

УДК 6333.1:631.523

UDC 6333.1:631.523

**ОЦЕНКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ
МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ
МАТЕРИАЛОМ *Agropyron glaucum* ПО
УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ
РЖАВЧИНЕ**

**EVALUATION OF COMMON WHEAT
INTROGRESSION LINES WITH GENETIC
MATERIAL *Agropyron glaucum* FOR LEAF
RUST RESISTANCE**

Давоян Ованес Румикович
аспирант

Davoyan Ovanes Rumikovich
postgraduate student

Бебякина Ирина Викторовна
к.б.н.

Bebyakina Irina Viktorovna
Cand.Biol.Sci

Давоян Эдвард Румикович
к.б.н.

Davoyan Edvard Rumikovich
Cand.Biol.Sci

Зинченко Александра Николаевна

Zynchenco Aleksandra Nikolayevna

Давоян Румик Оганесович
д.б.н.
КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко
Россельхозакадемии, Краснодар, Россия

Davoyan Rumik Ovanesovich
Dr.Sci.Biol.
Krasnodar agricultural research institute by name
P.P. Lukianenko RAAS, Krasnodar, Russia

В результате оценки 24 интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Agropyron glaucum* выявлено значительное разнообразие по устойчивости к листовой ржавчине. С использованием гибридологического анализа изучен генетический контроль устойчивости линий 60 и 109. Обе линии имеют по одному доминантному гену, различающимся между собой и от известных эффективных генов *Lr19* и *Lr24*. Изученные линии являются ценными донорами генов устойчивости к листовой ржавчине пшеницы

As result of evaluation 24 common wheat introgression lines with genetic material *Agropyron glaucum* the considerable variability of resistance to leaf rust was revealed. Genetic control of leaf rust in introgression lines 60 and 109 was studied using hybridological analysis. Both lines contained single dominant genes differed from each other and from the known effective *Lr19* and *Lr24*. The investigated lines with genetic material *Agropyron glaucum* are valuable donors of the genes for leaf rust resistance

Ключевые слова: МЯГКАЯ ПШЕНИЦА, *Agropyron glaucum*, ИНТРОГРЕССИВНЫЕ ЛИНИИ, ЛИСТОВАЯ РЖАВЧИНА, УСТОЙЧИВОСТЬ, ГЕНЫ УСТОЙЧИВОСТИ

Keywords: SOFT WHEAT, *Agropyron glaucum*, INIRIGRESSIV LINES, LEAF RUST, RESISTANCE, RESISTANCE GENES

Листовая ржавчина (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. tritici Erikss.et Henn) является одной из самых распространенных и вредоносных болезней пшеницы. Наиболее эффективный и экономичный путь решения этой проблемы - создание устойчивых сортов.

Эта работа, ориентированная на длительную устойчивость, включает ряд программ: получение полигенных и мультилинейных сортов; использование континентальной их мозаики. Каждая из них специфична, но вместе с тем они имеют общую особенность - для осуществления любой

из этих программ необходимо иметь как можно большее разнообразие эффективных генов устойчивости.

Значительным генетическим резервом устойчивости к болезням обладают виды рода *Agropyron*. Широкая адаптация в разных экогеографических зонах делает этот род источником большого генетического разнообразия.

Пырей сизый *Agropyron glaucum* - ценный источник генов устойчивости к листовой и жёлтой ржавчине, мучнистой росе, морозостойкости, выносливости к засолению [1,2,3].

Одним из способов передачи полезных генов от дикого вида в мягкую пшеницу является создание и использование синтетического амфидиплоида в котором один из геномов мягкой пшеницы замещён на геном дикого сородича. Возможность замены субгенома D мягкой пшеницы на геномы других видов впервые показали Кербер и Дик [4].

В лаборатории цитогенетики КНИИСХ, под руководством Е. Г. Жирова был разработан оригинальный подход по перестройке генома мягкой пшеницы. Путём замещения генома твердой пшеницы на геномы AABB мягкой были получены тетраплоидные компоненты сортов Аврора, Саратовская 29 и Кальянсона. С использованием тетракомпонентов были созданы новые синтетические геномно-замещенные формы, у которых геном D мягкой пшеницы был замещен соответственно на геномы *Ae. speltoides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata*, *S. cereale* и *Ag. glaucum*, *T. boeoticum*, *T. sinskajae* [5].

Для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Agropyron glaucum* использовался 76-хромосомный нестабильный амфидиплоид (Аврокум), объединяющий в себе геномы А и В мягкой пшеницы сорта Аврора, часть (шесть) хромосом генома D этого сорта и полный набор хромосом *Ag. glaucum* ($2n = 42$).

Методика. Исходным материалом служили линии мягкой пшеницы с хромосомами *Ag. glaucum*, полученные от скрещивания 76-ти хромосомного амфидиплоида и восприимчивого к листовой ржавчине сорта Аврора.

Для цитологического анализа линий проводился подсчет числа хромосом в соматических клетках, который выполнялся на временных давленных препаратах кончиков первичных корешков, приготовленных по методу Ванинге [6]. Конъюгацию хромосом в мейозе изучали в материнских клетках пыльцы (МКП). Пыльники фиксировали и окрашивали в ацетокармине (Паушева, 1988), либо в уксуснокислом гематоксилине (Щербитченко, 1981). Цитологические исследования выполняли на микроскопе Laboval 4 Karl Zeiss при увеличении 10 x 10; 40 x 10; 100 x 10 раз.

Заражение проводили в фазу колошения популяцией листовой ржавчины. Оценку на устойчивость проводили по шкале Мейнса и Джексона [7] тогда, когда развитие болезни на восприимчивом сорте достигало максимальной величины. Растения с промежуточным типом реакции от 0 до 1 обозначали баллом 01. К устойчивым относили растения с баллом поражения от 0 до 2, к восприимчивым от 3 до 4.

Генетическую природу устойчивости к листовой ржавчине определяли на основе гибридологического анализа.

Для проведения гибридологического анализа исследуемые линии были скрещены с восприимчивым сортом Аврора, между собой и линиями с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr19* и *Lr24*. Гибридологический анализ проводили на взрослых растениях. Гибридные растения F₂ высевались на делянки из 6 рядков. В каждом рядке было от 20 до 30 растений. Каждый третий рядок в делянке засевался в качестве

контроля восприимчивым сортом. Полученные данные F₂ обрабатывали с использованием критерия χ^2 .

Результаты.

В результате скрещивания амфидиплоида Аврокум с восприимчивым сортом Аврора, последующих беккроссов и самоопылений гибридного потомства была получена популяция интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ag.glaucum* [8].

Поскольку главной задачей являлось передача устойчивости к листовой ржавчине от *Ag. glaucum* мягкой пшенице, нами была проведена оценка 24 ранее не изученных интрогрессивных линий по устойчивости к этому патогену.

Одним из основных условий применения интрогрессивных линий в качестве доноров является их цитологическая стабильность, поскольку она тесно связана с нормальным онтогенезом растений. Очень важно также, в каком виде генетический материал с необходимыми признаками от дикого вида привнесен в геном мягкой пшеницы (дополненные хромосомы, замещенные хромосомы, транслокации или рекомбинации).

В связи с этим, был проведен цитологический анализ изучаемых линий. Анализ показал, что из 24 линий 23 имеют стабильный мейоз и формируют MI мейоза 21 бивалент.

Высокая доля мейотически стабильных линий связана с тем, что для передачи генетического материала *Ag. glaucum* использовали беккроссы с мягкой пшеницей, чередуя их с самоопылением.

При ассоциации в мейозе 21^{II} можно предположить наличие замещенных хромосом. Такие растения должны быть исследованы на присутствие в их геноме чужеродных хромосом. Не исключена

возможность и получения растений с транслокациями. Косвенным доказательством наличия определенной(ых) пырейных хромосом можно считать устойчивость такого растения к листовой ржавчине или мучнистой росе, не свойственную сорту Аврора.

Оценка линий по устойчивости выявила полиморфизм в реакции растений на поражение листовой ржавчиной (табл.1). Были идентифицированы линии с разным типом реакции растений на поражение: высокоустойчивые с типом реакции 01 и 1; среднеустойчивые (тип реакции 2); средне-(3) и сильно восприимчивые (4). В целом из 24 линий высокую устойчивость к листовой ржавчине проявили 10 (41%): 60, 109, 126, 127, 133, 139, 149, 157, 179 и 181. К среднеустойчивым относятся линии 1, 57, 119 и 151.

Также было выявлено 5 линий (37, 49, 89, 103, 124) с гетерогенным типом реакции, у которых на фоне высокой устойчивости (тип реакции 1) проявляются единичные пустулы с типом реакции 3. Линии 7, 19, 25, 31 и 71 восприимчивы к местной популяции листовой ржавчины.

Широкий полиморфизм линий по устойчивости к листовой ржавчине может свидетельствовать либо о множественных интрогрессиях генетического материала *Ag. glaucum* в геном мягкой пшеницы сорта Аврора, либо об интрогрессии определенных транслокаций в разные хромосомы.

В настоящее время известно о передаче 4 генов устойчивости к листовой ржавчине из рода *Agropyron* в мягкую пшеницу. От вида *A. elongatum* переданы гены устойчивости *Lr19*, *Lr24* и *Lr29*, которые локализованы соответственно в длинном плече хромосомы 7D, в длинном плече хромосомы 3D и коротком плече хромосомы 7D. От вида *A. intermedium* в хромосому 2AL передан ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr38*.

Таблица 1–Устойчивость к листовой ржавчине интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ag. glaucum*

Линия	Число хромосом	Ассоциация хромосом в МI мейоза	Тип реакции, балл
1	42	21 ^{II}	2
7	42	21 ^{II}	3
19	42	21 ^{II}	3
25	42	21 ^{II}	3
31	42	21 ^{II}	4
37	42	21 ^{II}	1/3
49	42	21 ^{II}	1/3
57	42	21 ^{II}	2
60	42	21 ^{II}	01
71	42	21 ^{II}	4
89	42	21 ^{II}	1/3
103	42	21 ^{II}	1/3
109	42	21 ^{II}	01
119	42	21 ^{II}	2
124	42	21 ^{II}	01/3
126	42	21 ^{II}	01
127	42	21 ^{II}	01
133	42	21 ^{II}	01
139	42	20 ^{II} +2 ^I	01-3
149	42	21 ^{II}	1
151	42	21 ^{II}	2
157	42	21 ^{II}	1
179	42	21 ^{II}	01
181	42	21 ^{II}	01

Ген *Lr19* из за широко использования в селекционных программах частично потерял свою устойчивость. Остальные три гена проявляют высокую эффективность к патогену в том числе и во всех основных регионах возделывания пшеницы в России[9].

Генетическую природу устойчивости к листовой ржавчине определяли на основе гибридологического анализа.

Для этого нами были отобраны две линии 60 и 109. Эти линии имеют одинаковый тип реакции на поражение листовой ржавчиной. Линия 60 проявляет устойчивость к желтой ржавчине и мучнистой росе, тогда как линия 109 восприимчива к этим патогенам. Исходя из этого, мы предполагали, что устойчивость к болезням и в том числе к листовой ржавчине у этих линий связан с замещением разных хромосом пшеницы на соответствующие от *Ag. glaucum*.

Число генов, контролирующих устойчивость у исследуемых линий, определяли на основе расщепления по этому признаку в популяциях F_2 , полученных от скрещивания с восприимчивым сортом Аврора.

Оценка устойчивости к листовой ржавчине в F_1 , полученном от скрещивания линий 60 и 109 с сортом Аврора, показала, что все гибридные растения были устойчивыми. Исходя из этого, можно сделать предварительный вывод, что гены, ответственные за устойчивость к листовой ржавчине у линии 60 и 109 является доминантными. Данные анализа гибридов F_2 в отношении устойчивости к листовой ржавчине приведены в таблице 2.

Гибридные растения F_2 от скрещивания линии 60 и сорта Аврора достоверно ($\chi^2 - 0,51$) расщеплялись в соотношении, близком к теоретически ожидаемому 3:1. В комбинации 109 x Аврора также получено соотношение, близкое к теоретическому 3:1 ($\chi^2 - 0,31$).

Следовательно, устойчивость к листовой ржавчине у обеих линий контролируется одним доминантным геном.

Таблица 2 - Расщепление по устойчивости к листовой ржавчине в F₂ от скрещивания линий между собой с восприимчивым сортом Аврора и тестерами с известными генами устойчивости *Lr19* и *Lr24*

Комбинация скрещивания	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		χ^2	P
	фактическое	Теоретическое и ожидаемое		
60/Аврора	153:57	3:1	0,51	0,50-0,25
109/Аврора	174:63	3:1	0,31	0,75-0,50
60/ <i>Lr19</i>	173:15	15:1	0,95	0,50-0,25
60/ <i>Lr24</i>	201:10	15:1	0,82	0,50-0,25
109/ <i>Lr19</i>	162:14	15:1	1,35	0,20-0,25
109/ <i>Lr24</i>	216:18	15:1	0,83	0,50-0,25
109/60	245:13	15:1	0,64	0,50-0,25

Чтобы подтвердить предположение о наличии или отсутствии у исследуемых линий идентичных генов устойчивости к листовой ржавчине, они были скрещены между собой.

Доминантный ген устойчивости линии 60 независим от гена, имеющихся у линий 109. Расщепление гибридов в F₂ соответствовало ожидаемому 15:1 при взаимодействии двух доминантных дупликатных генов (χ^2 -0,64).

*Для идентификации генов устойчивости к листовой ржавчине в качестве тестеров были взяты линии с эффективными генами *Lr19* и *Lr24*.*

Во всех комбинациях скрещивания наблюдалось расщепление близкое к теоретически ожидаемому 15:1, что указывает на независимое наследование двух доминантных генов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемые линии защищены генами устойчивости к листовой ржавчине, отличными от *Lr19* и *Lr24*.

В целях подтверждения полученных результатов идентификацию генов устойчивости *Lr19* и *Lr24* у линии 60 и 109 также осуществляли с применением молекулярных маркеров. ПЦР- анализ проводили с использованием маркеров GB к гену *Lr19* и J09 гену *Lr24*. У обеих линий данные гены устойчивости к листовой ржавчине не идентифицированы.

Таким образом, гены устойчивости исследуемых линий различаются между собой, отличаются от используемых известных эффективных генов *Lr19* и *Lr24*, которые могут нести линии, исходя из их родословной. В дальнейшем планируется проведение работ по идентификации у изучаемых линий генов устойчивости *Lr29* и *Lr38*.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 11-04.96542).

Список литературы

1. Цицин Н.В. Отдаленная гибридизация растений. М.:Сельхозгиз, 1954. 432 с.
2. Mc Guire P.E., Dvorak J. High salt-tolerance potential in wheat grasses // Crop Sci. 1981. V. 21. № 5. P. 497–500.
3. Sharma H.C., Gill B.S. Current status of wide hybridization in wheat // Euphytica. 1983. 32. P. 17-31.
4. Kerber E.R., Dyck P.L. Inheritance in hexaploid wheat leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa* // Can. J. Genet. Cytol. 1969. V. 11. P. 639-647.
5. Жиров Е. Г., Терновская Т. К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник сельскохозяйственной науки. 1984, №10. С. 58-66.
6. Waning J.A. A modified of counting chromosomes on root tip cels of wheat // Euphytica. 1965. V.14 .№ 3. P. 249-256.

7. Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. // *Phytopatology*.1926. №16. P. 89-120.
8. Давоян, Р. О., Бебякина И. В., Бессараб К. С. Получение и характеристика чужеродно-замещенных линий озимой мягкой пшеницы Аврора с хромосомами *Agropyron glaucum* // Эволюция научных технологий в растениеводстве: сб. науч. тр., посвященный 90-летию КНИИСХ им. П. П. Лукьяненко. Краснодар. 2004а. Т.3. С. 3-9.
9. Zhemchuzina A., Kurkova N. Structure of population of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006-2008 // Abstracts of 8th Intrenational Wheat Conference. 1-4 june 2010. St. Petersburg, Russia. P.279.