

Пятая международная научная конференция PlantGen2019

Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7

Р.О. Давоян¹✉, И.В. Бебякина¹, Э.Р. Давоян¹, Д.С. Миков¹, Ю.С. Зубанова¹, Д.М. Болдаков¹, Е.Д. Бадаева², И.Г. Адонина³, Е.А. Салина³, А.Н. Зинченко¹

¹ Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия

² Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ e-mail: davoyanro@mail.ru

Синтетическая форма RS7 (BBAAUS), у которой первые два генома, A и B, происходят от мягкой пшеницы, а третий состоит из хромосом *Aegilops speltoides* (S) и *A. umbellulata* (U), получена от скрещивания синтетических форм Авродес (BBAASS) и Авролата (BBAAUU). От беккроссов с восприимчивыми к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Фишт и Ростислав были созданы устойчивые к этим болезням интрогрессивные линии. ПЦР-анализ показал наличие амплификации фрагментов с маркером SCS421, специфичным для гена *Lr28*, у линии 4991п17. Цитологическое изучение (C-banding и FISH) 14 линий выявило хромосомные перестройки у 12 из них. В большинстве случаев линии несут транслокации от *Ae. speltoides*, установленные в хромосомах 1D, 2D, 3D, 2B, 4B, 5B и 7B. Были идентифицированы также линии с замещенными хромосомами 1B (1S), 4D (4S), 5D (5S) и 7D (7S). Отобраны линии, несущие одновременно генетический материал от *Ae. speltoides* и *Ae. umbellulata*. У линии 3379п14 идентифицированы транслокации: T7US-7DS.7DL – в коротком плече хромосомы 7D от *Ae. umbellulata* и в хромосомах 5BL, 1DL, 2DL от *Ae. speltoides*. В линии 4626п16 определены транслокации: 2DS.2DL-2UL от *Ae. umbellulata* и T7SS.7SL-7DL от *Ae. speltoides*. Транслокации T1DS.1DL-1SL, T3DS.3DL-3SL от *Ae. speltoides* и T2DS.2DL-2UL, T7DL.7DS-7US от *Ae. umbellulata* выявлены впервые. Сделано предположение, что линии могут нести неидентифицированные ранее гены устойчивости к грибным болезням, в частности к листовой ржавчине, от видов *Ae. speltoides* и *Ae. umbellulata*.

Ключевые слова: мягкая пшеница; синтетические формы; устойчивость к болезням; цитологический анализ; замещенные хромосомы; транслокации; C-banding; FISH.

Для цитирования: Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.Н. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019;23(7):827-835. DOI 10.18699/VJ19.556

The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7

R.O. Davoyan¹✉, I.V. Bebyakina¹, E.R. Davoyan¹, D.S. Mikov¹, Yu.S. Zubanova¹, D.M. Boldakov¹, E.D. Badaeva², I.G. Adonina³, E.A. Salina³, A.N. Zinchenko¹

¹ National Center of Grain named after P.P. Lukyanenko, Krasnodar, Russia

² Vavilov Institute of General Genetics, RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

✉ e-mail: davoyanro@mail.ru

Synthetic recombination form RS7 (BBAAUS), in which the first two genomes, A and B, originate from common wheat, and the third recombinant genome consists of *Aegilops speltoides* (S) and *Ae. umbellulata* (U) chromosomes, was obtained from crossing synthetic forms Avrodes (BBAASS) and Avrolata (BBAAUU). Resistant to leaf rust, yellow rust and powdery mildew, introgression lines have been obtained from backcrosses with the susceptible varieties of common wheat Krasnodarskaya 99, Fisht and Rostislav. PCR analysis showed the presence of amplification fragments with marker SCS421 specific for the *Lr28* gene in the line 4991n17. The cytological study (C-banding and FISH) of 14 lines has revealed chromosomal modifications in 12 of them. In most cases, the lines carry translocations from *Ae. speltoides*, which were identified in chromosomes 1D, 2D, 3D, 2B, 4B, 5B and 7B. Also, lines with the substituted chromosomes 1S (1B), 4D (4S), 5D (5S) and 7D (7S) were identified. Lines that have genetic material from *Ae. speltoides* and *Ae. umbellulata* at once were revealed. In the line 3379n14, translocations in the short arm of chromosome 7D from *Ae. umbellulata* and chromosomes 5BL, 1DL, 2DL from *Ae. speltoides* were revealed. The line 4626p16 presumably has a translocation on the long arm of chromosome 2D from *Ae. umbellulata* and the T7SS.7SL-7DL translocation from *Ae. speltoides*. The T1DS.1DL-1SL and T3DS.3DL-3SL translocations from *Ae. speltoides*, and T2DS.2DL-2UL and T7DL.7DS-7US from

Ae. umbellulata have been obtained for the first time. These lines may carry previously unidentified disease resistance genes and, in particular, leaf rust resistance genes from *Ae. speltooides* and *Ae. umbellulata*.

Key words: common wheat; synthetic forms; resistance to diseases; cytological analysis; substituted chromosomes; translocations; C-banding; FISH.

For citation: Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Zubanova Yu.S., Boldakov D.M., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N. The development and study of common wheat introgression lines derived from the synthetic form RS7. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2019;23(7): 827-835. DOI 10.18699/VJ19.556 (in Russian)

Введение

Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) – важнейшая продовольственная культура. Генетический потенциал ее продуктивности в настоящее время практически исчерпан, и урожайность во многом зависит от устойчивости возделываемых сортов к неблагоприятным абиотическим и биотическим факторам среды. Генетических ресурсов самой мягкой пшеницы недостаточно для решения этих проблем. В особенности это касается генов устойчивости к болезням, ограниченное разнообразие которых является одним из основных лимитирующих факторов селекции.

Значительный резерв генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки, находится в генофонде многочисленных родственных мягкой пшенице видов и родов. Многие из них были с успехом использованы для решения актуальных задач селекции мягкой пшеницы (Knott, 1987; Friebe et al., 1996). В настоящее время значительная часть эффективных генов устойчивости к болезням происходит из этого генофонда (McIntosh et al., 2013). Один из эффективных методов передачи ценного генетического материала от диких сородичей – создание и использование синтетических геномно-замещенных и геномно-добавленных форм в качестве «мостиков» для передачи генетического материала в культурную пшеницу от диких сородичей.

В Национальном центре зерна (НЦЗ) им. П.П. Лукьяненко разработан оригинальный подход, позволивший создать синтетические геномно-замещенные формы Авродес (BBAASS), Аврозис (BBAAS^{shSh}), Авролата (BBAUU), Авротата (BBAAN^{nN}), Авроале (BBAARR), у которых геном D мягкой пшеницы был замещен, соответственно, на геномы *Ae. speltooides*, *Ae. sharonensis*, *Ae. umbellulata*, *Ae. uniaristata* и *S. cereale* (Жиров и др., 1984). Эти формы были использованы для передачи хозяйственно ценных генов в мягкую пшеницу, а также для получения «вторичных» синтетических форм (Давоян и др., 2012). Основной формой для создания рекомбинантных синтетиков была синтетическая форма Авродес. Она обладает полученной от *Ae. speltooides* способностью стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenco et al., 1993). Кроме этого, синтетическая форма Авродес проявляет высокую устойчивость к листовой ржавчине (*Puccinia triticina* Eriks.), желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* West.), мучнистой росе (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*), а также отличается повышенным содержанием белка. Предполагалось, что общие для всех форм геномы ВА мягкой пшеницы могут стать основой для возможного рекомбинационного процесса между хромосомами двух различных геномов диких видов. Такие формы можно использовать для получения множественных интрогрессий, новых транслокаций, они способствуют в отдельных случаях передаче генетического материала одновременно от двух

дикорастущих видов. От скрещивания формы Авродес с другими геномно-замещенными формами были получены синтетические формы (RS-формы), у которых первые два генома, А и В, происходят от мягкой пшеницы сорта Аврора, а третий геном сочетает хромосомы генома S от *Ae. speltooides* с хромосомами других диких видов: *Ae. umbellulata* (U), *Ae. sharonensis* (S¹), *Secale cereale* (R) (Давоян и др., 2012).

В настоящей работе приведены результаты создания, молекулярно-цитологического анализа и оценки по устойчивости к грибным болезням интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных с использованием синтетической формы RS7 (BBAASU) (Авролата × Авродес).

Материалы и методы

Исходным материалом были интрогрессивные линии мягкой пшеницы (BC₂F₆–BC₃F₅), полученные от последовательных скрещиваний синтетической формы RS7 с восприимчивыми к листовой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе сортами мягкой пшеницы селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко: Краснодарская 99, Фишт и Ростислав. Сорт Ростислав несет в себе ржаную транслокацию 1RS.1BL. Сорт Фишт имеет транслокацию 5BS.5BL-5GL и замещенные хромосомы 1D(1D¹) и 6D(6D¹), полученные от видов *T. militinae*, *Ae. tauschii* через синтетическую форму *T. miguschovae*.

Конъюгацию хромосом в метафазе I мейоза изучали на давленных препаратах, окрашенных уксуснокислым гематоксилином. Для приготовления маточного раствора гематоксилина брали 4 г порошка гематоксилина, 1 г железо-аммиачных квасцов, доводили до 100 мл 45 % уксусной кислотой. Реактив созревал в течение 160 ч в темноте в термостате при подогреве до 40 °С. Полученный реактив черного цвета фильтровали с помощью складчатого фильтра и оставляли в темной бутылке на хранение в холодильнике. Для окрашивания колосков пшеницы, взятых в стадии прохождения мейоза, реактив разбавляли 45 % уксусной кислотой в 1.5–2 раза. Предварительно зафиксированные в фиксаторе Карнуа колосья (Паушева, 1974) окрашивали разбавленным раствором гематоксилина в термостате при 25 °С в течение 1–2 суток. В мейозе подсчитывали число би-, уни- и мультивалентов.

Заражение и оценку по устойчивости к болезням растений во взрослой стадии проводили в полевых условиях. Популяцию линий заражали смесью уредоспор желтой и листовой ржавчины, собранных с разных сортов пшеницы в фазах выхода в трубку и трубка–колошение соответственно. Устойчивость к желтой ржавчине определяли по шкале Гасснера и Штрайба в фазу молочной спелости зерна (Gasner, Straib, 1934). Учет поражения листовой

Таблица 1. Гены устойчивости к листовой ржавчине и характеристика праймеров, использованных для их идентификации

Ген	Праймер	Условия амплификации фрагментов (температура отжига, °C)	Размер фрагмента, п. н.	Литературный источник
Lr28	CS421570-R	60	570	Cherukuri et al., 2005
	CS421570-L			
Lr35	BCD260F1	59	931	Seyfarth et al., 1999
	35R2			
Lr47	PS10R	61	224	Dubcovsky et al., 2000
	PS10L			
Lr51	S30-13L	52	422	Helguera et al., 2005
	AGA7-759R			
Lr9	FJ13/1	63	1100	Schachermayer et al., 1994
	FJ13/2			

ржавчиной проводили в фазу молочно-восковой спелости зерна по международной шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции от 0 до 1 (единичные очень мелкие пустулы с некрозом) обозначали баллом 01. К восприимчивым относили растения с типом реакции 3–4. Оценку устойчивости к мучнистой росе проводили на естественном инфекционном фоне в фазу колошения по шкале Гешеле (Пересыпкин, 1979). Растения со степенью поражения мучнистой росой 0–20 % считались устойчивыми.

ДНК выделяли из 5–7-дневных этиолированных проростков пшеницы по методу Плашке с коллегами (Plaschke et al., 1995). Идентификацию генов *Lr* осуществляли с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими гены *Lr9*, *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66*. Праймеры подбирали на основании литературных данных, их названия и условия амплификации приведены в табл. 1.

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× буфер для Taq-ДНК-полимеразы (50 мМ KCl, 20 мМ трис-HCl, pH 8.4, 2–5 мМ MgCl₂, 0.01 % твин-20), 2 мМ MgCl₂, по 0.2 мМ каждого dNTP, 12.5 мМ каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы. Амплификацию вели согласно условиям, приведенным в табл. 1, с незначительными модификациями. Продукты ПЦР разделяли с использованием электрофореза в 1.8 % агарозном геле с 0.5× буфером TBE. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса Infinity 1000.

В качестве положительных контролей для определения генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* (TcLr9) и *Lr35* (TcLr35), в качестве отрицательного контроля был восприимчивый к листовой ржавчине сорт Аврора.

Дифференциальное окрашивание хромосом (C-banding) осуществляли в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова по методике, разработанной в лаборатории функциональной морфологии хромосом Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Badaeva et al., 1994).

Флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH) проводили в Институте цитологии и генетики СО РАН по ранее опубликованной методике (Salina et al., 2006) с применением зондов pSc119.2 (Bedbrook et al., 1980) и pAs1 (Rayburn, Gill, 1986) для идентификации хромосом (Schneider et al., 2003), Spelt1 (Salina et al., 2004) – для выявления генетического материала *Ae. speltoides* в исследуемых линиях.

Результаты

Синтетическая форма RS7 проявляла высокую устойчивость к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе, но была полностью стерильна. Для передачи устойчивости и восстановления фертильности эту форму последовательно скрещивали с восприимчивыми к этим болезням сортами мягкой пшеницы Краснодарская 99, Фишт и Ростислав. Первое поколение гибридных растений было частично фертильным либо полностью стерильным и также проявляло устойчивость к комплексу болезней пшеницы. В зависимости от уровня фертильности этих растений проводили беккроссирование мягкой пшеницей от 1 до 3 раз, но в большинстве случаев для ее восстановления было достаточно двух беккроссов. Полученные от беккроссов растения имели от 40 до 42 хромосом. Результаты цитологического изучения хромосомных ассоциаций в метафазе I мейоза приведены в табл. 2.

В первых поколениях растений, полученных от беккроссов с мягкой пшеницей, наблюдается большое количество растений с мультивалентами (80 %), которое существенно уменьшается (до 8.2 %) по мере увеличения числа беккроссов и отбора фертильных растений с нужными признаками в следующих поколениях. Примеры конъюгации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений показаны на рис. 1.

В результате отбора 42-хромосомных растений со стабильным протеканием мейоза из популяции гибридных растений RS7 × *T. aestivum* поколения BC₂F₆–BC₃F₅ получено 130 линий. В настоящей статье представлены результаты изучения 14 линий, наиболее интересных по своим морфо-биологическим признакам.

Поскольку главной задачей являлась передача от RS7 мягкой пшенице устойчивости к болезням, линии оценивались по устойчивости к наиболее распространенным и

Таблица 2. Характеристика гибридных растений RS7 × *T. aestivum* поколения F₁ и (BC₁F₁–BC₃F₁) по наличию мультивалентов в метафазе I мейоза

Поколение	Всего изученных растений	Кол-во растений с мультивалентами
F ₁	25	20 (80 %)*
BC ₁ F ₁	60	35 (58.3 %)
BC ₁ F ₁ –BC ₂ F ₁	75	25 (33.3 %)
BC ₂ F ₁ –BC ₃ F ₁	134	11 (8.2 %)

* Процентное содержание от общего числа растений.

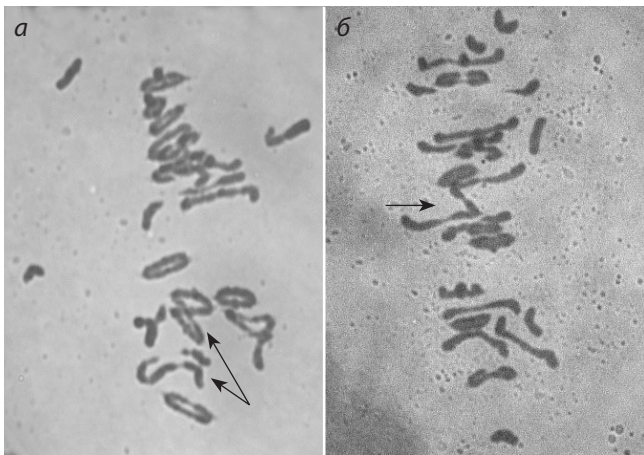


Рис. 1. Конъюгация хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений.

а – F₁ RS7 × Краснодарская 99 (12^{II}+6^I+1^{VIII}+1^{IV}) (42 хр.); б – BC₃ (RS7 × Краснодарская 99) × Ростислав (16^{II}+5^I+1^V). Стрелками обозначены мультиваленты.

вредоносным болезням – листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. В табл. 3 приведена их характеристика за 2017–2018 гг. Все 14 линий были устойчивы к листовой ржавчине. Высокую резистентность с типом реакции 01 и 1 имели 6 линий: 3379п14, 4581п16, 4662п16, 4665п16, 4991п17 и 5026п17. Остальные линии обладали средней устойчивостью к этой болезни. Резистентность к желтой ржавчине несли также все 14 линий, 3 из которых, 4581п16, 4623п16 и 4626п16, имеют тип реакции на заражение 01. Устойчивость к мучнистой росе проявили 12 линий.

Особую ценность для селекции представляют линии, устойчивые к комплексу болезней. Две линии, 4665п16 и 4670п16, имели групповую устойчивость к двум и 12 линий ко всем трем болезням. Следует отметить линии 3379п14, 4581п16 и 4991п17, обладающие высокой резистентностью ко всем трем болезням.

Разный тип реакции линий по устойчивости к листовой ржавчине может свидетельствовать о различных интрогрессиях чужеродного генетического материала в геном мягкой пшеницы. Для того чтобы выяснить природу переданного материала от синтетической формы RS7, были скрещены 10 изучаемых линий с одним из наиболее

Таблица 3. Характеристика интрогрессивных линий RS7 × *T. aestivum* по устойчивости к комплексу болезней пшеницы (2017–2018 гг.)

№ линии, сорта	Устойчивость		
	к листовой ржавчине, балл	к желтой ржавчине, балл	к мучнистой росе, %
4572п16	2	2	20
3379п14	01	2	15
4581п16	01	01	15
4586п16	2	1	20
4607п16	2	2	15
4623п16	2	01	15
4626п16	2	01	15
4635п16	2	2	20
4662п16	1	1	20
4665п16	1	2	25
4670п16	2	1	25
4671п16	2	2	20
4991п17	1	1	15
5026п17	1	2	20
Краснодарская 99	4	3	25
Фишт	3	3	30
Ростислав	3	3	30

мейотически стабильных сортов мягкой пшеницы Краснодарская 99 и изучен мейоз у гибридов F₁ (табл. 4).

Ассоциация хромосом у гибридных растений F₁, 20^{II}+2^I и 19^{II}+4^I может свидетельствовать о замещении одной или двух пар пшеничных хромосом на чужеродные. Такие замещения могут быть у 8 линий из 10 анализируемых – 3379п14, 4581п16, 4586п16, 4623п16, 4626п16, 4635п16, 4662п16 и 4671п16. Наличие мультивалентов у гибридов с линиями 3379п14 (0.5 %); 4626п16 (1.7 %); 4635п16 (2.9 %); 4662п16 (2.3 %) и 4671п16 (1.9 %) свидетельствует о том, что эти линии могут нести транслокации от синтетика RS7 и сортов Фишт и Ростислав.

Для идентификации перестроек хромосом и изменений в геноме у интрогрессивных линий нами были использованы методы дифференциального окрашивания хромосом (C-banding) и флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH). Применение метода дифференциальной окраски хромосом для двух линий, 5026п17 и 4991п17, с генетическим материалом RS7 позволило выявить у них неизвестные ранее перестройки и замещения хромосом (рис. 2). Линия 5026п17, кроме известной транслокации 1RS.1BL, имеет замещение хромосомы 5D на хромосому 5S от *Ae. speltoides*. Линия 4991п17 несет замещения 7D (7S) от *Ae. speltoides* и 6D (6D^{ae}) от другого вида *Aegilops*. Предположительно, замещение 6D (6D^{ae}) происходит от сорта-реципиента Фишт, который, в свою очередь, получил это замещение от *T. miguschovae* (GGAADD), в которой присутствует геном D от *Ae. tauschii* (Давоян и др., 2012).

Таблица 4. Анализ мейоза в метафазе I в материнских клетках пыльцы у гибридов F₁, полученных от скрещивания цитологически стабильных линий RS7 × *T. aestivum* с сортом Краснодарская 99

Растительный материал	Изучено клеток	21 ^{II} , %	20 ^{II} +2 ^I , %	19 ^{II} +4 ^I , %	Клетки с мультивалентами, %
4572п16×K99*	168	89.5	7.9	2.6	–
3379п14×K99	205	56.3	43.2	–	0.5
4581п16×K99	226	66.7	30.5	2.8	–
4586п16×K99	178	69.3	30.7	–	–
4607п16×K99	128	92.2	7.0	0.8	–
4623п16×K99	256	45.6	42.3	12.1	–
4626п16×K99	305	79.6	14.4	4.3	1.7
4635п16×K99	238	79.8	11.2	6.1	2.9
4662п16×K99	334	67.4	20.1	10.2	2.3
4671п16×K99	312	46.5	39.4	12.2	1.9
Краснодарская 99	112	91.0	6.3	2.7	–

* K99 – сорт пшеницы Краснодарская 99.

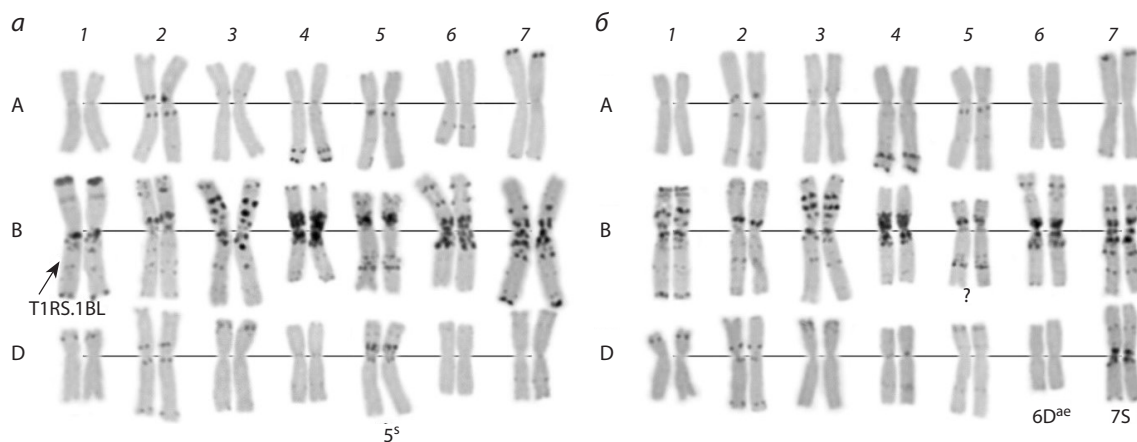


Рис. 2. Кариотипы интрогрессивных линий: а – 5026п17; б – 4991п17 с генетическим материалом рекомбинантной синтетической формы RS7.

С использованием метода флуоресцентной *in situ* гибридизации проанализировано 12 линий (табл. 5). Хромосомные перестройки затронули 10 из 12 изученных линий. Участие хромосом генома А в перестройках не установлено. Перестройки хромосом генома В определены у 8 линий и генома D – 11 линий. Наиболее часто перестройки затрагивают хромосомы 5В (6 линий) и 2D (4 линии). В большинстве случаев линии несут транслокации от *Ae. speltooides*. Транслокации от этого вида идентифицированы на хромосомах 1D, 2D, 3D, 5D, 7D, 4В, 5В. Выявлены также линии с замещением хромосом пшеницы на хромосомы *Ae. speltooides*: 1В(1S) и 4D(4S).

Линий, несущих транслокации и замещенные хромосомы только от *Ae. umbellulata*, не обнаружено. В то же время две линии несут одновременно генетический материал от *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata*. В линии 3379п14 (рис. 3, а) определены транслокации: T7DL.7DS-7US в коротком плече хромосомы 7D от *Ae. umbellulata* и на плечах хромосом 5BL, 1DL, 2DL от *Ae. speltooides*. Кроме этого, у этой линии обнаружено замещение хромосомы 4D на

хромосому 4S *Ae. speltooides*. Линия 4626п16 (см. рис. 3, б), предположительно, имеет транслокацию T2DS.2DL-2UL на длинном плече хромосомы 2D от *Ae. umbellulata* и транслокацию в хромосоме 7D от *Ae. speltooides*. В ней могут присутствовать также транслокации от *Ae. speltooides* на хромосомах 5В и 7В. Следует отметить, что транслокации T1DS.1DL-1SL, T2DS.2DL-2UL, T7DL.7DS-7U и хромосомное замещение 4D (4S) получены впервые.

Выявленные интрогрессивные линии представляют особый интерес как возможные доноры новых генов устойчивости к болезням, в частности к листовой ржавчине, переданных от видов *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata*. В настоящее время в каталог генных символов пшеницы внесено шесть генов устойчивости, переданных от *Ae. speltooides*: *Lr 28*, *Lr 35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66* и один ген, *Lr9*, от *Ae. umbellulata* (McIntosh et al., 2013).

Для постуляции генов устойчивости к листовой ржавчине в геноме полученных нами линий использовали ДНК-маркеры. Ранее (Давоян и др., 2012) был проведен анализ синтетической формы Авродес на присутствие

Таблица 5. Результаты анализа интрогрессивных линий RS7 × *T. aestivum* методом флуоресцентной *in situ* гибридизации

Линия	Источник чужеродного генетического материала	Выявленные транслокации и замещения
4572п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	Полный набор хромосом пшеницы. Хромосомные перестройки не выявлены
3379п14	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T1DS.1DL-1SL; T2DS.2DL-2SL; T5BS.5BL-5SL; 4D(4S); транслокация или делеция в 6DL T7DL.7DS-7US
4581п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	1B(1S), T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4586п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T3DS.3DL-3SL Не выявлены
4607п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	Полный набор хромосом пшеницы. Хромосомные перестройки не выявлены
4623п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4626п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T7DL-7SL.7SS; T5BS.5BL-5SL T2DS.2DL-2UL
4635п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T2DS.2DL-2SL; T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4662п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T5D Не выявлены
4665п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T5BS.5BL-5SL Не выявлены
4670п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL. Возможная транслокация от <i>Ae. speltoides</i> на длинных плечах пары неидентифицированных хромосом генома A Не выявлены
4671п16	<i>Ae. speltoides</i> <i>Ae. umbellulata</i>	T1RS.1BL; T2DS.2DL-2SL; T4BS (неустановленной природы); T5BL (неустановленной природы) Не выявлены

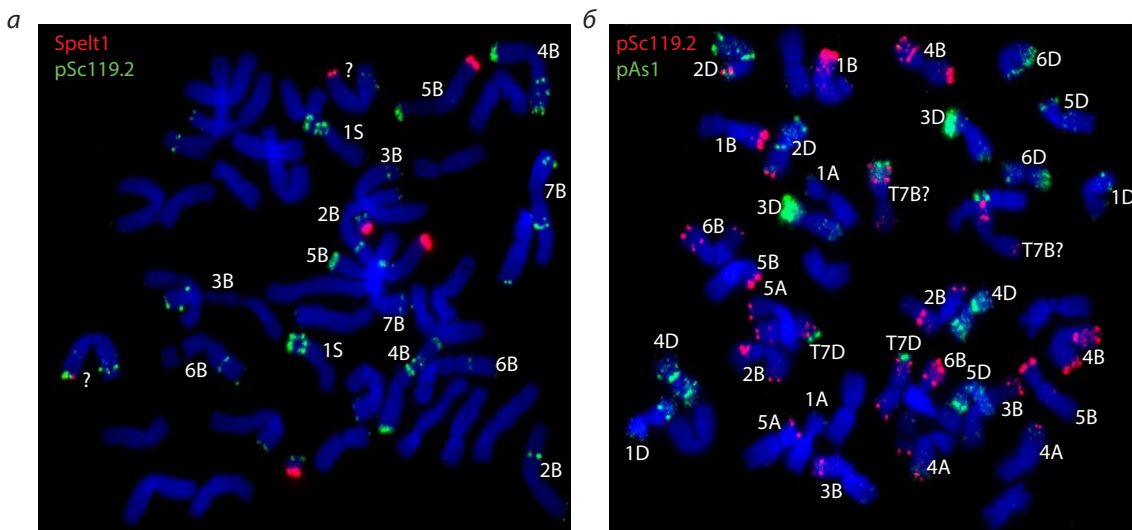


Рис. 3. Гибридизация *in situ*: а – с зондами Spelt1 (красный) и pSc119.2 (зеленый) на метафазных хромосомах линии 3379п14; б – с зондами pAs1 (зеленый) и pSc119.2 (красный) на метафазных хромосомах линии 4626 п16.

генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* и формы Авролата – на наличие гена *Lr9*. Ген устойчивости *Lr36* в анализ не был включен в связи с отсутствием эффективного молекулярного маркера к нему. Идентификацию гена *Lr66* на данном этапе не проводили.

Установлено, что синтетическая форма Авродес имеет из перечисленных генов только *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*. В синтетической форме Авролата было подтверждено наличие гена *Lr9*. Исходя из этого, полученные интрогрессивные линии анализировали только на наличие у них эффектив-

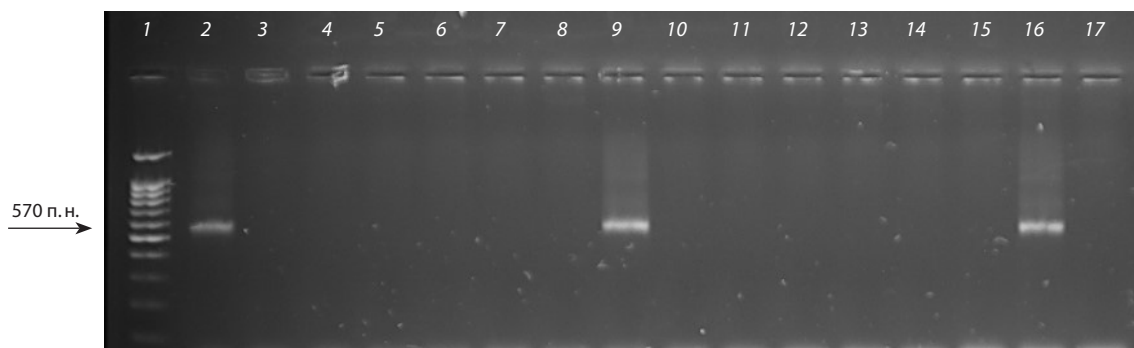


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов амплификации, полученных с использованием пары праймеров, CS421570-R и CS421570-L, к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*.

1 – маркер длины; 2 – TcLr28; 3–14 – интрогрессивные линии; 9 – линия 4991п17; 15 – Авролата; 16 – Авродес; 17 – сорт Аврора.

ных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr28*, *Lr35* и *Lr51*.

В анализ было включено 12 линий, кроме двух линий, 4572п16 и 4607п16, в которых, по результатам цитологического анализа, не было выявлено чужеродных интрогрессий. Только у одной линии, 4991п17, установлена амплификация фрагмента для маркера SCS421, специфичного для гена *Lr28* (рис. 4). В остальных линиях искомые гены маркерным анализом не обнаружены.

Обсуждение

Основной практической задачей при создании и использовании синтетической формы RS7 была возможность передачи от *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata* мягкой пшенице новых генов устойчивости к болезням. Такая работа основана на получении интрогрессивных линий с генетическим материалом от этих видов. Анализ конъюгации хромосом в метафазе I мейоза у гибридных растений, полученных от скрещивания RS7 с мягкой пшеницей, выявил большое количество растений с мультивалентами (80 %) в F₁, которое по мере увеличения числа беккроссов и отбора фертильных растений с нужными признаками в следующих поколениях существенно уменьшилось (до 8.2 % в BC₃). При получении рекомбинантных синтетических форм геномно-замещенная форма Авродес использована нами не только как источник ценных генов устойчивости к болезням, но и как промотор гомеологичной конъюгации хромосом. Можно предположить, что наиболее активно гомеологичная конъюгация хромосом осуществлялась в первых поколениях. В популяции гибридных растений происходил естественный отбор, стабилизирующий количество хромосом и их ассоциацию в мейозе в сторону мягкой пшеницы. Таким образом, в поколениях BC₂–BC₃ можно было проводить отбор фертильных растений с полезными признаками.

Отобранные для изучения 14 линий RS7 × *T. aestivum* поколения BC₂F₆–BC₃F₅ различались по устойчивости к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлены линии с типами реакции к листовой ржавчине 01, 1 и 2, к желтой ржавчине 01, 1 и 2, со степенью поражения мучнистой росой 15 и 20 %. Линии отличаются также по устойчивости к комплексу перечисленных болезней. Разнообразие линий по устойчивости к болезням может сви-

детельствовать о различных интрогрессиях генетического материала RS7 в геноме мягкой пшеницы и возможной передаче нового гена(ов) устойчивости.

Цитологический анализ (C-banding и FISH) выявил хромосомные перестройки у 12 из 14 линий. Установлено, что генетический материал от синтетической формы RS7 в изученных линиях представлен как в форме транслокаций, так и в виде замещенных хромосом. Несмотря на небольшое количество изученных линий, было выявлено 12 хромосом с интрогрессиями, при этом в основном перестройками были затронуты хромосомы геномов В (4 хромосомы) и D (7 хромосом) мягкой пшеницы. Полученные результаты вполне ожидаемы. Они объясняются, во-первых, тем, что в синтетических формах Авродес (BBAASS) и Авролата (BBAUU) геном D мягкой пшеницы замещен на геномы *S Ae. speltooides* и U от *Ae. umbellulata*, во-вторых, *Ae. speltooides* является вероятным донором генома В и, в-третьих – способностью синтетика Авродес стимулировать гомеологичную конъюгацию хромосом (Tsatsenco et al., 1993). Особо следует отметить обнаруженные впервые у мягкой пшеницы транслокации: T1DS.1DL-1SL, T2DS.2DL-2UL, T3DS.3DL-3SL, T7DL.7DS-7U, так как они могут быть вероятными источниками новых генов устойчивости к болезням, в частности к листовой ржавчине.

У некоторых линий результаты цитологического анализа и оценки по устойчивости к болезням не совпадают. Так, например, у линии 4623п16 методом гибридизации *in situ* идентифицировано всего две транслокации: T1RS.1BL и T5BS.5BL-5SL. В то же время анализ мейоза в метафазе I у гибридов F₁, полученных от скрещивания этой линии с сортом Краснодарская 99, свидетельствует о наличии в ней большего количества интрогрессий. В относительно устойчивых линиях 4572п16 и 4607п16 хромосомные перестройки не выявлены. Вероятно, в этих линиях присутствуют перестройки, которые не определяются методом FISH. В частности, это могут быть замещения 1D(1D¹) и 6D(6D¹), полученные от сорта Фишт. В нашей работе замещение 6D(6D¹) у линии 4991п17 было установлено методом дифференциального окрашивания хромосом (C-banding).

От вида *Ae. speltooides* мягкой пшенице переданы гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*,

Lr51 и *Lr66* (McIntosh et al., 2013). Эти гены были перенесены в хромосомы мягкой пшеницы 4A, 2B, 6B, 7A, 1B и 3A (Friebe et al., 1996; Dubcovsky et al., 2000; Helguera et al., 2005; Marais et al., 2010). Кроме этого, И.Г. Адонина с коллегами (2012) охарактеризовали новую транслокацию T5BS-5BL-5SL от *Ae. speltooides* с эффективным геном, обозначенным как *LrASP5*. Несмотря на довольно большое количество переданных генов, не исключено, что у *Ae. speltooides* могут присутствовать другие гены устойчивости к листовой ржавчине, о чем также свидетельствуют полученные нами ранее результаты (Давоян и др., 2017).

От *Ae. umbellulata* передан единственный ген устойчивости *Lr9*, локализованный в хромосоме 6B (Sears, 1956). Из перечисленных генов в селекции в основном используются гены устойчивости *Lr9*, *Lr28*, *Lr47*, *LrASP5* (Friebe et al., 1996; Адонина и др., 2016). На основании маркерного анализа сделано предположение, что синтетическая форма Авродес имеет из перечисленных генов только три: *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* (Давоян и др., 2012). В синтетической форме Авролата подтверждено наличие гена *Lr9* (Давоян и др., 2012). Из проанализированных 14 линий только у одной линии, 4991п17, идентифицирован диагностический фрагмент амплификации маркера SCS421, разработанного для идентификации гена *Lr28*. В остальных линиях искомые гены не установлены.

Идентификация гена *LrAsp5* не проводилась. В то же время транслокация T5BS-5BL-5SL выявлена у шести из полученных нами линий: 3379п16, 4581п16, 4623п16, 4626п16, 4635п16, 4665п16. Возможно, эти линии также могут иметь ген устойчивости *LrAsp5* от *Ae. speltooides*.

Заключение

Таким образом, использование синтетической формы RS7 позволило получить большое разнообразие интрогрессивных линий, устойчивых к листовой и желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлены линии с новыми транслокациями и замещениями от *Ae. speltooides* и *Ae. umbellulata*, которые могут нести новые гены устойчивости к грибным болезням.

Список литературы / References

Адонина И.Г., Леонова И.Н., Бадаева Е.Д., Салина Е.А. Генотипирование сортов мягкой пшеницы разных регионов России. Вавиловский журнал генетики селекции. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107.
[Adonina I.G., Leonova I.N., Badaeva E.D., Salina E.A. Genotyping of hexaploid wheat varieties from different Russian regions. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(1):44-50. DOI 10.18699/VJ16.107. (in Russian)]
Адонина И.Г., Петраш Н.В., Тимонова Е.М., Христов Ю.А., Салина Е.А. Создание и изучение устойчивых к листовой ржавчине линий мягкой пшеницы с транслокациями от *Aegilops speltooides* Tausch. Генетика. 2012;48(4):488-494.
[Adonina I.G., Petrash N.V., Timonova E.M., Khristov Y.A., Salina E.A. Construction and study of leaf rust resistant common wheat lines with translocations of *Aegilops speltooides* Tausch. Russ. J. Genet. 2012;48(4):404-409.]
Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян Э.Р., Миков Д.С., Бадаева Е.Д., Адонина И.Г., Салина Е.А., Зинченко А.С., Зубанова Ю.С. Использование синтетической формы Авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltooides* мягкой

пшенице. Вавиловский журнал генетики селекции. 2017;21(6): 663-670. DOI 10.18699/VJ17.284.
[Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan E.R., Mikov D.S., Badaeva E.D., Adonina I.G., Salina E.A., Zinchenko A.N., Zubanova Y.S. Use of synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltooides* to common wheat. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(6):663-670. DOI 10.18699/VJ17.284. (in Russian)]
Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н., Кравченко А.М. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):116-122.
[Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Yu.S., Kravchenko A.M., Zinchenko A.N. Identification of a leaf rust-resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. Russ. J. Genet.: Appl. Res. 2012;2(4):325-329.]
Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы. Вестник с.-х. науки. 1984;10:58-66.
[Zhiron E.G., Ternovskaya T.K. Genome engineering in wheat. Vestnik Selskokhozyaystvennoy Nauki = Herald of Agricultural Science. 1984;10:58-66. (in Russian)]
Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. М.: Колос, 1974;75.
[Pausheva Z.P. Laboratory Manual on Plant Cytology. Moscow: Kolos Publ., 1974;75. (in Russian)]
Пересыпкин В.Ф. Болезни зерновых культур. М.: Колос, 1979; 251-260.
[Peresipkin V.F. Diseases of Grain Cultures. Moscow: Kolos Publ., 1979;251-260. (in Russian)]
Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., Filatenko A.A. Interspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum*. Plant Syst. Evol. 1994;192(1):117-145.
Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M., Thompson R.D., Flavell R.B. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species. Cell. 1980;19:545-560. DOI 10.1016/0092-8674(80)90529-2.
Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Singh R.B., Haq Q.M.R. Molecular mapping of *Aegilops speltooides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat. Euphytica. 2005; 143:19-26.
Dubcovsky J., Helguera M., Khan I.A. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. Theor. Appl. Genet. 2000; 101:625-631.
Friebe B., Jiang J., Raupp W.J., McIntosh R.A., Gill B.S. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. Euphytica. 1996;91:59-87.
Gasner G., Straib U.W. Weitere Untersuchungen über die Spezialisierung sverhältnissedes Gelbrostes *Puccinia glumarum* (Schm.) Erikss. u. Henn. Arb. Boil. Reichsanstalt. 1934;21:121-145.
Helguera M., Vanzetti L., Soria M., Khan I.A., Kolmer J., Dubcovsky J. PCR markers for *Triticum speltooides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci. 2005;45(2):728-734.
Knott D.R. Transferring Alien Genes to Wheat. In: Heyne E.G. (Ed.). Wheat and Wheat Improvement. American Society of Agronomy. Madison, WI, USA, 1987;462-471.
Mains E.B., Jackson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss. Phytopatology. 1926;16:89-120.
Marais G.F., Bekker T.A., Eksteen A., Mccallum B., Fetch T., Marais A.S. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltooides*. Euphytica. 2010;171(1):71-85.
McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available at: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes>.

- Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007.
- Rayburn A.L., Gill B.S. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1986;4: 102-109. DOI 10.1007/BF02732107.
- Salina E., Adonina I., Vatolina T., Kurata N. A comparative analysis of the composition and organization of two subtelomeric repeat families in *Aegilops speltoides* Tausch. and related species. *Genetics.* 2004;122:227-237.
- Salina E.A., Lim Y.K., Badaeva E.D., Shcherban A.B., Adonina I.G., Amosova A.V., Samatadze T.E., Vatolina T.Yu., Zoshchuk S.A., Leitch A.A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids. *Genome.* 2006;49:1023-1035. DOI 10.1139/G06-050.
- Schachermayer G., Siedler H., Gale M.D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1994; 88:110-115.
- Schneider A., Linc G., Molnar-Lang M. Fluorescence *in situ* hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat. *Plant Breed.* 2003;122:396-400. DOI 10.1046/j.1439-0523.2003.00891.
- Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellata* to wheat. *Brookhaven Symp. Biol.* 1956;9:1-22.
- Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayer G., Winzeler M., Keller B. Development of molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 1999;99:554-560.
- Tsatsenko L.V., Zhirov E.G., Davoyan R.O. Hybrids between wheat and genome-substituted form Avrodes. *Cytogenetics and agronomy investigations. Cereal Res. Commun.* 1993;21(1):45-50.

ORCID ID

E.A. Salina orcid.org/0000-0001-8590-847X

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 31.05.2019. После доработки 11.09.2019. Принята к публикации 12.09.2019.