

УДК 576.316:633.111.1:632.938.1

ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ УЧАСТКОВ ХРОМОСОМ *TRITICUM TIMOPHEEVII* НА ФОРМИРОВАНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ПРИЗНАКИ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. Е.М. Тимонова¹, И.Н. Леонова¹, И.А. Белан², Л.П. Россеева², Е.А. Салина¹

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

² Государственное научное учреждение Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Сибирского отделения Российской сельскохозяйственной академии, Омск, Россия

Поступила в редакцию 23 декабря 2011 г. Принята к печати 10 января 2012 г.

Проведена оценка влияния фрагментов интрогрессии *Triticum timopheevii* Zhuk. ($2n = 28$, A¹A¹GG) и их комбинаций на устойчивость к бурой и стеблевой ржавчине, мучнистой росе и ряду количественных признаков у 15 интрогрессивных линий мягкой пшеницы. Анализ интрогрессивных линий молекулярно-генетическими и цитологическими методами продемонстрировал эффективность комплексного использования различных типов маркеров для детальной характеристики гибридных форм и выявления различных транслокаций и замещений. Оценка линий по устойчивости к грибным болезням показала, что линии, содержащие в геноме интрогрессивный фрагмент хромосомы 5G, являются полностью устойчивыми к популяциям бурой ржавчины Западной Сибири и стеблевой ржавчины, типичной для Омской области. Линии 3862-5 и 3862-15, содержащие в геноме фрагмент длинного плеча хромосомы 2G, были устойчивыми к популяции стеблевой ржавчины Западной Сибири. Интрогрессивные линии были изучены по ряду количественных признаков. У всех изученных линий не отмечено негативного влияния чужеродного материала на урожайность и другие количественные признаки, что позволяет их использовать в селекции в качестве доноров устойчивости к грибным заболеваниям. Кроме того, установлено положительное влияние фрагментов хромосомы 2G *T. timopheevii* на признак озерненности колоса.

Ключевые слова: интрогрессивные линии мягкой пшеницы, *T. timopheevii*, SSR-анализ, *in situ* гибридизация, С-окрашивание, устойчивость к грибным болезням, количественные признаки.

Введение

Дикие и культурные сородичи мягкой пшеницы интенсивно используются для поиска и переноса в современные коммерческие сорта новых генов устойчивости к биотическому стрессу. Например, из около 80 известных генов и локусов количественных признаков (QTL), контролирующих устойчивость к бурой ржавчине, почти половина интегрирована в геном мягкой пшеницы от дикорастущих сородичей (McIntosh *et al.*, 1995, 2008; Friebe *et al.*, 1996). Однако большое количество найденных генов по различным причинам оказалось неостре-

бованным в создании улучшенных генотипов (Friebe *et al.*, 1996). В первую очередь, это может быть связано с тем, что интрогрессивные сегменты хромосом, кроме полезных генов, часто содержат генетический материал, который может негативно влиять на проявление агрономически ценных признаков (Zeven *et al.*, 1983; Friebe *et al.*, 1996; Labuschagne *et al.*, 2002; Maghirang *et al.*, 2006). Так, было показано, что присутствие фрагмента от *Aegilops umbellulata* с геном *Lr9* значительно снижает урожайность у линий мягкой пшеницы (Ortelli *et al.*, 1996; Friebe *et al.*, 1996). Известным примером нежелательного влияния чужеродного

материала является ген *Lr19*, происходящий из генома *Agropyron elongatum*. Использование его в сортах мягкой пшеницы ограничено в странах, отдающих предпочтение муке белого цвета, поскольку ген *Lr19* сцеплен с геном *Y*, увеличивающим количество желтого пигмента в эндосперме (Knott, 1968; Uhrin *et al.*, 2008). С другой стороны, Singh с соавт. (1998) обнаружили положительное влияние хромосомного сегмента с геном *Lr19* на урожайность. Присутствие в геноме гена устойчивости к листовой ржавчине *Lr38* может приводить к значительному снижению урожая зерна (Dyck, Friebe, 1993; Mebrate *et al.*, 2008). Было показано, что ген *Lr47*, источником которого является *Aegilops speltoides*, оказывает негативное влияние на агрономические и качественные признаки (Brevis *et al.*, 2008). Присутствие в геноме пшенично-ржаной транслокации 1В.1R, в которой находятся гены *Lr26*, *Pm8*, *Sr31*, довольно часто приводит к ухудшению качества муки и хлеба (Kumlay *et al.*, 2003). Кроме того, негативное влияние чужеродного материала может быть связано с плейотропным действием самих генов устойчивости. Так, показано, что локус *mlo* устойчивости ячменя к мучнистой росе вызывает снижение урожайности зерна на 4 % (Kjær *et al.*, 1990, Brown, 2002).

Негативное влияние чужеродного материала ограничивает использование в селекции ряда генов устойчивости, перенесенных от сородичей пшеницы. В то же время большое количество форм и линий с генами устойчивости к различным болезням, перенесенными из генома сородичей, успешно использованы в практической селекции (Qi *et al.*, 2007).

Исследования, проводимые на отдаленных гибридах, фокусируются преимущественно на поиске новых генов устойчивости и переносе их в коммерческие сорта. При этом в подобных работах практически отсутствуют данные по влиянию чужеродных интрогрессий на другие хозяйственно полезные признаки.

Вид *Triticum timopheevii* Zhuk. обладает комплексным иммунитетом к большинству грибных заболеваний пшеницы. Ряд генов устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr36* и *Sr37*), к мучнистой росе (*Pm6*, *Pm27* и *Pm37*) и бурой ржавчине (*Lr18*) был перенесен от *T. timopheevii* в мягкую пшеницу (McIntosh *et al.*, 2008). Но

потенциал этого вида еще далеко не исчерпан к настоящему моменту.

Ранее в ИЦиГ СО РАН на основе скрещивания мягкой пшеницы *T. aestivum* L. сорта Саратовская 29 с тетраплоидной пшеницей *T. timopheevii* были созданы гибридные линии, обладающие высокой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине и мучнистой росе (Budashkina, Kalinina, 2001). Молекулярно-генетический анализ показал, что они имеют множественные замещения/транслокации в различных хромосомах мягкой пшеницы, и выявил три локуса *QLr.icg-5B*, *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* в хромосомах 5B, 2A и 1A, определяющих устойчивость линий к бурой ржавчине (Леонова и др., 2002, 2008). Поскольку исходные гибридные линии из-за множественного характера интрогрессии достаточно сложно использовать в селекционном процессе в качестве доноров генов резистентности, была создана серия линий, содержащих единичные фрагменты *T. timopheevii* или их комбинации (Салина и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010).

Целью данной работы было определить с помощью молекулярно-генетических и цитологических методов хромосомную локализацию и размеры интрогрессированных фрагментов у линий мягкой пшеницы и оценить влияние различных фрагментов интрогрессии *T. timopheevii* и их комбинаций на устойчивость к болезням и количественные признаки мягкой пшеницы.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 15 интрогрессивных линий мягкой пшеницы (BC₃F₃₋₅), содержащих единичные фрагменты генома *T. timopheevii* и их комбинации (табл. 1). Интрогрессивные линии были получены путем трех возвратных скрещиваний гибридных родительских линий 744 и 832 (*T. aestivum* – *T. timopheevii*, 2n = 42) с сортом Саратовская 29 и последующего самоопыления (Салина и др., 2008). Растения интрогрессивных линий, контрольного сорта Саратовская 29 и гибридных родительских линий выращивали на экспериментальном участке ГНУ СибНИИСХ Россельхозакадемии (г. Омск) в 2009–2010 гг., экспериментальном участке ИЦиГ СО РАН

Таблица 1

Характеристика протяженности интрогрессивных фрагментов от *T. timopheevii* по данным молекулярного анализа

Хромосома <i>T. aestivum</i>	Интрогрессивный фрагмент	Родительская линия-донор фрагмента	Локус устойчивости к бурой ржавчине	SSR маркеры*, фланкирующие фрагменты транслокации	Размер интрогрессивного фрагмента в сМ по данным ITMI
1A	1A ^t	832	<i>QLr.icg-1A</i>	<i>Xgwm0691-Xgwm0633</i>	91,8
2A	2A ^t	832	<i>QLr.icg-2A</i>	<i>Xgwm1036-Xgwm0372</i>	14,5
2B	2G(1)**	832		<i>Xgwm0257-Xgwm0785</i>	174,9
2B	2GL(2)**	744		<i>Xgpw1109-Xgwm0846</i>	106,0
5B	5GL	832	<i>QLr.icg-5B</i>	<i>Xgwm1246a-Xcfe229</i>	77,8
6B	6G(1)**	744		<i>Xgwm0361-Xgwm0219</i>	145,3
6B	6GL(2)**	744		<i>Xgwm1199-Xgwm0219</i>	100,7

Примечание. Для иллюстрации длины и локализации интрогрессивных фрагментов использовались карты сцепления ITMI популяции (Ganal, Röder, 2007).

* Маркеры, использованные в анализе:

1A/1A^t – *Xgwm*: 33, 99, 164, 357, 633, 691, 750, 752, 1104, 1097, 148, 1223, 1148, 778; *Xgpw* – 7072, 7258a.

2A/2A^t – *Xgwm*: 95, 312, 372, 726, 614, 830, 846, 1151, 1198, 1115, 1036, 1070b, 1256, 739; *Xgpw*-7501a.

2B/2G – *Xgwm*: 120, 148, 257, 630, 785a, 846, 1027, 1048, 526, 1067, 1128, 1177, 619, 1070a; *Xgpw*-1109, 7501b.

5B/5G – *Xgwm*: 234, 540, 213, 371, 408, 499, 814, 1054, 1257, 1043, 777, 604, 1246, 1072; *Xcfe*-229.

6B/6G – *Xgwm*: 613, 1255, 816, 361, 518, 626, 785b, 1199, 1076, 889, 1233, 219.

** Цифры 1 и 2 маркируют разные по длине интрогрессивные фрагменты одной и той же хромосомы *T. timopheevii*.

(Новосибирская область) в 2009–2010 гг. и экспериментальном участке ГНУ СибНИИРС Россельхозакадемии в 2009–2010 гг. (Новосибирская область), далее в тексте обозначенных как поле/участок 1, 2 и 3 соответственно. Растения выращивали на делянках шириной 50 см, по 30 зерен в ряду с расстоянием между рядами 20 см.

Выделение ДНК и микросателлитный анализ. Суммарную ДНК выделяли из 5–7-дневных проростков по методу Плашке с соавт. (Plaschke *et al.*, 1995). В работе были использованы микросателлитные маркеры *Xgwm* (Ganal, Röder, 2007), *Xgpw* (Sourdille *et al.*, 2004), *Xcfe* (Zhang *et al.*, 2005) с известной локализацией в хромосомах *T. aestivum* и *T. timopheevii* (Salina *et al.*, 2006a). Процедуру полимеразной цепной реакции (ПЦР) осуществляли с использованием меченого праймера M13 и немеченых праймеров к микросателлитным локусам согласно методике Hayden с соавт. (2002). Разделение фрагментов ПЦР выполняли на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems) в 6 %-м денатурирующем полиакриламидном геле. Размер фрагментов рассчитывали с помо-

щью компьютерной программы Peak Scanner (Applied Biosystems) относительно стандартных образцов ДНК известной длины.

ДНК-зонды. Повторяющаяся последовательность Spelt1 с длиной мономера 178 п.н. была выделена из *Ae. speltoides* и клонирована в плазмидный вектор pBluescript II SK+ (Salina *et al.*, 2006b). Последовательность pSc119.2 с длиной мономера 120 п.н. изолирована из генома *Secale cereale* L. и клонирована в плазмидный вектор pBR322 (Bedbrook *et al.*, 1980). Зонды pSc119.2 и Spelt1 локализуются в основном в хромосомах В- и G-геномов (Jiang, Gill, 1993, 1994; Salina *et al.*, 2006b).

Флюоресцентная *in situ*-гибридизация (FISH). FISH проводили в соответствии с ранее опубликованной методикой (Salina *et al.*, 2006b).

С-бэндинг. С-окрашивание проводили с соответствии со стандартной методикой, согласно Badaeva с соавт. (1994).

Оценка устойчивости к болезням. Оценку устойчивости к болезням полученных интрогрессивных линий и родительских форм проводили на стадии взрослых растений.

Учет поражения листовой ржавчиной проводили по шкале Майнса и Джексона: 0 – иммунный тип, отсутствие симптомов поражения; 1 – весьма устойчивый, очень мелкие пустулы с некрозом; 2 – умеренно устойчивый, пустулы мелкого и среднего размера с некрозом или хлорозом; 3 – умеренно восприимчивый, пустулы средней величины без некроза; 4 – весьма восприимчивый, пустулы крупные, зачастую сливающиеся вместе, участков омертвевшей ткани нет (Mains, Jackson, 1926). Устойчивость оценивали два раза – на стадии выхода растения в трубку и стадии молочной спелости зерна.

Симптомы поражения мучнистой росой оценивались по шкале учета интенсивности поражения растений зерновых культур мучнистой росой от 0 до 9 баллов: 1–3 – чувствительные растения, 4–5 – умеренно восприимчивые, 6 – умеренно устойчивые, 7–9 – весьма устойчивые (Saari, Prescott, 1975).

Анализ устойчивости к стеблевой ржавчине проводили в полевых условиях на стадии восковой спелости по унифицированной шкале типов реакций растений зерновых культур к стеблевой ржавчине: 0 – иммунитет, признаки болезни отсутствуют; R – устойчивость, хлоротические или некротические пятна, пустулы отсутствуют; MR – умеренная устойчивость, небольшие пустулы, окруженные хлоротическими или некротическими пятнами; M – гетерогенный тип, пустулы различного размера, окруженные хлоротическими и некротическими пятнами или без них; MS – умеренная восприимчивость; S – восприимчивость, пустулы крупные, иногда сливающиеся, часто с хлорозом, но без некроза (Roelfs *et al.*, 1992). Оценку интенсивности поражения растений проводили согласно модифицированной шкале Кобба в процентах (площадь покрытия листьев и стеблей пустулами) (Peterson *et al.*, 1948; Roelfs *et al.*, 1992).

Анализ количественных признаков. Анализ элементов структуры урожая проводили по 7 количественным признакам, определяющим продуктивность растений. Признаки оценивались три раза: на участке 1 в 2009 и 2010 гг. и на участке 2 в 2010 г. Оценка признаков проводилась для 20 случайно выбранных растений для каждой интрогрессивной линии и родительских форм. В работе оценивали следующие показатели: высота растения, длина колоса, число

колосков в колосе, число зерен в колосе, число зерен с растения, масса зерна в колосе, масса зерна с растения, масса 1000 зерен.

Статистический анализ. Сравнение количественных признаков проводили посредством однофакторного дисперсионного анализа (Фактор – генотип). Достоверность межгрупповых различий оценивали по критерию множественных сравнений LSD Фишера. Достоверность внутриклассового коэффициента корреляции при оценке влияния окружающей среды (фактор – поле) на формирование количественных признаков оценивали с помощью критерия Фишера. Статистическую обработку осуществляли с помощью программы STATISTICA 8.0.

Результаты

Молекулярно-генетическая и цитологическая характеристика интрогрессивных линий *T. aestivum*–*T. timopheevii*

Для более детального анализа геномного состава и протяженности фрагментов интрогрессии из коллекции интрогрессивных линий *T. aestivum*–*T. timopheevii*, полученных ранее методом маркер-опосредованного отбора, было выбрано 15 линий, содержащих участки интрогрессии в 1, 2, 5 и 6 группах гомеологичных хромосом (Салина и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010). Интрогрессивные линии были проанализированы с использованием трех методических подходов, а именно: SSR-анализа, *in situ* гибридизации и С-окрашивания. Результаты оценки геномного состава и протяженности фрагментов представлены в табл. 1 и 2.

SSR-анализ с использованием от 12 до 16 маркеров на каждую изучаемую хромосому позволил уточнить протяженность области интрогрессии у отобранных интрогрессивных линий. Так, было показано, что интрогрессивные фрагменты в хромосоме 1A у изучаемых линий 5352-70, 5352-79, 5352-83 и 5352-104 имеют одинаковую длину и захватывают существенную часть короткого и часть длинного плеча хромосомы (табл. 1). Область интрогрессии у линий 5352-83, 5352-104 и 5360-191/5 в хромосоме 2A существенно короче, затрагивает центрально-мерную область и не отличается по про-

Таблица 2

Характеристика геномного состава интрогрессивных линий мягкой пшеницы по результатам молекулярно-генетического и цитологического анализа

N	Линия ¹	SSR анализ	FISH	С-окрашивание
1	3862-5 ²	2GL(2)	2GL	2GL
2	3862-15 ²	2GL(2)	2GL	2GL
3	3869-47	6GL(2)	6GL	6GL
4	3869-50	6G(1)	6GL	6GL
5	3869-51	6GL(2)	6GL	6GL
6	5352-70	1A^t, 2G(1) 5GL	5GL	2GS, 5GL
7	5352-79	1A^t 5GL	5GL	5GL
8	5352-83	1A^t, 2A^t	–	–
9	5352-104	1A^t, 2A^t	–	–
10	5360-107	2G(1)	–	2GS
11	5366-157	5GL	5GL	5GL
12	5366-171	5GL	5GL 3GL	5GL
13	5366-180	5GL	5GL	5GL
14	5360-191/5	2A^t, 5GL	5GL	5GL
15	5360-191/28	5GL	5GL	5GL
16	744	1A^t, 2G, 5A^tL, 5GL, 6G	2G, 4GL, 5GL³, 6G	2G, 4GL, 5GL³, 6G
17	832	1A^t, 2A^t, 2GS, 3A^tL, 5A^tL, 5GL	1A^t, 3GL, 4GL, 5GL	1A^t, 2A^t, 2GS, 4GL, 5GL, 6A^tL⁴

Примечание. Жирным шрифтом выделены фрагменты интрогрессии от *T. timopheevii*, которые выявляются только одним или двумя методами.

¹ Линии под номерами 3862, 3869 получены от исходной линии 744; линии под номерами 5352, 5360, 5366 – от 832.

² У линий хромосома 2D замещена на транслоцированную хромосому 2BS.2GL, состав 2-й гомеологической группы: 2A, 2B, 2BS.2GL.

³ Негомеологическая транслокация 5DS.5GL.

⁴ Негомеологическая транслокация 6DS.6DL-6A^tL.

тяженности между линиями. Линии, имеющие интрогрессию от *T. timopheevii* в хромосоме 2B, делятся на две группы в зависимости от протяженности участка интрогрессии. У линий 5352-70 и 5360-107 интрогрессия затрагивает большую часть короткого и небольшую часть длинного плеча, а у линий 3862-5, 3862-15 – только длинное плечо хромосомы 2B. Транслокация в хромосоме 5B у линий 5352-70, 5352-79, 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5 и 5360-191/28 имеет одинаковую протяженность и находится в теломерной области длинного плеча. При определении длины фрагмента интрогрессии в хромосоме 6B было выявлено 2 типа линий, у которых область интрогрессии затрагивала или оба плеча (линия 3869-50), или только длинное плечо (3869-47 и 3869-51).

С учетом того что теломерные и гомеологические транслокации не всегда можно одно-

значно выявить SSR маркерами, родительские гибридные линии 744 и 832 и отобранные интрогрессивные линии были проанализированы методами флюоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) и дифференциальным С-окрашиванием. Зонд Spelt1, являющийся видоспецифичным для *Ae. speltoides* (Salina *et al.*, 2006b), присутствует на хромосомах пшеницы *T. timopheevii* и отсутствует в геноме мягкой пшеницы сорта Саратовская 29, что позволяет эффективно использовать данный зонд при анализе гибридов мягкой пшеницы с указанными видами. Все сайты повтора Spelt1 имеют субтеломерную локализацию на хромосомах 2A^t, 6A^t, 1G, 2G, 4G, 5G, причем размеры сигналов в зависимости от хромосомы варьируют.

С помощью цитологического анализа были подтверждены перестройки в хромосомах 2B, 5B, 6B у изучаемых интрогрессивных и

родительских гибридных линий, выявленные SSR-анализом. Так, например, наличие локуса *Spelt1* на хромосоме 2В у линий 3862-5 (рис. 1, г, табл. 2) и 3862-15 позволило выявить присутствие в их геномах фрагмента 2G от *T. timopheevii*. У линий 3869-47, 3869-50 и 3869-51 методом *in situ* гибридизации было показано, что на длинном плече хромосомы 6В блоки повтора pSc119.2 имели то же расположение, что и на длинном плече хромосомы 6G *T. timopheevii*. С-окрашивание подтвердило наличие протяженных транслокаций 6BS-6GS.6GL и 6BS.6BL-6G в геномах данных линий. У линий 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5366-191/5 (рис. 1, е) и 5366-191/28 методом FISH был обнаружен сайт повтора *Spelt1*, локализованный на длинном плече хромосомы 5В, что говорит о присутствии в геномах линий транслокации 5BS.5BL-5GL. Данная транслокация при С-окрашивании выявляется по интенсивно окрашенному терминальному бэнду на длинном плече хромосомы 5В. FISH на метафазных хромосомах линии 5352-70 выявила присутствие транслокации 5BS.5BL-5GL по расположенному в длинном плече сигналу *Spelt1*. Дифференциальное окрашивание хромосом линии, кроме интрогрессивного фрагмента 5GL, позволило выявить в геноме интрогрессивный фрагмент 2G от *T. timopheevii* (табл. 2).

Кроме того, были обнаружены транслокации, затрагивающие хромосомы 3В, 4В, и отмечены случаи гомеологичных транслокаций в хромосомах 5D, 6D, не выявляемые SSR анализом. Так, у родительской гибридной линии 832 и линии 5366-171 (рис. 1, в) блок повтора pSc119.2, расположенный на длинном плече хромосомы 3В, указывает на присутствие транслокации 3BS.3BL-3GL. Транслокация 4BS.4BL-4GL не была обнаружена с помощью молекулярного анализа, но выявлялась методом *in situ* по наличию сигнала пробы *Spelt1* и С-окрашиванием по яркому терминальному бэнду (рис. 1, а, б). В гибридной линии 744 была обнаружена негемеологичная транслокация интрогрессивного фрагмента 5GL в длинное плечо хромосомы 5D (рис. 1, б). Гомеологичная транслокация, затрагивающая хромосому 6D, была выявлена методом С-окрашивания у линии 832 (рис. 1, а). Яркий терминальный бэнд, локализованный на длинном плече хромосомы 6D, нетипичен для

данной хромосомы. Это дает нам возможность предположить наличие у данной линии транслокации фрагмента хромосомы 6G от *T. timopheevii* в длинное плечо хромосомы 6D. Однако отсутствие других цитологических маркеров не позволяет точно определить происхождение транслоцированного фрагмента.

Сопоставление данных трех методических подходов по оценке геномного состава указывает на то, что наиболее точное описание структуры генома и хромосомных перестроек, возникающих при гибридизации видов с частичной гомеологией хромосом, можно дать с использованием только комплексного молекулярно-генетического и цитологического анализа (табл. 2). Использование такого подхода позволило также установить сложную реорганизацию, произошедшую во второй гомеологичной группе хромосом во время создания гибридов *T. aestivum*–*T. timopheevii*. Так, у гибридной линии 744 возникла транслокация 2BS.2GL, которая в процессе беккроссирования вытеснила не хромосому 2В, что следовало ожидать, а хромосому 2D (рис. 1, б, табл. 2).

Таким образом, из 15 отобранных линий для изучения влияния чужеродных транслокаций на проявление хозяйственно ценных признаков 10 линий полностью различаются по геномному составу, из них 4 линии имеют от одной до двух сестринских линий со сходным характером интрогрессии. Следует также отметить, что линии с транслокациями в хромосомах 5В, 2А и 1А несут локусы *Qlricg-5B*, *Qlricg-2A* и *Qlricg-1A* соответственно, определяющие устойчивость линий к бурой ржавчине, согласно ранее проведенному анализу на гибридных линиях 832 и 744 (Леонова и др., 2008).

Характеристика интрогрессивных линий на устойчивость к болезням

Оценку устойчивости интрогрессивных линий к грибным болезням проводили в различных регионах Западной Сибири в 2009 и в 2010 гг., отличающихся погодными характеристиками и инфекционной нагрузкой. Погодные условия в 2010 г. оказались более благоприятными для развития заболеваний, и инфекционный фон в целом был выше, чем в 2009 г. В табл. 3 приводится характеристика устойчивости по

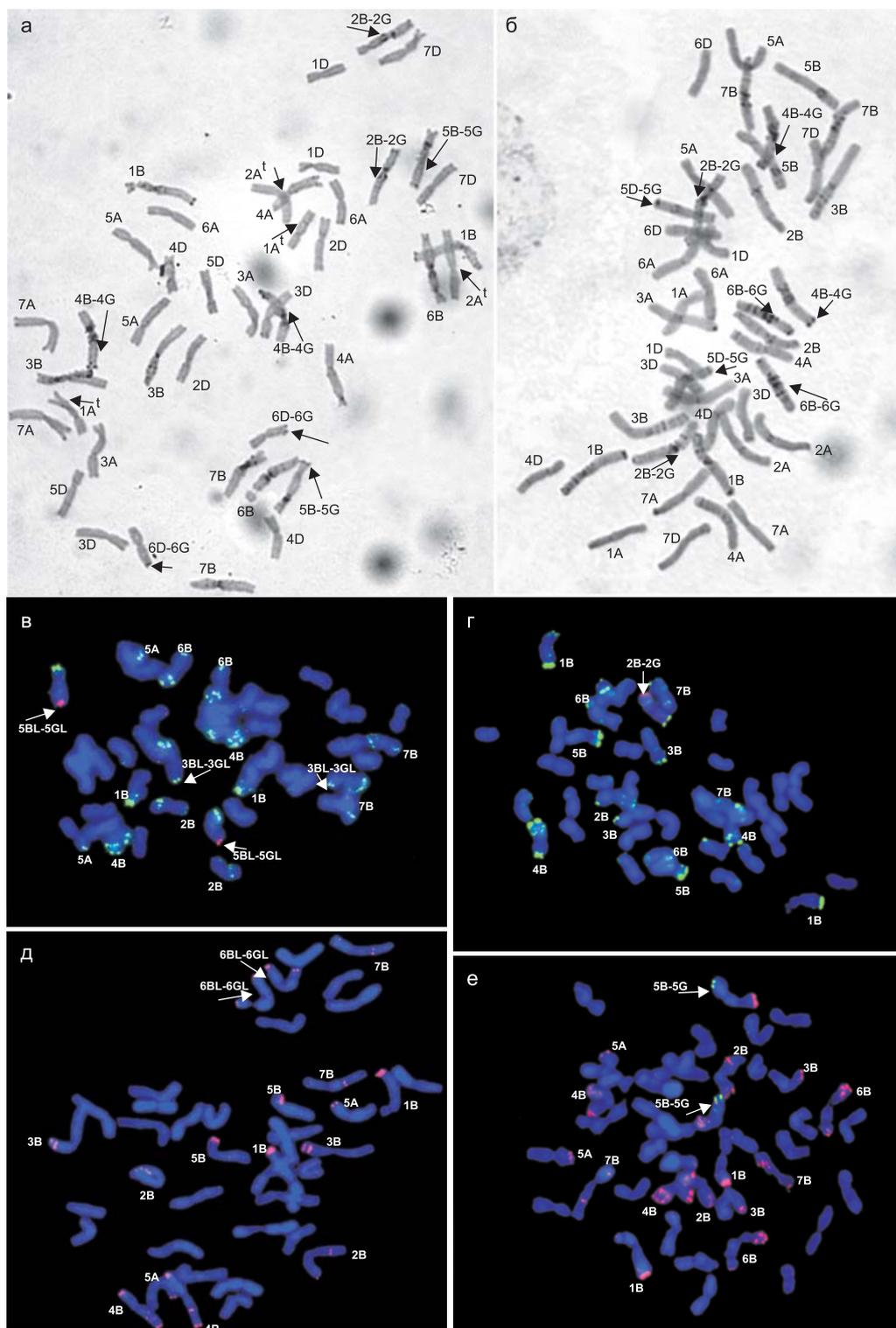


Рис. 1. С-окрашивание метафазных хромосом 832 (а) и 744 (б). FISH на метафазных хромосомах интрогрессивных линий 5366-171 (в), 3862-5 (г), 3869-47 (д), 5360-191/5 (е). в, г – проба pSc 119.2 мечена биотином и выявлена с помощью FITC (зеленый); проба Spelt-1 мечена дигоксигенином и выявлена родамином (красный). д, е – проба pSc 119.2 мечена дигоксигенином и выявлена с помощью родамина (красный); проба Spelt-1 мечена биотином и выявлена FITC (зеленый). Стрелками указаны транслокации фрагментов *T. timopheevii*.

Таблица 3

Характеристика линий мягкой пшеницы по типу интрогрессии и устойчивости к бурой и стеблевой ржавчинам, мучнистой росе

Линия	Интрогрессивные фрагменты от <i>T. timopheevii</i> (генотип по данным всех подходов)	Мучнистая роса 2009/2010, поле 2, балл	Мучнистая роса 2009/2010 поле 1, балл	Бурая ржавчина, 2009/2010, поле 2, балл	Стеблевая ржавчина, 2010, поле 1, %**	Стеблевая ржавчина, 2010, поле 2, %
3862-5	2GL(2)	4/4	3/2	4/4	70/30**	5R-MR
3862-15	2GL(2)	4/4	3/2	4/4	80/20	5R-MR
3869-47	6GL(2)	4/3	3/2	4/4	70/50	nd
3869-50	6G(1)	4/3	3/2	4/4	80/40	50S
3869-51	6GL(2)	4/4	4/2	4/4	80/40	nd
5352-70	1A^t 2G(1) 5GL	6/5	6/4	0-1/1	50/20	40MS-S
5352-79	1A^t 5GL	3/4	nd/nd	0-1/1	nd*	nd
5352-83	1A^t 2A^t	nd	nd/nd	3/3	nd	nd
5352-104	1A^t 2A^t	4/5	5/3	3/3	80/30	nd
5360-107	2G(1)	3/4	4/2	4/4	60/40	50MS-S
5366-157	5GL	nd	nd/nd	1/1	nd	60MS-S
5366-171	3GL 5GL	4/4	4/4	1/1-2	10/10	50MS-S
5366-180	5GL	4/4	6/4	1/1-2	15/5	60MS-S
5360-191/5	2A^t 5GL	4/4	5/3	1/1-2	50/10	50MS-S
5360-191/28	5GL	3/4	5,5/2	1/1-2	10/5	nd
744	1A^t, 2G, 4GL 5A^tL, 5GL, 6G	8/7	7/6	0/1	10/5.	0R
832	1A^t, 2A^t, 2GS, 3A^tL, 3GL, 4GL, 5A^tL, 5GL, 6A^tL	8/7	8/7	0/0	15/ е.п.	0R
Саратовская 29	–	3-4/3	4/3	4/4	80/50	60S

Примечание. Жирным шрифтом выделены хромосомы, несущие локусы устойчивости к бурой ржавчине; nd – данные отсутствуют; ** % поражения лист/стебель, е.п. – единичные пестулы.

двум сезонам для максимума развития болезней. Гибридные родительские линии 744 и 832 во всех полевых опытах проявили высокую устойчивость к бурой и стеблевой ржавчине, а также к мучнистой росе.

Оценка устойчивости к бурой ржавчине проводилась в 2009 и 2010 гг. на экспериментальных участках 2 и 3. Развитие бурой ржавчины у анализируемых линий в течение двух сезонов проходило сходным образом. Устойчивость на уровне 0–1 балла по шкале Майнса–Джексона проявили линии с единичными интрогрессивными фрагментами хромосомы 5G, содержащие локус устойчивости *QLr.icg-5B*, и линии, содержащие этот локус в комбинации с другими фрагментами *T. timopheevii* (табл. 3).

Присутствие в геноме линий 5352-83 и 5352-104 транслокаций 1A^t и 2A^t с минорными локусами устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* оказывало сдерживающий эффект на проявление болезни (балл = 3). Так, в сезон 2010 г. развитие болезни у линий с локусами *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* проявилось на неделю позже по сравнению с контрольным сортом. Восприимчивый сорт Саратовская 29 и все линии с единичными фрагментами из хромосом 6G и 2G *T. timopheevii* были существенно поражены бурой ржавчиной (балл = 4).

Устойчивость к мучнистой росе оценивали в 2009–2010 гг. на участках Новосибирской и Омской областей. Все линии, за исключением линии 5352-70, показали умеренно восприимчи-

вый тип реакции и практически не отличались от родительского сорта Саратовская 29.

Инфекционный фон для возбудителя стеблевой ржавчины в 2009 г. был низким, поэтому позднее и слабое развитие стеблевой ржавчины (< 20 % пустул на листе) не позволило выявить значимые различия среди интрогрессивных линий. Оценка поражения стеблевой ржавчиной проводилась на участках 1 и 2 в 2010 г. Было показано, что линии 3862-5 и 3862-15, содержащие в геноме фрагмент хромосомы 2GL, оказались устойчивыми к расам стеблевой ржавчины, характерным для Новосибирской области (табл. 3). Все другие линии были полностью восприимчивыми к данному заболеванию и не отличались от сорта Саратовская 29. На участке 1 в Омске при оценке линий на устойчивость к стеблевой ржавчине было обнаружено, что слабовосприимчивый защитный ответ проявляют линии 5352-70, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5 и 5360-191/28 с транслокацией 5BS.5BL-5GL (15/10 % пустул на листьях/стеблях соответственно). Восприимчивость всех остальных линий оказалась намного выше (на уровне 70/40 %), что аналогично контрольному сорту (80/50 %) (табл. 3).

Характеристика интрогрессивных линий по количественным признакам

Выбранные линии позволяют оценить влияние как индивидуальных интрогрессивных фрагментов, так и их комбинаций на формирование количественных признаков. Оценка линий проводилась на экспериментальных участках 2 в 2010 г. и 1 в течение двух сезонов

2009 и 2010 гг. Полученные данные представлены на рис. 2–4. В целом интрогрессивные линии по отдельным показателям превышали родительские гибридные линии 744 и 832 и почти не отличались от сорта Саратовская 29.

Анализ количественных признаков в полевых условиях проводился для 15 интрогрессивных линий. Поскольку сравнение линий с одинаковыми фрагментами от *T. timopheevii* в геноме с контрольным сортом Саратовская 29 выявляло сходные закономерности, то на рисунках представлены только 9 линий с разными комбинациями фрагментов *T. timopheevii*.

Высота растения. Среднее значение этого параметра варьировало от $103,20 \pm 0,75$ см на участке 1 в 2009 г. до $119,13 \pm 0,58$ на поле 2 в 2010 г. Однако межлинейные различия при сравнении с родительским сортом были одинаковыми для обоих экспериментальных участков. Было обнаружено, что линии 3862-5 и 3862-15 с транслокациями 2BS.2GL достоверно ниже ($p < 0,005$ для полей 1 и 2) родительского сорта Саратовская 29 по высоте. При этом для исходных гибридных линий 744 и 832, которые тоже содержат в геноме фрагменты хромосомы 2G, снижения по высоте не отмечено.

Продуктивность у пшеницы складывается из многих признаков, наиболее важными из них являются длина колоса, число колосков в колосе, масса зерна с растения и масса зерна с колоса.

Длина колоса и число колосков в колосе. Было обнаружено, что линии 744 и 832, 5352-70 и 5352-104 имеют достоверно большую длину колоса, чем сорт Саратовская 29 ($p < 0,005$). Однако данные по анализу числа колосков не указывают на существование корреляции между

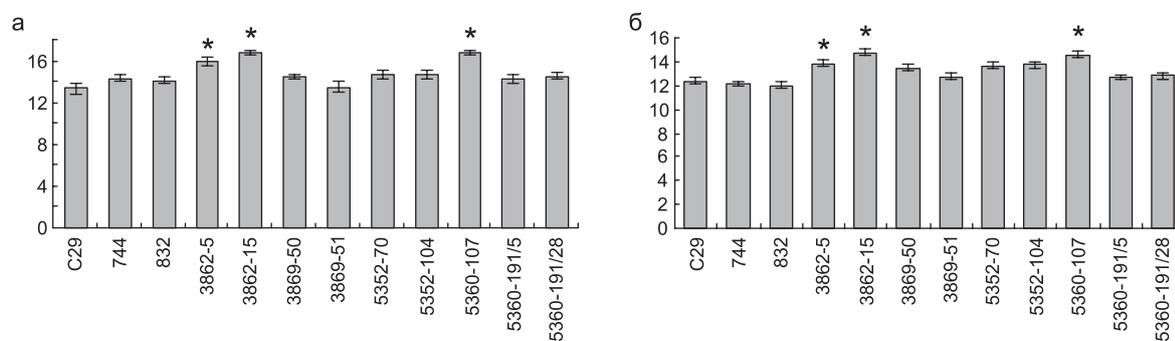


Рис. 2. Характеристика интрогрессивных линий по признаку «число колосков в главном колосе».

а – поле 1, 2009 г.; б – поле 2, 2010 г. * Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0,005$.

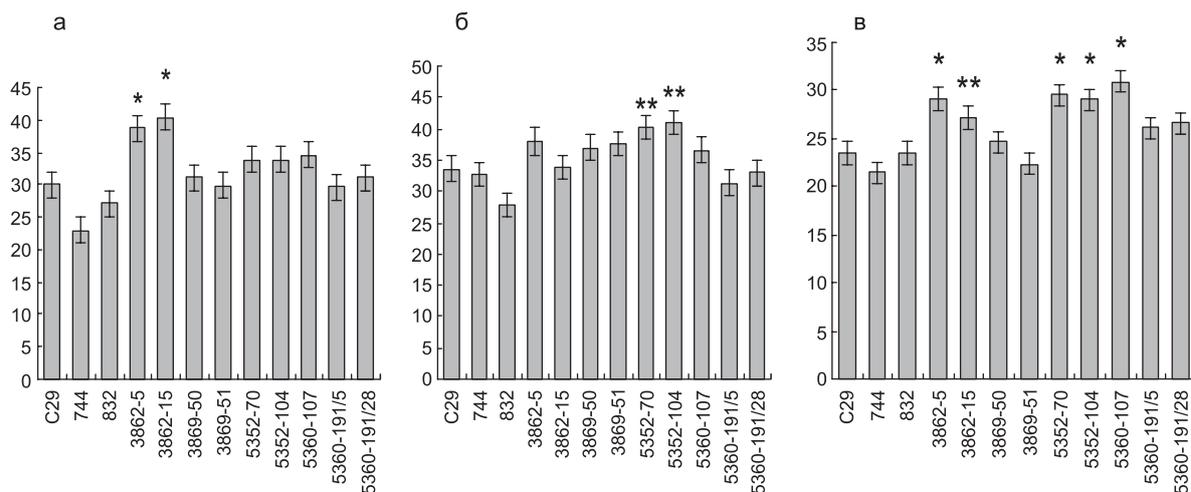


Рис. 3. Характеристика интродюгсивных линий по признаку «число зерен в главном колосе».

а – поле 1, 2009 г.; б – поле 1, 2010 г.; в – поле 2, 2010 г. *, ** Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0,005$; $p < 0,05$.

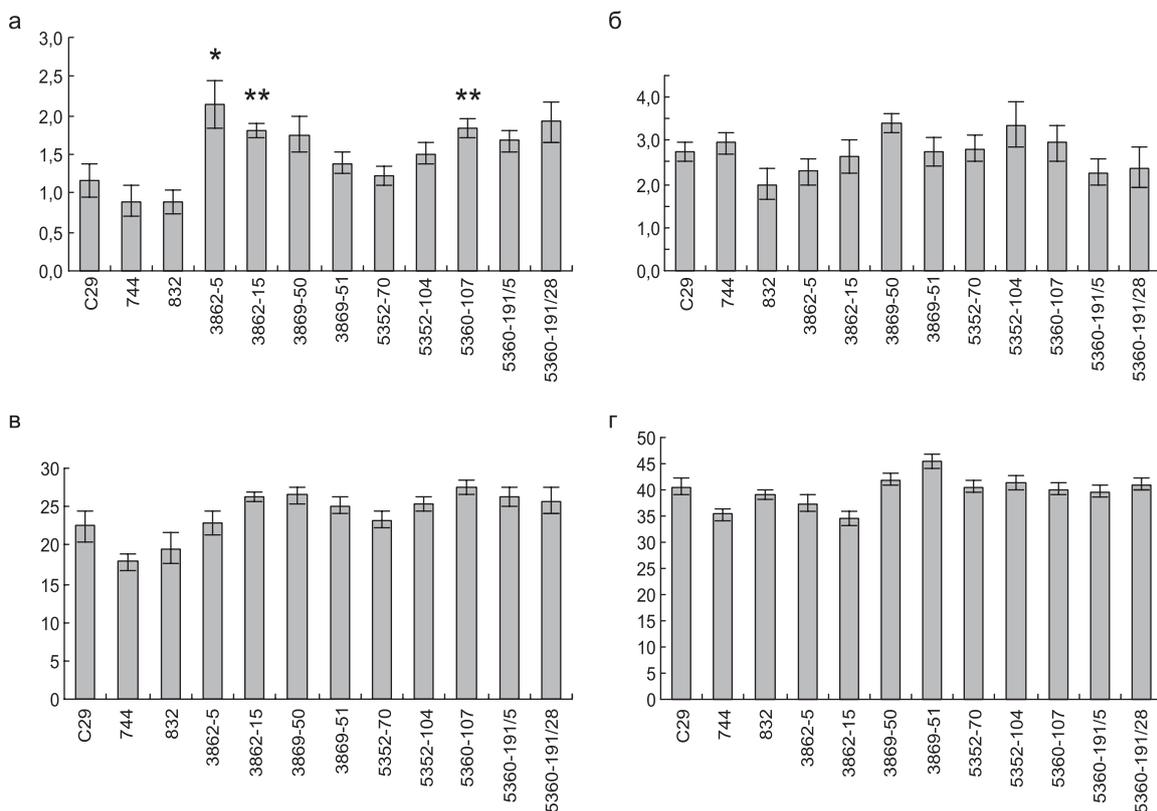


Рис. 4. Характеристика интродюгсивных линий по признакам «масса зерна с растения» (а, б) и «вес 1000 зерен» (в, г).

а, в – поле 1, 2009 г.; б, г – поле 1, 2010 г. *, ** Линии, достоверно отличающиеся от контрольного сорта Саратовская 29. $p < 0,005$; $p < 0,05$.

длиной колоса и числом колосков в колосе. Это, возможно, объясняется снижением плотности колоса у линий с длинным колосом. Ни одна из интродюгсивных линий не уступала по

числу колосков исходному сорту. Этот показатель был достоверно выше у линий 3862-5, 3862-15 и 5360-107 на участках 1 и 2 (рис. 2). У изученных интродюгсивных линий среднее

число колосков в колосе колебалось в пределах 12,7–16,8 шт. на участках 1 в 2009 и 2010 гг. и на участке 2 в 2010 г. Так, например, на участке 1 в 2009 г. наибольшие значения по этому признаку были у линий 3862-5 ($15,90 \pm 0,43$), 3862-15 ($16,80 \pm 0,20$), 5352-107 ($16,70 \pm 0,26$), тогда как у Саратовской 29 этот показатель в среднем был ниже ($13,30 \pm 0,54$). В сумме по двум параметрам (длина колоса и число колосков) было выявлено три линии 3862-5, 3862-15 и 5360-107 с наилучшими характеристиками, превышающими показатели исходного сорта Саратовская 29 (табл. 4).

Число зерен в колосе. Число зерен в главном колосе в среднем соответствовало уровню родительского сорта Саратовская 29. Наилучшие значения по этому признаку отмечены для линий 3862-5, 3862-15, 5352-70, 5352-104, 5360-107. Достоверно отличаются от Саратовской 29 по двум годам линии 5352-70, 5352-104, 5352-107 (участки 1 и 2 в 2010 г.) и линии 3862-5, 3862-15 (участки 1 в 2009 г. и 2 в 2010 г.) (рис. 3).

Масса зерна в колосе и с растения и масса 1000 зерен. Данные, полученные в 2010 г. на экспериментальном участке 1 по массе зерна, были исключены из анализа, поскольку показатели контрольного сорта были значительно снижены из-за высокого уровня развития болезней.

Среднее значение массы зерна в колосе у всех линий в основном соответствовало уровню исходного сорта. Большие значения по этому признаку отмечены для линий 3862-5 и 3862-15 в условиях 2009 г. и для линий 5352-70, 5352-104, 5360-107 в 2010 г., которые, как было отмечено выше, имеют хорошие показатели и по другим признакам колоса. Однако достоверных отличий для всех изученных линий по двум годам не выявлено.

Наиболее важный признак, характеризующий продуктивность, – масса зерна с растения – варьировал у анализируемого материала в среднем от 1,95 до 3,40 г. Средние значения за разные годы на участке 1 по массе зерна заметно варьируют, но в целом закономерности для линий сохраняются, и среднее значение этого параметра в основном соответствовало уровню родительского сорта. Вероятно, различия обусловлены флуктуациями погодных условий и инфекционного фона. Достоверные отличия от родительского сорта для некоторых линий

обнаруживаются в 2009 г., что связано с нетипично низкими показателями родительского сорта и с более низкими показателями в целом для линий (рис. 4). По признаку «масса 1000 зерен» все линии достоверно не отличались от родительского сорта.

Однофакторный дисперсионный анализ по оценке вклада среды в формирование четырех количественных признаков (длина колоса, число колосков в колосе, число зерен с колоса и масса зерна с колоса) у интрогрессивных линий показал, что практически у всех линий признак «масса зерна с колоса» достоверно находится в зависимости от условий среды, отличающихся по годам (табл. 4). Значительная зависимость признака «число колосков в колосе» от условий среды показана для линии 3862-15. Для трех линий (3862-15, 3869-47 и 3869-51) и сорта Саратовская 29 показано, что в значительной степени формирование признака «число колосков» зависит от условий среды.

Обсуждение

Создание и использование в селекции интрогрессивных линий мягкой пшеницы с небольшими фрагментами чужеродного материала являются предпочтительными по сравнению с замещенными и дополненными линиями. В этой работе мы охарактеризовали 15 интрогрессивных линий с материалом от *T. timopheevii*. Проведенный анализ с помощью молекулярных маркеров и цитологическими методами позволил определить размеры интрогрессивных фрагментов хромосом 1A^t, 2A^t, 2G, 5G и 6G *T. timopheevii* и уточнить их локализацию в геноме линий. Полученные данные позволили провести изучение влияния различных фрагментов интрогрессии *T. timopheevii* и их комбинаций на проявление хозяйственно ценных признаков мягкой пшеницы.

Вклад транслокаций от *T. timopheevii* в формирование устойчивости к заболеваниям

Устойчивость к бурой ржавчине. Главный локус устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B*, определяющий более половины проявления признака, расположен в небольшой теломерной

Таблица 4

Оценка некоторых количественных признаков продуктивности
и анализ однофакторного дисперсионного комплекса (фактор – поле)
по некоторым количественным признакам
продуктивности интрогрессивных линий и родительских форм

Линия	Признак	$X \pm s_x$			r_{wr}	F
		Поле 1, 2009 г.	Поле 1, 2010 г.	Поле 2, 2010 г.		
3862-5	Длина колоса, см	8,95 ± 0,26	8,40 ± 0,43	7,74 ± 0,18	0,22	3,82
	Число колосков в колосе, шт.	15,90 ± 0,43	15,00 ± 0,58	13,85 ± 0,31	0,28*	4,86
	Число зерен в колосе, шт.	38,70 ± 1,78	36,00 ± 2,87	29,36 ± 1,34	0,21	3,71
	Масса зерна с колоса, г	1,01 ± 0,09	1,41 ± 0,12	0,66 ± 0,05	0,53**	12,09
3862-15	Длина колоса, см	8,80 ± 0,21	8,05 ± 0,24	7,35 ± 0,21	0,26*	4,60
	Число колосков в колосе, шт.	16,80 ± 0,20	14,30 ± 0,47	14,76 ± 0,29	0,59***	15,59
	Число зерен в колосе, шт.	40,30 ± 2,40	33,80 ± 1,79	27,06 ± 1,45	0,49**	10,43
	Масса зерна с колоса, г	1,15 ± 0,09	1,20 ± 0,08	0,69 ± 0,06	0,56***	13,59
3869-47	Длина колоса, см	8,20 ± 0,19	7,98 ± 0,24	7,65 ± 0,26	0,02	1,22
	Число колосков в колосе, шт.	14,40 ± 0,37	13,40 ± 0,27	13,25 ± 0,32	0,17	2,99
	Число зерен в колосе, шт.	29,30 ± 1,23	34,90 ± 2,37	21,45 ± 0,87	0,44**	8,88
	Масса зерна с колоса, г	0,84 ± 0,05	1,46 ± 0,12	0,67 ± 0,06	0,74**	29,46
3869-51	Длина колоса, см	7,70 ± 0,17	7,95 ± 0,27	7,10 ± 0,19	0,08	0,29
	Число колосков в колосе, шт.	13,50 ± 0,52	14,40 ± 0,43	12,75 ± 0,24	0,17	3,03
	Число зерен в колосе, шт.	29,90 ± 2,07	37,60 ± 1,95	22,35 ± 0,99	0,43**	8,39
	Масса зерна с колоса, г	0,85 ± 0,70	1,74 ± 0,11	0,66 ± 0,05	0,75***	30,27
5352-70	Длина колоса, см	9,40 ± 0,32	8,48 ± 0,28	8,74 ± 0,25	0,11	2,25
	Число колосков в колосе, шт.	14,60 ± 0,41	14,90 ± 0,41	13,7 ± 0,25	0,20	3,47
	Число зерен в колосе, шт.	33,82 ± 2,53	40,20 ± 1,89	29,55 ± 1,15	0,42**	8,35
	Масса зерна с колоса, г	0,90 ± 0,09	1,73 ± 0,12	0,73 ± 0,05	0,75	31,65
5352-104	Длина колоса, см	9,10 ± 0,37	9,62 ± 0,38	8,60 ± 0,18	0,10	2,16
	Число колосков в колосе, шт.	14,70 ± 0,36	14,8 ± 0,29	13,75 ± 0,24	0,18	3,26
	Число зерен в колосе, шт.	33,80 ± 2,04	41,00 ± 2,75	29,05 ± 1,04	0,38*	7,19
	Масса зерна с колоса, г	1,01 ± 0,09	1,79 ± 0,12	0,81 ± 0,05	0,73***	27,57
5360-107	Длина колоса, см	8,35 ± 0,26	8,33 ± 0,27	7,47 ± 0,16	0,16	2,97
	Число колосков в колосе, шт.	16,70 ± 0,26	15,40 ± 0,76	14,58 ± 0,27	0,20	3,43
	Число зерен в колосе, шт.	34,60 ± 1,78	36,60 ± 2,99	30,95 ± 1,12	0,01	1,06
	Масса зерна с колоса, г	1,13 ± 0,07	1,55 ± 0,12	1,13 ± 0,06	0,42**	8,14
5360-191/5	Длина колоса, см	7,75 ± 0,17	7,04 ± 0,23	6,90 ± 0,19	0,14	2,60
	Число колосков в колосе, шт.	14,20 ± 0,44	13,00 ± 0,59	12,70 ± 0,27	0,16	2,95
	Число зерен в колосе, шт.	29,70 ± 2,29	31,30 ± 1,89	26,10 ± 0,89	0,08	1,92
	Масса зерна с колоса, г	0,80 ± 0,11	1,29 ± 0,09	0,82 ± 0,05	0,50**	11,10
5360-191/28	Длина колоса, см	8,40 ± 0,21	7,83 ± 0,22	7,12 ± 0,38	0,22	3,90
	Число колосков в колосе, шт.	14,50 ± 0,27	13,70 ± 0,26	12,85 ± 0,24	0,27*	4,76
	Число зерен в колосе, шт.	31,10 ± 1,44	33,00 ± 1,38	26,60 ± 1,14	0,04	0,66
	Масса зерна с колоса, г	0,91 ± 0,07	1,43 ± 0,09	1,01 ± 0,06	0,49**	10,42
744	Длина колоса, см	9,55 ± 0,25	8,87 ± 0,16	9,00 ± 0,25	0,17	3,10
	Число колосков в колосе, шт.	14,30 ± 0,30	13,90 ± 0,31	12,15 ± 0,27	0,33*	5,87
	Число зерен в колосе, шт.	22,90 ± 2,22	32,70 ± 2,26	21,50 ± 1,03	0,41**	7,83
	Масса зерна с колоса, г	0,43 ± 0,06	1,23 ± 0,08	0,64 ± 0,05	0,78***	36,82

Окончание таблицы 4

Линия	Признак	$X \pm s_x$			r_{wr}	F
		Поле 1, 2009 г.	Поле 1, 2010 г.	Поле 2, 2010 г.		
832	Длина колоса, см	10,05 ± 0,25	9,01 ± 0,29	9,15 ± 0,26	0,11	2,25
	Число колосков в колосе, шт.	14,11 ± 0,37	12,50 ± 0,48	12,00 ± 0,28	0,47**	9,76
	Число зерен в колосе, шт.	27,31 ± 2,04	27,80 ± 2,13	23,47 ± 1,23	0,24	4,11
	Масса зерна с колоса, г	0,57 ± 0,09	1,12 ± 0,08	0,87 ± 0,06	0,59**	15,14
С 29	Длина колоса, см	7,75 ± 0,27	7,76 ± 0,23	7,15 ± 0,21	0,21	3,69
	Число колосков в колосе, шт.	13,30 ± 0,54	14,20 ± 0,29	12,37 ± 0,29	0,25*	4,28
	Число зерен в колосе, шт.	30,10 ± 1,98	33,50 ± 1,48	23,52 ± 1,16	0,42**	8,26
	Масса зерна с колоса, г	0,74 ± 0,09	1,46 ± 0,07	–	0,05	2,00

$X \pm s_x$ – среднее значение и среднее отклонение; r_{wr} – доля влияния фактора поля в формировании количественных признаков при однофакторном дисперсионном анализе; F – критерий Фишера. С29 – Саратовская 29, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

транслокации от *T. timopheevii* в хромосоме 5B, не превышающей 20 % от размера длинного плеча (Леонова и др., 2008; Timonova *et al.*, 2010). Транслокация 5BS.5BL-5GL, выявляемая по темному теломерному бэнду на дифференциально окрашенных хромосомах, была впервые описана Бадаевой с соавт. (Badaeva *et al.*, 1991). В 1994 г. М. Yamamori (1994) была показана связь между устойчивостью к бурой ржавчине сортов мягкой пшеницы и присутствием в их геноме данной транслокации. Из литературы известно, что в хромосоме 5G у *T. timopheevii* ssp. *timopheevii* локализован ген *Lr18*, который находится в теломерной области длинного плеча (Yamamori, 1994). Ранее нами на основании молекулярного анализа и теста на устойчивость было показано, что картированный в области расположения *QLr.icg-5B* локуса ген *LrTt2* отличается от гена *Lr18* и представляет, по-видимому, новый более эффективный аллель данного гена, который также имеет происхождение из генома *T. timopheevii* (Leonova *et al.*, 2010).

В нашей работе было показано, что присутствие локуса *QLr.icg-5B* в геноме мягкой пшеницы является достаточным для приобретения устойчивости к популяции бурой ржавчины, характерной для Западно-Сибирского региона России. Присутствие в геноме только минорных локусов *QLr.icg-2A* и *QLr.icg-1A* от *T. timopheevii* оказывает сдерживающий эффект на развитие болезни и не приводит к развитию гиперчувствительного ответа. Поскольку полигенная устойчивость с большей вероятностью

будет более эффективной, чем моногенная, данные локусы могут быть использованы в селекционных программах для объединения с другими генами и локусами с целью создания генотипов, обладающих раснеспецифической устойчивостью широкого спектра.

Устойчивость к мучнистой росе. У пшениц группы *Timopheevi* к настоящему моменту идентифицировано 4 гена устойчивости к мучнистой росе. В длинном плече 7A^t хромосомы расположены ген *Pm37*, выявленный у *T. timopheevii* subsp. *armeniicum*, и временно обозначенный ген M1AG12 (Perugini *et al.*, 2008; Maxwell *et al.*, 2009). В мягкую пшеницу был перенесен ген устойчивости к мучнистой росе *Pm27*, картированный в хромосоме 6G (Järve *et al.*, 2000). Однако из-за сниженного уровня рекомбинации между хромосомами 6B и 6G точная локализация данного гена на хромосоме не определена (Järve *et al.*, 2000). В нашей работе линии 3869-47, 3869-50 и 3869-51, несущие транслокации фрагмента 6GL, не обладали устойчивостью к расам мучнистой росы, типичным для Западной Сибири. Отсутствие устойчивости у данных линий может быть связано либо с уменьшением размера транслоцированного фрагмента 6GL в процессе беккроссирования, либо с неэффективностью аллеля, присутствовавшего в геноме донора.

Аналогичные результаты получены при анализе на устойчивость к мучнистой росе линий с фрагментами хромосомы 2G. В хромосоме 2G был картирован ген устойчивости к мучнистой росе *Pm6*. Но, по результатам нашей работы,

линии 3862-5, 3862-15, 5352-70 и 5352-107, содержащие в геноме интрогрессивные фрагменты 2G, не обладали устойчивостью к мучнистой росе и не отличались по устойчивости от контроля. На основании полученных данных можно предположить, что если геном *T. timopheevii*, использованный в качестве донора генов резистентности, содержит ген *Pmb* в хромосоме 2G, то он расположен либо вне области транслокаций, захватывающих разные по длине фрагменты хромосомы 2G у изученных интрогрессивных линий, либо присутствует в виде неэффективного аллеля.

Устойчивость к стеблевой ржавчине. Хотя линии 3862-5 и 3862-15 содержат интрогрессивный фрагмент 2G в гетерозиготе, они оказались устойчивыми к популяции стеблевой ржавчины Западной Сибири, характерной для Новосибирской области.

А.И. Моргуновым были оценены интрогрессивные линии (3862-5, 5352-70, 5352-104, 3869-47, 3869-50, 3869-51, 5366-180 и 5360-191/28) и родительские формы (линии 744 и 832) на устойчивость к расам стеблевой ржавчины, характерным для Африки (Моргунов. Устное сообщ.). Результаты оценки показали, что линия 3862-5 и гибридные родительские линии, содержащие в геноме интрогрессивный фрагмент 2GL от *T. timopheevii*, проявляют устойчивость на уровне 5R-MR к африканским расам стеблевой ржавчины. Уровень заболевания всех остальных тестируемых линий был выше и находился в пределах 40–60 % пустул на листе (MS-S). Оценка динамики поражения показала, что у линии 3862-5 с момента появления первых симптомов на нижних листьях и стебле растений развивался умеренно восприимчивый тип защитного ответа, не отличающийся от такового у остальных линий. Однако в течение последующих двух недель распространения заболевания у данной линии не происходило и оставалось на уровне 5 % пустул на листе (R-MR) (Моргунов. Устное сообщ.).

В хромосоме 2G у *T. timopheevii* обнаружен ген устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr36* (Roelfs *et al.*, 1992; Tsilo *et al.*, 2008). Для данного гена показано сцепление с микросателлитными маркерами *Xgwm319-2B*, *Xstm773-2-2B*, *Xwmc477-2B*, локализующимися в районе центромеры (Tsilo *et al.*, 2008). В настоящий мо-

мент нет данных о более точном расположении данного гена на хромосоме из-за сниженного уровня рекомбинации между хромосомами 2B и 2G и предпочтительного наследования хромосомы 2G и ее фрагментов в поколениях. Этот ген широко распространен в сортах мягкой пшеницы по всему миру, благодаря высокой эффективности против стеблевой ржавчины Ug99 (раса ТТКСК) (Jin *et al.*, 2009). Однако начиная с 2007 г. устойчивость линий и сортов пшеницы, содержащих ген *Sr36*, преодолевается новой африканской расой стеблевой ржавчины, ТТТСК, выявленной в Кении (Jin *et al.*, 2009). Поскольку ответ на поражение стеблевой ржавчиной в Кении у интрогрессивной линии 3862-5 не является иммунным и аналогичен описанному в литературе данным по устойчивости форм мягкой пшеницы с геном *Sr36*, то можно предположить, что линии 3862-5 и 3862-15 содержат этот ген устойчивости в геноме.

Нами был проведен анализ с помощью ПЦР интрогрессивных линий, содержащих в геноме фрагменты хромосомы 2G, с использованием маркера *Xstm773-2-2B*, сцепленного с геном *Sr36* (рис. 5). У линий 3862-5 и 3862-15 с транслокацией 2GL специфичный для *T. timopheevii* фрагмент присутствует в гетерозиготе и отсутствует у линий 5352-70 и 5360-107 с транслокацией 2G(1). Сравнивая размер и расположение транслоцированных фрагментов у данных линий (табл. 1, 2) с литературными данными, можно

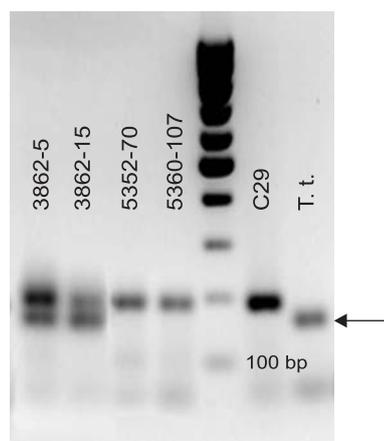


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к локусу *Xstm773-2-2B* у интрогрессивных линий 3862-5, 3862-15, 5352-70 и 5360-107 с фрагментами 2G в геноме.

предположить, что наиболее вероятное расположение данного гена – в длинном плече хромосомы 2В, ближе к центромерной области.

Несмотря на то что *Sr36* не является эффективным против всех рас стеблевой ржавчины, он, тем не менее, имеет высокую селекционную ценность. Уязвимость моногенной устойчивости к стеблевой ржавчине требует пирамидирования генов при создании устойчивых форм (Tsilo *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2009). В селекционных программах ген *Sr36* может быть объединен с другими генами или локусами для создания форм, обладающих устойчивостью широкого спектра.

Интрогрессивные линии 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5, 5360-191/28 и 5352-70 с интрогрессивным фрагментом 5G проявляли устойчивость к расам стеблевой ржавчины, характерным для Омска на участке 1, но оставались полностью чувствительными к популяции стеблевой ржавчины в Новосибирской области на экспериментальном участке 2, а также к популяции стеблевой ржавчины в Кении (Моргунов. Устное сообщ.). Этот факт позволяет предположить, что интрогрессивный фрагмент 5G, кроме главного локуса устойчивости к бурой ржавчине *QLr.icg-5B*, содержит сцепленный с ним неизвестный ранее расоспецифичный локус устойчивости к стеблевой ржавчине. Примеры подобного сцепления генов устойчивости встречаются у злаков довольно часто. Так, широко распространенная в сортах мягкой пшеницы транслокация 1BL.1RL содержит сцепленные гены устойчивости *Sr31*, *Yr9*, *Lr26* и *Pm8* (Friebe *et al.*, 1996). Интрогрессивный фрагмент хромосомы 2G от *T. timopheevii* несет сцепленные гены *Sr36* и *Pm6*, встречающиеся с высокой частотой в американских и австралийских сортах мягкой пшеницы (Jorgensen, Jensen, 1973; Friebe *et al.*, 1996; Bariana *et al.*, 2001; Jin, Singh, 2006). От *Ag. elongatum* в мягкую пшеницу перенесены сцепленные гены *Lr19/Sr25* и *Lr24/Sr24* (Friebe *et al.*, 1996).

Влияние транслокаций от *T. timopheevii* на урожайность и другие количественные признаки

Интрогрессия в мягкую пшеницу небольших фрагментов генома отдаленных видов при сохранении генетического окружения ком-

мерческого сорта является обычным подходом для изучения и использования ресурса ценных аллелей, которые присутствуют в геноме диких видов. Анализ количественных признаков у 15 интрогрессивных линий в сравнении с родительским сортом Саратовская 29 позволяет сделать некоторые выводы о влиянии интрогрессивных фрагментов от *T. timopheevii* на формирование фенотипа. Так, растения линий 3862-5 и 3862-15 с транслокацией 2BS.2GL являются самыми низкорослыми по сравнению с остальными интрогрессивными линиями и родительским сортом Саратовская 29. Поскольку создание сортов с короткой соломиной является предпочтительным в селекции на устойчивость к полеганию, эти линии могут иметь практическую ценность в селекционных программах. По литературным данным, практически все хромосомы в различной степени оказывают влияние на высоту растения. К настоящему моменту описан 21 ген, определяющий уменьшение высоты у пшеницы, однако лишь несколько из них широко используются (Liu *et al.*, 2005). Было показано, что данный признак у мягкой пшеницы контролируется генами, в основном находящимися в хромосомах 2-, 3-, 4- и 6-й гомеологичных групп. Несколько генов у пшеницы были картированы в хромосомах 2A, 2B и 2D (McIntosh *et al.*, 1995). Возможно, *T. timopheevii* содержит в длинном плече хромосомы 2G гомеологичный ген, обуславливающий снижение длины растения. Так как низкорослые формы имеют преимущество перед высокорослыми растениями как более устойчивые к полеганию в условиях ливневых дождей и влажности, сопровождающихся ветрами, данная транслокация может иметь практическое значение для использования в сортах западносибирского экотипа.

Также нами было обнаружено небольшое положительное влияние фрагмента 2GL на число зерен в главном колосе и число колосков в колосе, отношение которых определяет признак озерненности колоска.

Следует отметить, что у всех изученных линий за исключением исходных гибридных линий 744 и 832 с множественными интрогрессиями от *T. timopheevii* не отмечено отрицательного влияния на показатели продуктивности, а в некоторых случаях, перечисленных выше,

наоборот, показан положительный эффект. Это также относится и к двум группам линий: 1) 3862-5 и 3862-15; и 2) 5366-157, 5366-171, 5366-180, 5360-191/5, 5360-191/28 и 5352-70, выделяющихся по устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине соответственно.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что линии, содержащие в геноме интрогрессивные фрагменты с локусами устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине, могут представлять интерес для их использования в селекционном процессе. Не исключено, что линии, несущие транслокации от *T. timopheevii* в другие участки хромосом, также могут нести адаптивно значимые гены, проявляющиеся в других климатических условиях.

Благодарности

Авторы статьи выражают признательность профессору Marion Röder из Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (г. Гатерслебен, Германия) за предоставление молекулярных маркеров, использованных в работе. Авторы статьи благодарят доктора биологических наук Е.Д. Бадаеву из Института молекулярной биологии им. Энгельгарта в Москве за консультации и помощь в освоении методик.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федеральной целевой программы РФ (Госконтракт 16.512.11.2223).

Литература

- Леонова И.Н., Родер М.С., Будашкина Е.Б. и др. Молекулярный анализ устойчивых к бурой ржавчине интрогрессивных линий, полученных при скрещивании гексаплоидной пшеницы *Triticum aestivum* с тетраплоидной пшеницей *Triticum timopheevii* // Генетика. 2002. Т. 38. № 12. С. 1648–1655.
- Леонова И.Н., Родер М.С., Калинина Н.П. и др. Генетический анализ и локализация локусов, контролирующей устойчивость интрогрессивных линий *Triticum aestivum* × *Triticum timopheevii* к листовой ржавчине // Генетика. 2008. Т. 44. № 12. С. 1652–1659.
- Салина Е.А., Егорова Е.М., Адонина И.Г. и др. ДНК-маркеры для генотипирования линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с генетическим материалом *Aegilops speltoides* Tausch и *Triticum timopheevii* Zhuk. // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 4. С. 620–628.
- Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S. *et al.* Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* // Plant Syst. Evol. 1994. V. 192. P. 117–145.
- Badaeva E.D., Budashkina E.B., Badaev N.S. *et al.* General features of chromosome substituions in *Triticum aestivum* × *T. timopheevii* hybrids // Theor. Appl. Genet. 1991. V. 82. P. 227–232.
- Bariana H.S., Hayden M.J., Ahmed N.U. *et al.* Mapping of durable adult plant and seedling resistances to stripe rust and stem rust diseases in wheat // Aust. J. Agric. Res. 2001. V. 52. P. 1247–1255.
- Bedbrook J.R., Jones J., O'Dell M. *et al.* A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species // Cell. 1980. V. 19. P. 545–560.
- Brevis J.C., Chicaiza O., Khan I.A. *et al.* Agronomic and quality evaluation of common wheat near-isogenic lines carrying the leaf rust resistance gene *Lr47* // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 1441–1451.
- Brown, J.K.M. Yield penalties of disease resistance in crops // Curr. Opin. Plant Biol. 2002. V. 5. P. 339–344.
- Budashkina E.B., Kalinina N.P. Development and genetic analysis of common wheat introgressive lines resistant to leaf rust // Acta Phytopathol. Entomol. 2001. 36. P. 61–65.
- Dyck P.L., Friebe B. Evaluation of leaf rust resistance from wheat chromosomal translocation lines // Crop Sci. 1993. V. 33. P. 687–690.
- Egorova E., Leonova I., Budashkina E. *et al.* Application of marker assisted selection for transferring resistance genes from *Triticum timopheevii* to bread wheat // Proc. of the 20th Intern. Conf. on ITMI/2nd WGC Joint Workshop, 1–5 September 2010. Beijing, China. P. 78.
- Friebe B., Yang J., Raupp W.J. *et al.* Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status // Euphytica. 1996. V. 91. P. 59–87.
- Ganal M.W., Röder M.S. Microsatellite and SNP markers in wheat breeding // Genomics-assisted crop improvement / Eds R.K. Varshney, R. Tuberosa. Springer, N.Y., 2007. P. 124.
- Hayden M., Good G., Sharp P.J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. P. 129–133.
- Järve K., Peusha H.O., Tsybalova J. *et al.* Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat // Genome. 2000. V. 43. P. 377–381.
- Ji J.H., Qin B., Wang H.Y. *et al.* STS markers for powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat // Euphytica. 2008. V. 163. P. 159–165.
- Jiang J., Gill B.S. Sequential chromosome banding and *in situ* hybridization analysis // Genome. 1993. V. 36. P. 792–795.
- Jiang J., Gill B.S. Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* support the dipyletic origin of polyploidy wheats // Chrom. Res. 1994. V. 2. P. 59–64.
- Jin Y., Szabo L.J. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2009. V. 93. No 4. P. 367–370.
- Jin Y., Singh R.P. Resistance in US wheat to recent Eastern African isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* with virulence to resistance gene *Sr31* // Plant Dis. 2006. V. 90. P. 476–480.

- Jorgensen J.H., Jensen C.J. Gene *Pm6* for resistance to powdery mildew in wheat // *Euphytica*. 1973. V. 22. P. 4–23.
- Kjær B., Jensen H.P., Jensen J. *et al.* Associations between three *mlo* powdery mildew resistance genes and agronomic traits in barley // *Euphytica*. 1990. V. 46. P. 185–193.
- Knott D.R. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying leaf rust resistance // *Can. J. Genet. Cytol.* 1968. V. 10. P. 695–696.
- Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S. *et al.* Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat // *Crop Sci.* 2003. V. 43. No 5. P. 1643–1651.
- Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobbelaar B. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on breadmaking quality in wheat // *Euphytica*. 2002. V. 124. P. 65–70.
- Leonova I.N., Budashkina E.B., Flath K. *et al.* Microsatellite mapping of a leaf rust resistance gene transferred to common wheat to *Triticum timopheevii* // *Cereal Res. Commun.* 2010. 38. P. 212219.
- Liu Y., Liu D., Zhang H. *et al.* Allelic variation, sequence determination and microsatellite screening at the XGWM261 locus in Chinese hexaploid wheat (*Triticum aestivum*) varieties // *Euphytica*. 2005. V. 145. P. 103–112.
- Maghirang E.B., Lookhart G.L., Bean S.R. *et al.* Comparison of quality characteristics and breadmaking functionality of hard red winter and hard red spring wheat // *Cereal Chem.* 2006. V. 83. P. 520–528.
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in the leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss // *Phytopathology*. 1926. V. 16. P. 89–120.
- Maxwell J.J., Lyster J.H., Cowger C. *et al.* MIAG12: a *Triticum timopheevii* derived powdery mildew resistance gene in common wheat on chromosome 7AL // *Theor. Appl. Genet.* 2009. V. 119. P. 1489–1495.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. CSIRO Publ., Collingwood, Australia, 1995.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. *et al.* Catalogue of Gene Symbols for Wheat // www.grs.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/. 2008.
- Mebrate S.A., Oerke E.C., Dehne H.W. *et al.* Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr38* on wheat chromosome arm 6DL using SSR markers // *Euphytica*. 2008. V. 162. P. 457–466.
- Ortelli S., Winzeler H., Winzeler M. *et al.* Leaf rust resistance gene *Lr9* and winter wheat yield reduction: I. Yield and yield components // *Crop Sci.* 1996. V. 36. P. 1590–1595.
- Perugini L.D., Murphy J.P., Marshall D. *et al.* *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii* // *Theor. Appl. Genet.* 2008. V. 116. P. 417–425.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // *Can. J. Res. (Section C)*. 1948. 26. P. 496–500.
- Plaschke J., Ganai M.W., Ruder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1995. V. 91. P. 1001–1007.
- Qi L., Friebe B., Zhang P. *et al.* Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement // *Chromosome Res.* 2007. V. 15. P. 3–19.
- Roelfs A.P., Singh R.P., Saari E.E. *Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management*, CIMMYT Mexico, 1992. P. 45.
- Saari E.E., Prescott J.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases // *Plant Dis. Rep.* 1975. V. 59. P. 377–380.
- Salina E.A., Leonova I.N., Efremova T.T. *et al.* Wheat genome structure: translocations during the course of polyploidization // *Funct. Integr. Genomics*. 2006a. V. 6. P. 71–80.
- Salina E.A., Lim K.Y., Badaeva E.D. *et al.* Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section Sitopsis and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids // *Genome*. 2006b. V. 49. P. 1023–1035.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Rajaram S. *et al.* Agronomic effects from chromosome translocations 7DL.7Ag and 1BL.1RS in spring wheat // *Crop Sci.* 1998. V. 38. P. 27–33.
- Sourdille P., Singh S., Cadalen T. *et al.* Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Funct. Integr. Genomics*. 2004. V. 4. P. 12–25.
- Tao W., Liu D., Liu J. *et al.* Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 100. P. 564–556.
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for the detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat // *Crop Sci.* 2008. V. 48. P. 253–261.
- Uhrin A., Long L., Bedx Z. Comparison of PCR-based DNA markers for using different *Lr19* and *Lr24* leaf rust resistance wheat sources // *Cereal Res. Commun.* 2008. V. 36. No 4. P. 533–541.
- Yamamori M. An N-band marker for gene *Lr18* for resistance to leaf rust in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1994. V. 89. P. 643–646.
- Zeven A.C., Knott D.R., Johnson R. Investigation of linkage drag in near isogenic lines of wheat by testing for seedling reaction to races of stem rust, leaf rust and yellow rust // *Euphytica*. 1983. V. 32. P. 319–327.
- Zhang L.Y., Bernard M., Leroy P. *et al.* High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals // *Theor. Appl. Genet.* 2005. V. 111. P. 677–687.

**EFFECT OF CERTAIN CHROMOSOME REGIONS OF *TRITICUM TIMOPHEEVII*
ON THE FORMATION OF PEST RESISTANCE
AND QUANTITATIVE TRAITS IN COMMON WHEAT**

E.M. Timonova¹, I.N. Leonova¹, I.A. Belan², L.P. Rosseeva², E.A. Salina¹

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

²Siberian Research Institute of Agriculture, Russian Academy of Agricultural Sciences,
Novosibirsk, Russia

Summary

The effects of introgression fragments from *Triticum timopheevii* Zhuk. ($2n = 28$, AtAtGG) and their combinations on resistance to leaf rust, stem rust, powdery mildew, and some quantitative traits were assessed in 15 common wheat introgression lines. Molecular and cytological analyses of the lines demonstrated an advantage of combined use of various marker types in comprehensive characterization of hybrids and detection of translocations and substitutions. Resistance tests to various fungal diseases showed that the lines containing introgression fragments of chromosome 5G were completely resistant to the West Siberian populations of leaf rust and to the stem rust population of the Omsk region. Lines 3862-5 and 3862-15, containing a fragment of the long arm of chromosome 2G, were resistant to West Siberian stem rust populations. No negative effects of the alien genetic material on yield and other quantitative traits were noted. In addition, positive effect of the 2G chromosome fragments of *Triticum timopheevii* on ear grain number was established. Thus, the introgression lines can be used in breeding programs as donors of resistance genes to fungal diseases.

Key words: common wheat introgression lines, *T. timopheevii*, SSR analysis, *in situ* hybridization, C banding, fungus resistance, quantitative traits.