc441, Xbarc167, Xbarc1064, Xbarc1147, локализованные на длинном плече хромосомы 2В, присутствовали в геноме линии 131/7. Маркеры Xwmc592, Xwmc477, Xbarc13, Xgwm429 отсутствовали в геноме линии 131/7 (рис. 6).

Таким образом, точка рекомбинации находится между маркерами Xwmc592, локус 63,9 сМ, и Xwmc441, локус 76,8 сМ, по карте сцепления (Wheat, Consensus SSR, 2004 NA-SSR-2004-2B, <http://wheat.pw.usda.gov>). По физической карте (Wheat, Physical, SSR, <http://wheat.pw.usda.gov>) точка рекомбинации располагается в районе C-2BL2-0.36.

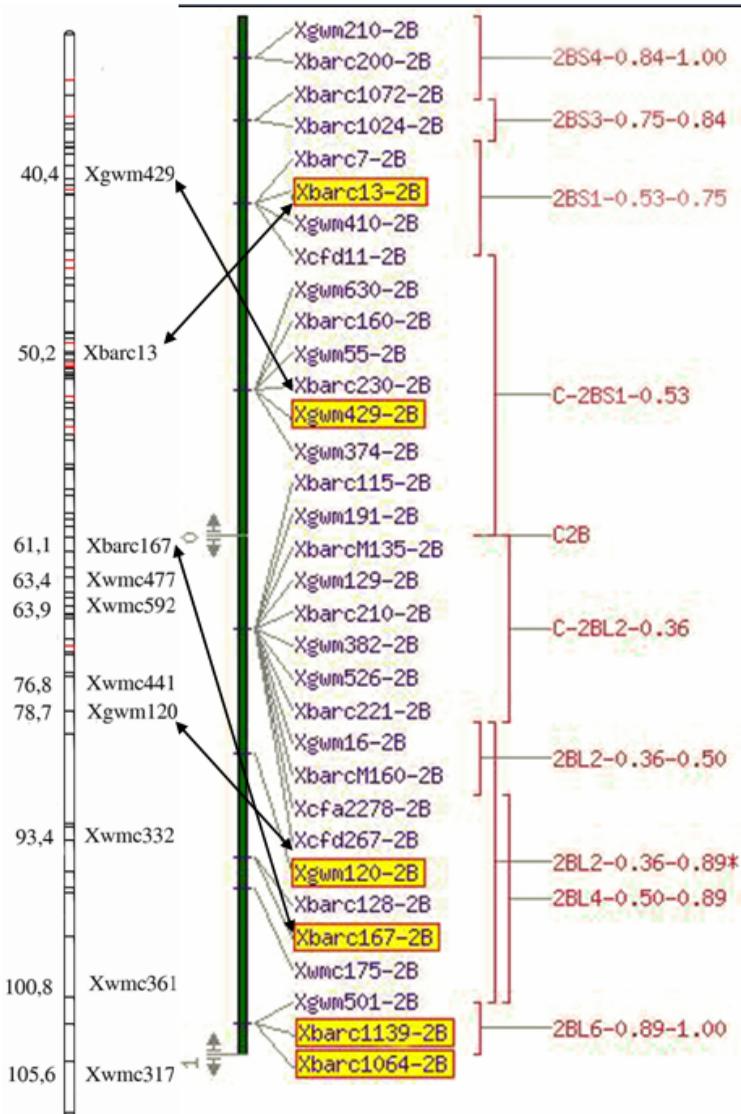


Рис. 5. Расположение микросателлитных маркеров на хромосоме 2B, используемые в нашей работе: по карте сцепления Wheat, Consensus, SSR, 2004 (слева) и по физической карте Wheat, Physical, SSR (справа, отмечены цветом). Стрелками отмечены маркеры, локализованные на обеих картах. (<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>).

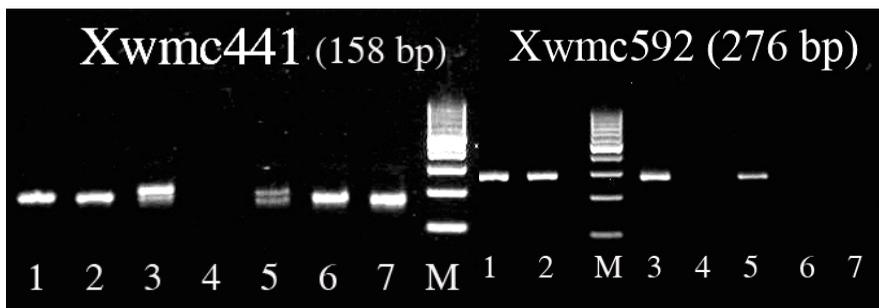


Рис. 6. 1 – мягкая пшеница Иволга; 2 – мягкая пшеница Chinese spring; 3 – твердая пшеница сорт Безенчукская янтарная; 4 – яровая рожь сорт Селенга; 5 – гексаплоидная тритикале к-1242; 6, 7 – гексаплоидная тритикале линия 131/7, М – маркер молекулярного размера (100 bp lader).

Таким образом, в линии тритикале 131/7, наряду с замещением 2В/2D, присутствует транслокация 2RS.2RL-2BL.

2. Цитогенетическая характеристика линий яровой тритикале

Для цитогенетического изучения из коллекции отобраны линии, контрастные по показателю селекционной ценности, а так же образцы к-1433, PI-587512.

2.1 Выявление генетического материала генома D в линиях яровой тритикале

Первым этапом был скрининг отобранных линий по микросателлитным маркерам, специфичным для всех плеч хромосом D-генома. В результате анализа у семи линий выявлено наличие продуктов амплификации по специфичным маркерам для хромосомы 2D. С использованием специфичными для этой хромосомы маркерами – Xbarc228, Xbarc1143, Xgwm539, Xgwm301, Xgwm102, Xgwm157, Xbarc168, Xgwm484, Xwmc111, Xgwm261 показано наличие у семи линий целой хромосомы 2D.

2.2. Идентификация замещений хромосом у тритикале с использованием геномной *in situ* гибридизации

Геномная гибридизация *in situ* является удобным методом выявления замещения хромосом и межгеномных транслокаций у аллополиплоидов. Цитологический анализ этих линий показал, что

все они являются гексаплоидными. На семи образцах к-1433, Л-22, Л-26, Л-8-1, Л-8-3, Л-8-4, Л-8-6, у которых микросателлитным анализом показано наличие в геноме хромосомы 2D была проведена геномная *in situ* гибридизация. В кариотипах линий к-1433, Л-26, Л-8-1, Л-8-3 выявлено присутствие 12 ржаных хромосом и 30 пшеничных хромосом (рис. 7).

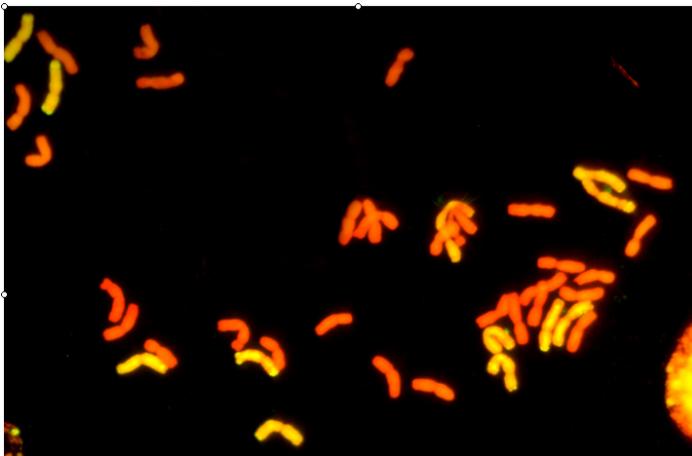


Рис. 7. Геномная *in situ* гибридизация на метафазной пластинке хромосом линии к-1433 (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный).

Для образцов Л-8-4 и Л-8-6 установлено расщепление по числу ржаных хромосом. У них присутствуют растения, несущие замещение одной пары ржаных хромосом на пару хромосом 2D (рис. 8.1), растения несущие 14 хромосом ржи и 28 хромосом пшеницы (рис. 8.3), и их гибриды, несущие 13 ржаных хромосом и 29 хромосом пшеницы (рис. 8.2).

Установлено, что образец Л-22 является гексаплоидной, и несет в своем геноме 12 ржаных хромосом и 30 пшеничных, то есть является замещенной. В то же время у данного образца обнаружено растение, геномный состав которого переставляет собой совокупность 11 ржаных и 30 пшеничных хромосом. У этого растения также встречались метафазные пластинки разного геномного состава: 11 ржаных + 1 ржаной

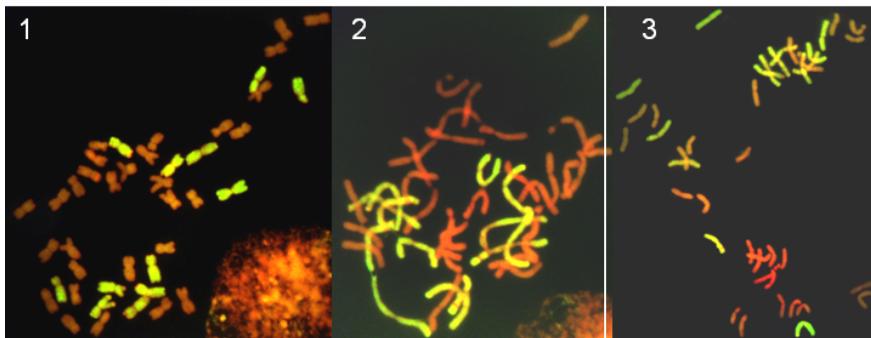


Рис. 8. Геномная *in situ* гибридизация на метафазных пластинках хромосом образца тритикале Л-8-6. (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный).

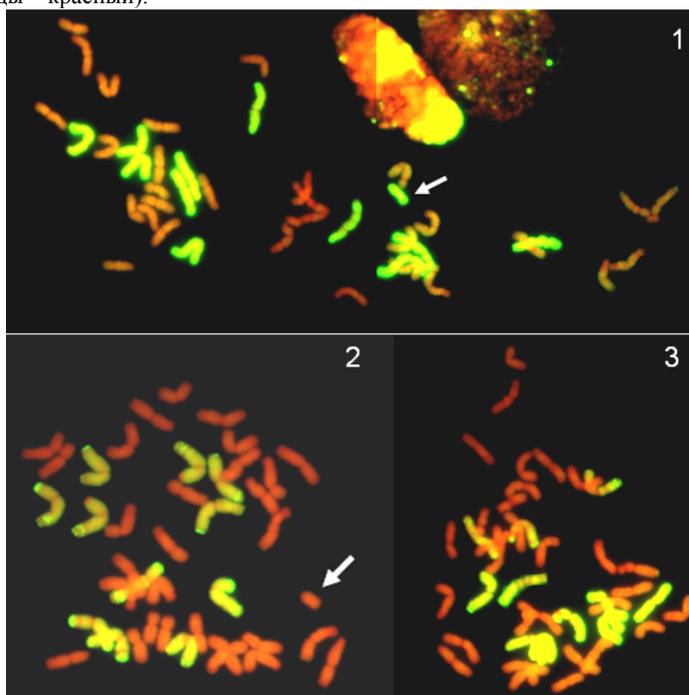


Рис. 9. Геномная *in situ* гибридизация на метафазных пластинках хромосом образца тритикале Л-22. (генетический материал ржи имеет желтый цвет, пшеницы – красный, стрелками указаны телоцентрики). телоцентрик и 30 пшеничных; 11 ржаных и 29 пшеничных + 1 пшеничный телоцентрик (рис. 9). Данный факт свидетельствует о

цитогенетической нестабильности образца Л-22 и присутствия в ней растений-мозаиков по числу и набору хромосом, что может быть использовано в дальнейших цитогенетических исследованиях.

Таким образом, установлено, что линии к-1433, Л-26, Л-8-1, Л-8-3, Л-22 являются замещенными, а образцы Л-8-4 и Л-8-6 представляют собой совокупность как замещенных так и не замещенных форм.

2.3. Идентификация 2R/2D-замещения у линий яровой тритикале

Для выявления замещения хромосомы 2R на хромосому 2D использовали молекулярный STS-маркер на локус запасного белка Sec-2, картированного в коротком плече хромосомы 2R.

Таблица 5.

Результаты амплификации микросателлитных маркеров Xbarc228 и Xgwm301 (пояснения в тексте)

Линия	Xbarc228	Xgwm301
к-1433	-	-
Л-8-4	+	-
Л-8-6	+	-
Л-26	+	+
Л-8-1	+	+
Л-8-3	+	-
Л-12	+	+
к-1185	+	-
131/7	-	+

Амплификация с этим маркером показала, что в линиях к-1433, Л-26, Л-8-1, Л-8-3, Л-22 локус Sec-2 отсутствует. У образцов Л-8-4 и Л-8-6 показано присутствие локуса Sec-2 на отдельных растениях. Эти данные в сочетании с результатами

микросателлитного анализа и геномной *in situ* гибридизации, позволяют сделать заключение о присутствии 2R/2D-замещения у линий к-1433, Л-26, Л-8-1, Л-8-3, Л-22 и расщепление по этим хромосомам у линий Л-8-4 и Л-8-6. У некоторых линий выявлены нуль-аллели для микросателлитных маркеров Xbarc228, Xgwm301 (табл. 5). Можно сделать вывод о том, что в 2R/2D-замещениях у линий яровой тритикале из коллекции кафедры генетики РГАУ-МСХА имени К.А.Тимирязева участвуют минимум четыре типа не идентичных друг другу хромосомы 2D (в таблице все типы по микросателлитным маркерам выделены разными оттенками серого цвета).

ВЫВОДЫ

1. Разработанная методика скрининга, основанная на совместном использовании дифференциального окрашивания хромосом, микросателлитного анализа и геномной гибридизации *in situ*, позволяет проводить эффективное выявление замещений и межгеномных транслокаций у тритикале.
2. Линия яровой тритикале 131/7 несет 2B/2D-замещение и 2RS.2RL.-2BL-транслокацию. Длинное плечо транслоцированной хромосомы представлено материалом хромосомы 2B, короткое плечо, центромера и часть длинного плеча – генетическим материалом хромосомы 2R.
3. Линии яровой тритикале PI587512, Л-12, S-17, Л-24, S-17-4, 131/16-2, Л-13, Л-15 являются гексаплоидами и не имеют хромосом генома D.
4. Линии и образец яровой тритикале Л-26, Л-8-1, Л-8-3, Л-22, к-1433 имеют замещение 2R/2D в отсутствие остальных хромосом D-генома.
5. Селекционные образцы Л-8-4 и Л-8-6 являются гексаплоидными. Выявлено расщепление по замещению хромосом среди растений этих образцов. Присутствуют

растения, несущие замещение одной пары 2R-хромосом на пару 2D-хромосом, растения, несущие 14 хромосом ржи и 28 хромосом пшеницы, и их гибриды, несущие 13 ржаных хромосом и 29 хромосом пшеницы.

6. На основании анализа амплификации микросателлитных маркеров выявлены четыре типа хромосомы 2D, вовлеченных в замещение у линий яровой тритикале из коллекции кафедры генетики РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева.

РЕКОМЕНДАЦИИ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для быстрого поиска замещенных и транслоцированных форм тритикале с участием генома D рекомендуется использование разработанной методики скрининга коллекции с использованием отобранных микросателлитных маркеров.
2. Оптимизированный метод совмещения дифференциального окрашивания и геномной гибридизации *in situ*, рекомендуется для идентификации ржано-пшеничных транслокаций.

ПУБЛИКАЦИИ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Соловьев А.А., Карлов Г.И., **Дивашук М.Г.**, Базалеев Н.А. Морфологическая и цитогенетическая характеристика транслоцированной линии яровой тритикале 131/7 (Morphological and Cytogenetic Characterization of Translocated Spring Triticale Line 131/7) // Acta Agriculturae Serbica. – 2005. – Vol. X. – № 19. – P. 17-25. (на английском языке)
2. **Дивашук М.Г.**, Базалеев Н.А. Морфологическая и цитогенетическая характеристика линии яровой тритикале 131/7 с транслокацией (Morphological and Cytogenetic Characterization of Translocated Spring Triticale Line 131/7) // Review of scientific papers of the students of agronomy. – Casak, 2005. – P. 21-23. (на английском языке)
3. **Дивашук М.Г.**, Базалеев Н.А., Соловьев А.А. Цитогенетическая характеристика линии тритикале 131/7. // «Кариология, кариосистематика и молекулярная филогения растений» – Тезисы докладов и стендовых сообщений V Международного совещания и Школы молодых ученых по кариологии, кариосистематике и молекулярной систематике растений, г. Санкт Петербург, 12-15 октября 2005 г. – Санкт-Петербург, 2005. – С. 30.
4. **Дивашук М.Г.**, Карлов Г.И., Соловьев А.А. Использование микросателлитных маркеров для идентификации пшенично-ржаных транслокации у гексаплоидной тритикале. // Известия ТСХА. – 2007. – Вып. 1. – С. 61-65.