

¹Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН
Украина, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3, genome2006@mail.ru

²Селекционно-генетический институт-Национальный центр семеноводства и сортоизучения
Украин, 65036, Одесса, Овидиопольская дорога, 3

ГИБРИДОЛОГИЧЕСКИЙ И РЕКОМБИНАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ЧУЖЕРОДНЫХ ПРИЗНАКОВ У ИНТРОГРЕССИВНЫХ ГИБРИДОВ F₂ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

Введение. Использование молекулярно-генетических маркеров существенно облегчает как генетический анализ признаков, так и их непосредственный контроль в селекционных программах. Особенное значение это имеет для чужеродных признаков, интрогрессированных в пшеницу, так как наследование их часто не соответствует менделевскому. Целью настоящего исследования было провести генетический анализ чужеродных признаков, идентифицировать пшенично-ржаную транслокацию 1R_S.1B_L и установить сцепление между молекулярными маркерами и отдельными привнесенными генами устойчивости к болезням в популяции F₂ от скрещивания *Hostianum* 242/97-2-B x Одесская 267.

Материал и методика. В работе использована популяция F₂, насчитывающая 79 растений, полученная от скрещивания интрогрессивной линии *Hostianum* 242/97-2-B (в дальнейшем Н242/97-2-B) отдела генетики СГИ с озимой мягкой пшеницей Одесская 267 (Од. 267) и родительские формы. Линия Н242/97-2-B выделена из комбинации (АД825 x Черномор) F₃ x Н74/90-258, отличается высокой устойчивостью к мучнистой росе, листовой и стеблевой ржавчине, опушением колоса (от сорта Гостианум 237), опушением сверху, снизу и по-краю листовой пластинки (от *Ae. tauschii*) и наличием пшенично-ржаной транслокации 1R_S.1B_L от сорта Аврора, переданной посредством скрещивания с коллекционным образцом из Болгарии Н74/90-258 (Мощный, Благодарова, 2004). Все изученные растения F₂ являлись потомством одного эуплоидного растения F₁. Для детекции транслокации короткого плеча хромосомы 1R от *Secale cereale* L. применяли ПЦР анализ с использованием секалин-специфических STS-маркеров SR1R003 (Landjeva et al., 2006), ω-sec-P3 и ω-sec-P4 (Chai et al., 2006). Электрофоретический анализ продуктов амплификации осуществляли в 2% агарозном геле, согласно стандартной методике Маниатис и др. (1984). Фитопатологическую оценку материала проводили на искусственном инфекционном фоне листовой и стеблевой ржавчины отдела фитопатологии СГИ по интегрированной 9-балльной шкале СЭВ. Достоверность соответствия фактического соотношения ожидаемому, а также генетическое сцепление определяли по χ²-тесту. Частоту рекомбинации между локусами рассчитывали методом максимума правдоподобия по формулам, приведенным Р.В. Аллардом (Allard, 1956).

Результаты и обсуждение. Исходные родительские формы отличались выравненностью и однообразием проявления изучаемых признаков. Все 30 исследованных растений линии Н242/97-2-B имели опушение и 7-8 баллов устойчивости к видам ржавчины, а также молекулярные маркеры тестировали присутствие 1R_S транслокации в геноме линий. Все 20 растений Од. 267 были неопушенными и неустойчивыми (4 балла реакция к листовой ржавчине, 5 баллов – к стеблевой), а на ДНК из Одесской 267 в ходе ПЦР с указанными праймерами не синтезировались продукты амплификации. Гибридологический анализ признаков в F₂ выявил моногенно-доминантный характер их наследования, все значения критерия χ²_{3:1} были меньше табличного (табл. 1).

Следует отметить, что в отношении стеблевой ржавчины фактическое расщепление соответствовало 3:1 только по результатам первого учета – 4.06.2007 г. При втором учете – 14.06.2007 г. часть гибридов потеряла устойчивость, и соотношение 62:17=3:1 изменилось в 53:26=9:7 (χ²=3,77 при P=5,2). Эта закономерность наблюдалась неоднократно в течение ряда

лет (Моцный, Благодарова, 2004) и свидетельствует о наличии у линии Н242/97-2-В двух комплементарных генов устойчивости к стеблевой ржавчине, один из которых эффективен, но преодолевается по мере нарастания интенсивности инфекционного фона и поступления более агрессивных рас. Второй – проявляется только в сочетании с первым.

Что касается устойчивости к листовой ржавчине, то в 2007 г. осуществлен только первый учет. В дальнейшем материал высох вследствие засухи. Однако, в предыдущие годы в благоприятных для патогена условиях фактическое расщепление, соответствующее при первом учете 3:1, при последующих учетах изменялось в соответствующее 27:37. Например, в 2005 г. было получено расщепление устойчивые : восприимчивые = 50:67 ($\chi^2_{27:37}=0,01$). Хотя в неблагоприятном для листовой ржавчины 2003 г. также как и в 2007 г. наблюдалось расщепление, соответствующее 3:1 (Моцный, Благодарова, 2004). Таким образом, у линии Н242/97-2-В устойчивость к листовой ржавчине контролируется тремя комплементарными генами, один из которых эффективен, но преодолевается с приходом более агрессивной расы (предположительно 77). Два других *Lr* гена не эффективны, но комбинируясь с первым, обеспечивают высокий уровень устойчивости (7-8 баллов).

ПЦР анализ с указанными молекулярными маркерами показал, что характер расщепления в популяции F_2 по признаку присутствие фрагмента амплификации с секалин-специфичного STS-локуса с локализацией на $1R_S$ хромосоме / отсутствие ПЦР продукта соответствовал теоретически ожидаемому расщеплению 3:1 ($\chi^2=0,51$; $P=47,5$) (табл. 1). В результате рекомбинационного анализа установлено сцепленное наследование детектируемой транслокации $1R_S$ и генов устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине, выявленных первым учетом. Сцепление соответствует таковому, обнаруженному для пары с участием генов устойчивости (табл. 2).

Таблица 1

Наследование чужеродных и пшеничного признаков гибридами F_2
Н242/97-2-В х Од. 267, 2007 г. (n=79)

Символ гена/ фрагмента хромосомы	Признак	Расщепление	$\chi^2_{3:1}$ *	P, %*
$1R_S$	Продукты амплификации ДНК с праймерами SR1R003, ω -sec-P3 и ω -sec-P4	62:17	0,51	47,5
<i>Hg1</i>	Опушение колоса (слабое)	63:16	0,95	33,0
<i>Hl_{low}</i>	Опушение листовой пластинки снизу	56:23	0,71	39,8
<i>Hl^{up}</i>	Опушение листовой пластинки сверху	62:17	0,51	47,5
<i>Lr</i>	Устойчивость к листовой ржавчине	60:19	0,04	84,5
<i>Sr</i> (I)	Устойчивость к стеблевой ржавчине (I учет)	62:17	0,51	47,5

Примечание: * Критические значения $\chi^2_{3:1}=3,84$; $P=5,0$ %.

Поскольку молекулярные маркеры детектируют ржаную транслокацию $1R_S.1B_L$, а по литературным данным транслокация $1R_S.1B_L$ первоначальным источником, которой являлся сорт ржи Petkus, несет гены устойчивости *Pm8*, *Sr31*, *Lr26*, *Yr9* (Lukaszewski 2000, 2001; McIntosh et al., 2003), то можно считать доказанным проявление в материале и эффективность генов *Lr26* и *Sr31*. Появление нескольких «рекомбинантных» растений, у которых детектируется секалин-специфичный ПЦР продукт и *Lr26*, секалин-специфичный ПЦР продукт $1R_S$ и *Sr31*, а также *Lr26* и *Sr31*, может быть обусловлено хромосомной абберацией внутри короткого плеча транслокантной хромосомы, которая в М1 части МКП пребывает в

универсентном состоянии, неполной пенетрантностью ржаных генов или преждевременным появлением вирулентных к *Lr26* или *Sr31* рас на этих растениях. Возможность кроссинговера тоже нельзя полностью исключить, так как в F_1 в 3 МКП из 894 изученных (0,3 %) наблюдали 21 закрытый бивалент, что свидетельствует о возможности конъюгации короткого плеча 1R хромосомы из состава транслокации $1R_S.1B_L$ с гомеологичным плечом 1B хромосомы Од. 267.

Таблица 2

Оценка сцепления шести генетических факторов интрогрессивной линии Н242/97-2-В (комбинация F_2 Н242/97-2-В x Од. 267, 2007 г., n=79, фаза притяжения)

Генетические факторы А x В	Фактическое расщепление фенотипов * : А-В- : А-bb : aaВ- : aabb	χ^2_L **	Рекомбинация, %
$1R_S \times Hg1$	50 : 12 : 13 : 4	0,31	Независимое
$1R_S \times Hl_{low}$	41 : 21 : 15 : 2	3,25	Независимое
$1R_S \times Hl^{up}$	47 : 15 : 15 : 2	1,35	Независимое
$1R_S \times Lr$	59 : 3 : 1 : 16	293,4	5,37 \pm 2,60
$1R_S \times Sr$ (I)	61 : 1 : 1 : 16	676,6	2,69 \pm 1,82
$Hg1 \times Hl_{low}$	45 : 18 : 11 : 5	0,01	Независимое
$Hg1 \times Hl^{up}$	49 : 14 : 13 : 3	0,05	Независимое
$Hg1 \times Lr$	47 : 16 : 13 : 3	0,32	Независимое
$Hg1 \times Sr$ (I)	49 : 14 : 13 : 3	0,05	Независимое
$Hl_{low} \times Hl^{up}$	54 : 8 : 2 : 15	75,5	13,51 \pm 4,20
$Hl_{low} \times Lr$	39 : 17 : 21 : 2	3,81	Независимое
$Hl_{low} \times Sr$ (I)	41 : 15 : 21 : 2	3,25	Независимое
$Hl^{up} \times Lr$	45 : 17 : 15 : 2	2,03	Независимое
$Hl^{up} \times Sr$ (I)	47 : 15 : 15 : 2	1,35	Независимое
$Lr \times Sr$ (I)	60 : 0 : 2 : 17	691,8	2,64 \pm 1,80

Примечание: * Ожидаемое расщепление во всех случаях 9 : 3 : 3 : 1; ** Критическое значение $\chi^2_L=3,84$.

В исследуемом материале анализируемые морфологические признаки наследовались независимо друг от друга, а также от молекулярных маркеров и показателей устойчивости. Исключение составляют чужеродные (от *Ae. tauschii*) гены опушения нижней (Hl_{low}) и верхней (Hl^{up}) поверхности листовой пластинки, которые наследовались сцеплено (табл. 2). Согласно гипотезе гомеоаллельности, гены Hl_{low} и Hl^{up} локализованы в хромосоме 4D на расстоянии 13,5 \pm 4,2 % рекомбинации один от другого.

Выводы. Молекулярные секалин-специфичные маркеры, выявляемые в ПЦР с праймерами SR1R003, ω -sec-P3 и ω -sec-P4, наследуются моногенно, тесно сцеплены с генами *Lr26* и *Sr31*, их сочетание может служить надежным маркером короткого плеча транслокации $1R_S.1B_L$. У линии *Hostianum* 242/97-2-В устойчивость к листовой ржавчине контролируется тремя комплементарными генами, один из которых *Lr26*, а устойчивость к стеблевой ржавчине – двумя, один из которых *Sr31*. Опушение колоса контролируется одним геном *Hg1*

(от сорта Гостианум 237), опушение листа снизу и сверху контролируется сцепленными генами Hl_{low} и Hl^{up} от *Ae. tauschii*. Наследование молекулярных секалин-специфических маркеров (SR1R003, ω -sec-P3 и ω -sec-P4) и генов устойчивости, с одной стороны, и генов, контролирующих морфологические признаки, с другой, носит независимый характер.

Литература

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Э. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. - М.: Мир, 1984. - 480 с.
2. Моцний І.І., Благодарова О.М. Успадкування стійкості до хвороб та морфологічних ознак у гібридів м'якої пшениці з інтрогресивними лініями // Зб. наук. праць СГІ-НАЦ НАІС. - Одеса, 2004. - Вип. 6 (46). - С. 179-193.
3. Allard R.W. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity // Hilgardia. - 1956. - V. 24, № 10. - P. 235-278.
4. Chai J. F., Zhou R. H., Jia J. Z., Liu X. Development and application of a new codominant PCR marker for detecting 1BL·1RS wheat-rye chromosome translocations // Plant Breeding. - 2006. - Vol. 125. - P. 302 - 304.
5. Landjeva S., Korzun V., Tsanev V., Vladova R., Ganeva G. Distribution of the wheat-rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria // Plant Breeding. - 2006. - Vol. 125. - P. 102 - 104.
6. Lukaszewski A. Breeding behavior of the cytogenetically engineered wheat-rye translocation chromosomes 1RS.1BL // Crop. Sci. -2001. - Vol. 4. - P. 1062-1065.
7. Lukaszewski A. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoelogs recombination // Crop. Sci. - 2000. - Vol. 40. - P. 216-225.
8. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Devos K.M., Dubkowsky J., Rogers J., R.Appels MacGene 2003. Catalogue of Gene Symbols for Wheat / 10IWGS, Paestum, Italy, 2003.

Резюме. У популяції F_2 , що отримана від схрещування інтрогресивної лінії *Hostianum* 242/97-2-B з сортом м'якої пшениці Одеська 267, детектована транслокація 1R_S.1B_L за допомогою ДНК маркерів секалін-специфічних (SR1R003, ω -sec-P3 і ω -sec-P4), показано зчеплене успадкування молекулярних маркерів з генами *Lr26* і *Sr31*. Встановлено характер успадкування ознак опушення колосся, опушення листової пластинки зверху та знизу, виявлено зчеплене успадкування опушення листової пластинки зверху та знизу.

Резюме. В популяції F_2 , полученной от скрещивания интрогрессивной линии *Hostianum* 242/97-2-B с сортом мягкой пшеницы Одесская 267, детектирована транслокация 1R_S.1B_L с помощью ДНК маркеров секалин-специфических (SR1R003, ω -sec-P3 и ω -sec-P4), показано сцепленное наследование молекулярных маркеров с генами *Lr26* и *Sr31*. Установлен характер наследования признаков опушение колоса, опушение листовой пластинки сверху и снизу, выявлено сцепленное наследование опушенности листовой пластинки снизу и сверху.

Abstracts. The translocation 1R_S.1B_L have been detected in the population F_2 from crossing *Hostianum* 242/97-2-B x Odesskaya 267 by using secalin-specific DNA-markers. There have been revealed that the molecular markers SR1R003, ω -sec-P3 и ω -sec-P4 tightly linkage to *Lr26* and *Sr31* genes. The analysis of inheritance of hairy glume, hairy leaf up and down have shown the linkage inheritance hairy leaf up and hairy leaf down.