

Идентификация чужеродной хромосомы 2 вида *Gossypium barbadense* L. в беккроссных потомствах хлопчатника с помощью двойного скрининга

М.Ф. Санамьян^{1*}, Ш.У. Бобохужаев¹, Ш.С. Абдукаримов²

¹ Национальный университет Узбекистана, Ташкент, Республика Узбекистан

² Центр геномики и биоинформатики Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент, Республика Узбекистан

* sanam_marina@rambler.ru

Цель: анализ беккроссных гибридов (BC_1F_1 и BC_2F_1) с участием моносомных линий с нехваткой хромосомы 2 A_1 -субгенома с целью выяснения особенностей поведения чужеродной хромосомы в процессе беккроссирования для получения линий с чужеродным замещением *G. hirsutum* L./*G. barbadense* L.

Материалы и методы: Три моносомные линии (Mo11, Mo16, Mo19) с нехваткой хромосомы 2 A_1 -субгенома хлопчатника *G. hirsutum* L. были получены в M_1 (в дозе 20, 25 и 25 Gt соответственно), а одна линия (Mo93) – в M_3 после облучения пыльцы в дозе 10Gr. Молекулярно-генетический скрининг проводился на стадии проростков, где геномную ДНК выделяли из молодых листочков беккроссных проростков методом СТАВ. Продукты ПЦР визуализировали в 3,5% агарозном геле высокого разрешения, окрашивали бромистым этидием и фотодокументировали с помощью системы документирования геля Alpha Imager. Отсутствие продуктов амплификации SSR-маркеров, локализованных на хромосоме 2 вида *G. hirsutum*, и присутствие маркеров хромосомы 2 вида *G. barbadense* оценивали как замещение соответствующей хромосомы хлопчатника гомеологичной хромосомой вида *G. barbadense*. Цитогенетический анализ беккроссных гибридов проводили с помощью анализа МКП после окраски железом-ацетокармином. На давленных препаратах на стадии МІ учитывали характер конъюгации хромосом. Для анализа стадии спорад анализировали по три бутона от каждого растения и подсчитывали процент нормальных тетрад от общего количества спор. Фертильность пыльцы оценивали после окраски в ацетокармине, путем анализа 10 полей зрения с каждого цветка. Для анализа препаратов, создания изображений использовали световой микроскоп AxioScopeA1 с цифровой фотокамерой MikroskopkameraAxioCamERc5s.

Результаты: Молекулярно-генетический анализ беккроссных проростков с помощью молекулярных маркеров (SSR) был выполнен у растений BC_1F_1 с участием четырех линий с нехваткой хромосомы 2 A_1 -субгенома (Mo11, Mo16, Mo19 и Mo93). В результате изучения пяти беккроссных семей в варианте BC_1F_1 (Mo11x F_1 (766₃)) был обнаружен один проросток (494₂); анализ других пяти семей в варианте BC_1F_1 (Mo16x F_1 (98₆)) выявил семь проростков; исследование одной семьи в варианте BC_1F_1 (Mo19x F_1 (769₄)) определило один проросток (8₈); тогда как в четырех семьях варианта BC_1F_1 (Mo93x F_1 (516₄)) выявилось девять проростков, которые характеризовались присутствием аллелей только от *G. barbadense*, тогда как аллели вида *G. hirsutum* отсутствовали, что было обнаружено при получении ПЦР-продуктов в результате амплификации хромосом-специфичных SSR-маркеров. Однако изучение проростков из двух семей BC_2F_1 в варианте BC_2F_1 (Mo16x BC_1F_1 (923₇)) обнаружило присутствие хромосом-специфичных аллелей только от *G. hirsutum*, тогда как аллели *G. barbadense* отсутствовали, что указало на отсутствие замещения хромосомы 2 у этих проростков, тогда как SSR-анализ одного проростка из двух семей в варианте BC_2F_1 (Mo93x BC_1F_1 (88₄)) выявил присутствие аллелей от *G. barbadense*, а аллели вида *G. hirsutum* не были обнаружены, что подтвердило замещение хромосомы 2 у этого проростка. Анализ метафазы I мейоза у 16 моносомиков BC_1F_1 показал модальную конъюгацию хромосом с 25 бивалентами и одним унивалентом большого размера, а такой же анализ у семи моносомиков BC_2F_1 в двух вариантах скрещиваний указал, что шесть моносомиков в варианте BC_2F_1 (Mo16x BC_1F_1 (923₇)) с унивалентными хромосомами *G. hirsutum* и один моносомик из варианта BC_2F_1 (Mo93x BC_1F_1 (88₄)) с унивалентной хромосомой *G. barbadense* не имели различий по конъюгации хромосом. Большинство моносомиков BC_1F_1 отличалось высоким мейотическим индексом, что указало на регулярное расхождение унивалентных хромосом. Однако один моносомик с унивалентной хромосомой *G. hirsutum* в варианте BC_1F_1 (Mo16x F_1 (98₆)) и другой – с замещением хромосомы 2 в варианте BC_1F_1 (Mo93x F_1 (516₄)) продемонстрировали снижение мейотического индекса (до 88,57±1,13) и увеличение числа тетрад с микроядрами (до 5,15±0,78%). Это указало на нарушения в расхождении хромосом и формировании несбалансированных гамет у моносомиков BC_1F_1 с замещением хромосомы 2 или ее отсутствием. У многих моносомиков BC_1F_1 наблюдалось снижение фертильности пыльцы после окраски ацетокармином (до 62,65±2,15%) и только два моносомика с отсутствием замещения хромосомы 2 имели высокую фертильность. Изучение моносомиков BC_1F_1 показало, что замещение хромосомы 2 A_1 -субгенома хлопчатника *G. hirsutum* на хромосому вида *G. barbadense* привело к карликовости и снижению жизнеспособности, поскольку они характеризовались медленным ростом и отсутствием цветения в первый год вегетации.

Выводы: Снижение скрещиваемости и завязываемости беккроссных семян было обусловлено их снижением у исходных моносомных линий вследствие присутствия большого количества нуллисомных гамет. Уровень передачи чужеродных хромосом варьировал от 3,13 (Mo11) до 42,86% (Mo93) в поколении BC_1F_1 и до 12,50 (Mo93) в поколении BC_2F_1 , где только с участием двух линий были получены моносомики из-за задержки цветения и плодоношения в первый год вегетации у двух других. Высокая частота элиминации хромосомы 2 у беккроссных моносомиков с участием линии Mo16 (54,55) указала на влияние конкретного генотипа на этот процесс. Использование SSR-маркеров на стадии проростков позволяло проводить эффективный скрининг присутствия чужеродной хромосомы в последовательных беккроссах, что значительно ускорило и облегчало весь процесс.

Финансирование: Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства высшего образования, науки и инноваций РУз проекта Ф-ОТ-2021-155.