

Н.О. КОЗУБ, кандидат біологічних наук
І.О. СОЗІНОВ, старший науковий співробітник
Г.Я. БІДНИК, провідний фахівець
Н.О. ДЕМ'ЯНОВА, провідний фахівець
Інститут захисту рослин НААН

Я.Б. БЛЮМ, професор, доктор біологічних наук,
академік НАН України

О.О. СОЗІНОВ, професор, доктор сільськогосподарських наук,
академік НААН і НАН України

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»

СТВОРЕННЯ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ З РЕКОМБІНАНТНИМ ПЛЕЧЕМ 1RS ЯК ДЖЕРЕЛА НОВИХ ПОЄДНАНЬ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ПРОТИ ЗБУДНИКІВ ХВОРОБ І ШКІДНИКІВ

Створено популяцію рекомбінантно-інбредних ліній покоління F_6 від схрещення Б-16 × AR 7086 між лініями з двома пшенично-житніми транслокаціями: 1BL/1RS від жита Petkus і 1AL/1RS від жита Insave. З використаннями локусів гліадинів і секалінів, як генетичних маркерів, ідентифіковано близько 10% ліній з рекомбінантним плечем 1RS у положеннях 1A і 1B. Решта ліній з житнім матеріалом також можуть мати рекомбінантні 1RS, для аналізу яких потрібно застосовувати ДНК-маркери. Лінії з рекомбінантним плечем 1RS можуть слугувати джерелом нових поєднань житніх генів стійкості проти збудників хвороб і шкідників.

**пшениця м'яка озима, рекомбінантно-інбредні лінії,
пшенично-житня транслокація 1BL/1RS, 1AL/1RS, гени стійкості
проти збудників хвороб і шкідників**

На даний час у пшениці м'якої (*Triticum aestivum* L.) найбільш відомими інтрогресіями з участю короткого плеча 1RS є три пшенично-житні транслокації. У першу чергу, це широко поширена серед комерційних сортів транслокація 1BL/1RS від жита (*Secale cereale* L.) Petkus — транслокація короткого плеча хромосоми 1R жита на довге плече хромосоми 1B пшениці (далі — транслокація в положенні 1B). Вона походить від лінії Riebesel 47-51, створеної Г. Рібезелем (Riebesel) у 30-ті роки 20-го століття [12]. Першим відомим сортом з цією транслокацією є сорт Кавказ. На другому місці за поширенням

серед комерційних сортів — 1AL/1RS — транслокація короткого плеча хромосоми 1R жита на довге плече хромосоми 1A пшениці (далі — в положенні 1A) від аргентинського сорту жита *Insave* [12]. Першим сортом пшениці м'якої з транслокацією 1AL/1RS став сорт *Amigo*, районований у США в 1976 році, який одержав фрагмент житньої хромосоми 1R через сорт октоплоїдного тритикале *Gaучо* (сорт пшениці м'якої *Chinese Spring*, Китай / жито *Insave*) [13]. Третьою важливою житньою транслокацією є транслокація короткого плеча хромосоми 1R від жита *Imperial* на довге плече хромосоми 1D (1DL/1RS), одержана Шепердом у 1973 р., або на 1В [6]. Поки що немає інформації про сорти з цією транслокацією, проте плече 1RS від жита *Imperial* у вигляді транслокацій 1DL/1RS або 1BL/1RS нині застосовується в селекційних програмах Австралії [14]. Всі три транслокації несуть гени стійкості проти збудника стеблової іржі (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.) [8]. Транслокація 1BL/1RS типу Кавказ містить ген *Sr31*, ефективний проти всіх рас стеблової іржі, крім раси *Ug99* [11]. Ця раса вперше з'явилась у 1999 році в Уганді, а потім поширилась у Кенії, Ефіопії, Судані, Ємені, Південно-Африканській республіці, Ірані [17]. Її біотиipi долають також низку різних *Sr* генів [14]. У той же час, дві інші транслокації мають гени стійкості проти збудника стеблової іржі, що є ефективними проти відомих біотипів раси *Ug99*. Транслокація 1AL/1RS типу *Amigo* має ген *Sr1RS^{Amigo}* (надає помірну стійкість), а 1DL/1RS (1BL/1RS) від жита *Imperial* — ген *Sr50* (який раніше позначали *SrR*) [14]. Однак, і *Sr1RS^{Amigo}*, і *Sr50* долаються деякими іншими расами стеблової іржі, поширеними в Європі та Америці [5, 15].

На транслокаціях 1BL/1RS типу Кавказ і 1AL/1RS типу *Amigo* крім генів стійкості проти збудника стеблової іржі також розміщені інші гени стійкості проти збудників хвороб і шкідників: на 1BL/1RS типу Кавказ — *Pm8* (ген стійкості проти збудника борошнистої роси *Erysiphe graminis* (DC)), *Lr26* (ген стійкості проти збудника бурої іржі *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob ex Desm.) та *Yr9* (ген стійкості проти збудника жовтої іржі *Puccinia striiformis* West.) [8], ген стійкості проти біотипу 2 ячмінної попелиці *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) *Dn2414* [10]; на 1AL/1RS типу *Amigo* — ген *Pm17*, ген стійкості проти біотипів попелиці *Schizaphis graminum* (Rondani) В та С *Gb2*, ген стійкості проти кліща *Aceria tosicheilla* (Keifer) *Cm3*.

Особливістю чужинних транслокацій, зокрема пшенично-житніх, є те, що вони передаються нащадкам при схрещенні з пшеницею без рекомбінації — як «суперген», що дозволяє селекціонерам переносити цілий блок генів стійкості з використанням для відбору лише одного маркера транслокації. Перспективним завданням є одержання матеріалу пшениці з рекомбінантними пшенично-житніми транслокаціями — з новими поєднаннями генів стійкості проти збудників хвороб

та шкідників, а також інших господарчо-важливих генів. Досі залишається не дослідженим, чи гени стійкості проти збудника стеблової іржі на вищезгаданих пшенично-житніх транслокаціях є аельними. У випадку неалельності існує потенційна можливість поєднання генів *Sr31* та *Sr1RS^{Amigo}* (або *Sr50*) в одній транслокації. Так, матеріал з рекомбінантним плечем 1RS від транслокацій типу Amigo і Кавказ отримано (Mater та ін. [7]) з метою визначення відносного порядку розміщення генів стійкості проти хвороб і шкідників. Для цього було використано потомства від схрещення біотипу сорту Nekota з 1AL/1RS типу Amigo з лінією сорту 'Pavon 76' з 1AL/1RS, яка несе 1RS від транслокації типу Кавказ. У результаті одержано набір ліній з рекомбінантним плечем 1RS у положенні 1A.

Метою роботи було створення популяції рекомбінантно-інбредних ліній, що походять від схрещення ліній з двома пшенично-житніми транслокаціями (1BL/1RS від жита Petkus і 1AL/1RS від жита Insave) покоління F_6 для одержання ліній з рекомбінантним плечем 1RS з новими поєднаннями генів стійкості проти хвороб і шкідників у положеннях 1A і 1B.

Матеріали і методи. Популяцію рекомбінантно-інбредних ліній (РІЛ) пшениці м'якої озимої покоління F_6 створювали на основі реципрокного схрещення з участю ліній з пшенично-житніми транслокаціями 1BL/1RS (типу Кавказ) і 1AL/1RS (типу Amigo) B-16 × 7086. Лінія B-16 — носій 1BL/1RS транслокації типу Кавказ; 7086 AR — носій 1AL/1RS транслокації типу Amigo. Лінію 7086 AR (далі AR) створено д.б.н. О.І. Рибалкою (Селекційно-генетичний інститут — Національний центр насіннезнавства і сортовивчення, м. Одеса). Для створення РІЛ вирощували широкорядним посівом популяцію рослин F_2 від реципрокного схрещення B16 × AR. З кожної рослини відбирали по одному колосу, з якого по одному зерну використовували для одержання рослин наступного покоління. Решту зерен колоса зберігали як страховий запас. Таким чином отримано популяцію ліній покоління F_6 . Популяція РІЛ F_6 значно зменшилась до 151 лінії в процесі вирощування через об'єктивні причини — погодні умови. Тому в 2013 р. було повторно закладено популяцію F_6 РІЛ зі страхового матеріалу РІЛ F_5 B16 × AR: популяцію збільшено до більше ніж 400 ліній. Зерна цих РІЛ і слугували матеріалом дослідження.

Електрофорез гліадинів окремих зернівок проводили в кислому середовищі в 10% поліакриламідному гелі [16]. Маркером транслокацій є присутність на електрофореграмі спирторозчинних білків зерна секалінових компонентів, кодованих генами локусу *Gli-R1*. Маркером 1BL/1RS транслокації типу Кавказ є присутність блоку компонентів, кодованих алелем, позначеним *Gli-B11* або I^K (G1d 1B3) [4, 9], а маркером 1AL/1RS транслокації типу Amigo — блоку компонентів,

позначеного *Gli-A1w* або w^A (Gld 1A17) [3, 16]. Генотип лінії Б-16 за досліджуваними маркерними локусами: *Gli-A1x Gli-B1l*. Генотип лінії AR: *Gli-A1w Gli-B1e*. Електрофорезом аналізували 3—10 окремих зерен з кожної рослини РІЛ F_6 .

Результати досліджень. Нами за загальноприйнятою схемою створено популяцію РІЛ F_6 від схрещення з участю ліній з пшенично-житніми транслокаціями 1BL/1RS типу Кавказ і 1AL/1RS типу Amigo. Як показали наші попередні дослідження, не всі комбінації схрещення є придатними для закладання РІЛ через дуже низьку озерненість рослин F_1 у певних випадках, наприклад, при схрещенні сортів Колумбія і Миронівська 67 [2]. Виявлено, що одночасна присутність двох житніх транслокацій 1AL/1RS і 1BL/1RS у гібридів F_1 пшениці вводить до зменшення озерненості, порівняно з величинами у батьківських форм, однак величина зниження істотно залежить від комбінації схрещення [2]. Причиною зниження озерненості у таких гібридів може бути формування незбалансованих гамет та аномалії мейозу через кон'югацію пліч 1RS у складі транслокацій на хромосомах 1A і 1B. Для схрещення використано лінії озимої м'якої пшениці Б16 і AR, гібриди між якими дають достатньо високий рівень озерненості. Слід зазначити, що саме гомологічна кон'югація 1RS у складі різних транслокацій (в положеннях 1A і 1B) є механізмом формування рекомбінантного плеча 1RS.

Для ідентифікації РІЛ з пшенично-житніми транслокаціями в якості генетичних маркерів використано локуси, що кодують спираторозчинні білки — гліадини — *Gli-A1*, *Gli-B1* та секаліни у випадку присутності плеча 1RS — *Sec-1* (синонім — *Gli-R1*). Електрофоретичний спектр секалінів 1AL/1RS транслокації типу Amigo відрізняється від спектра компонентів, що кодуються генами на 1BL/1RS транслокації типу Кавказ (рис.). Про положення транслокації (на хромосомі 1A чи 1B) можна судити за наявністю продуктів експресії генів локусів *Gli-A1* і *Gli-B1*. Результати аналізу РІЛ покоління F_6 від схрещення Б16 × AR за маркерними локусами *Gli-A1* та *Gli-B1* наведено в таблиці.

У дослідженій популяції 109 ліній не мали жодної пшенично-житньої транслокації (генотип *Gli-A1x.x Gli-B1e.e*). Решта ліній були гомозиготними або гетерозиготними за принаймні однією транслокацією. Серед РІЛ з транслокаціями у 64 ліній було ідентифіковано рекомбінантне плече 1RS, з них 42 РІЛ з однією транслокацією в гомозиготному стані (10%). Такі лінії можна розділити на дві групи, залежно від положення транслокації. У першій групі ліній з рекомбінантним плечем 1RS при наявності компонента, кодованого алелем *Gli-A1x*, в електрофоретичному спектрі гліадинів були присутні секаліни як у сорту Amigo, кодовані алелем w^A , проте в положенні 1BL/1RS, про що свідчить відсутність компонентів, кодованих *Gli-B1e*

**Чисельності генотипів РІЛ F₆ Б16 × AR
за маркерними локусами**

Хромосома, локус	1BL/1BS (1BL/1RS) <i>Gli-B1(Gli-R1)</i>						Разом
	<i>e.e</i>	<i>I^K.I^K</i>	<i>e.I^K</i>	<i>w^d.w^d</i>	<i>I^K.w^d</i>	<i>e.w^d</i>	
1AL/1AS (1AL/1RS) <i>Gli-A1 (Gli-R1)</i>							
<i>x.x</i>	109	91	5	14	3	1	223
<i>w^d.w^d</i>	120	28	1	3			152
<i>x.w^d</i>	7		1				8
<i>I^K.I^K</i>	28	6	2				36
<i>I^K.w^d</i>	3	1					4
<i>x.I^K</i>	1	1	1				3
Разом	268	127	10	17	3	1	426

Примітки: *I^K* — аель за локусом *Gli-R1* типу Кавказ; *w^d* — аель за локусом *Gli-R1* типу Amigo. Жирним виділено генотипи з ідентифікованим рекомбінантним плечем 1RS

(рис., доріжка 6). У другій групі таких ліній на електрофореграмах гліадинів одночасно спостерігались продукти експресії аеля *Gli-B1e* та блоку секалінів типу Кавказ (*I^K*) при відсутності компонента, кодованого *Gli-A1x*, тобто секаліновий аель *I^K* типу Кавказ виявився у складі транслокації 1AL/1RS (рис., доріжка 3). Отже з використанням маркерних локусів *Gli-A1*, *Gli-B1* та секалінового локусу *Gli-R1 (Sec-1)* виявлено рекомбінантне плече 1RS у біля 10% РІЛ. Близьку частоту рекомбінації між 1RS у складі різних транслокацій (8%) з використанням даних генетичних маркерів виявлено і при аналізі аналогічної популяції з 151 РІЛ F₆ [1].

У майже 9% РІЛ F₆ Б16 × AR ідентифіковано одночасну присутність двох різних пшенично-житніх транслокацій у гомозиготному стані (37 ліній, табл.). У потомстві цих ліній можна очікувати зниження озерненості та нестабільність через кон'югацію 1RS у складі транслокацій 1BL/1RS і 1AL/1RS у мейозі.

Отже, серед проаналізованої популяції РІЛ, 109 ліній не мали пшенично-житніх транслокацій, 22 лінії були гетерогенними за присутністю транслокацій. Решта ліній є носіями пшенично-житніх транслокацій — 108 ліній мали житню транслокацію на хромосомне плече 1BL, 151 — житню транслокацію на плече 1AL, у принаймні 37 ліній ідентифіковано по дві транслокації — на плечах 1BL і 1AL. Аналіз за аелями секалінового локусу дозволив виявити генотипи, що виникли в результаті рекомбінації між коротким плечем 1RS типу Кавказ і 1RS типу Amigo в складі транслокацій 1AL/1RS і 1BL/1RS, у біля

10% РІЛ. Однак решта ліній з житнім матеріалом також можуть мати рекомбінантні IRS, для аналізу яких потрібно застосовувати ДНК-маркери. У випадку неалельності існує потенційна можливість поєднання генів *Sr31* та *SrIRS^{Amigo}* в одній транслокації, що забезпечить високоефективний захист проти збудника стеблової іржі. Також представляють інтерес нові поєднання генів стійкості проти шкідників, які можна шукати серед даних РІЛ за допомогою ДНК маркерів.

ВИСНОВКИ

Створено більше 400 рекомбінантно-інбредних ліній від схрещення ліній з двома пшенично-житніми транслокаціями (1BL/1RS від жита Petkus і 1AL/1RS від жита Insave) покоління F₆ (Б-16 × 7086) з використанням локусів гліадинів і секалінів, як генетичних маркерів, ідентифіковано близько 10% ліній з рекомбінантним плечем IRS у положеннях 1A і 1B. Решта ліній з житнім матеріалом також можуть мати рекомбінантні пшенично-житні транслокації, для аналізу яких потрібно застосовувати ДНК-маркери. Лінії з рекомбінантним плечем IRS можуть слугувати джерелом нових поєднань генів стійкості проти збудників хвороб і шкідників.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Деякі ефекти присутності пшенично-житніх транслокацій з 1RS в геномі пшениці м'якої та створення ліній з рекомбінантними транслокаціями / Н.О. Козуб, І.О. Созінов, Я.Б. Блюм, О.О. Созінов // Сучасні напрями селекційного удосконалення пшениці: матеріали міжнародної конференції, присвяченої 100-річчю селекції пшениці в Селекційно-генетичному інституті — Національному центрі насіннєзнавства і сортовивчення (м. Одеса, 1—3 червня 2016 р.) / НААН, СГІ — НЦНС, М-во аграрної політики та прод. України, Укр. ін-т експертизи сортів рослин. — Вінниця: ТОВ «Нілан-ЛТД», 2016. — С. 94—95.

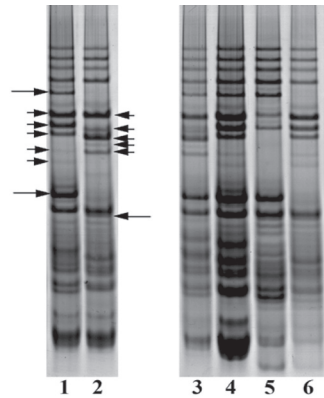


Рис. Електрофореграма гліадинів зернівок з РІЛ F₆ Б16 × AR:

- 1, 4 — лінії з транслокацією 1AL/1RS з секалінами типу Amigo, довгими стрілками позначено компоненти, кодовані алелем *Gli-B1e*, короткими — кодовані алелем *Gli-A1w⁴* (блок секалінів типу Amigo);
- 2 — лінія з транслокацією 1BL/1RS з секалінами типу Кавказ, довгою стрілкою позначено компонент, кодований алелем *Gli-A1x*, короткими — кодовані алелем *Gli-B11* (блок секалінів типу Кавказ);
- 3 — лінія з транслокацією 1AL/1RS з секалінами типу Кавказ;
- 5 — лінія без житніх транслокацій;
- 6 — лінія з транслокацією 1BL/1RS з секалінами типу Amigo

2. *Озерненість* та інші ознаки продуктивності рослин F_1 пшениці м'якої від схрещення форм з транслокаціями 1BL/1RS і 1AL/1RS / І.О. Созінов, Н.О. Козуб, Г.Я. Бідник та ін. // Фактори експериментальної еволюції організмів: зб. наук. пр. НАН України, ІМБіГ, Укр. т-во генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова; редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. — К.: Укр. товариство генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавилова, 2016. — Т. 18. — С. 154—158.

3. *Собко Т.О.* Частота, з якою зустрічаються алелі гліадинкодуєчих локусів у сортів м'якої озимої пшениці / Т.О. Собко, Ф.О. Попереля // Вісник сільськогосподарської науки. — 1986. — № 5. — С. 84—87.

4. *Созинов А.А.* Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции / А.А. Созинов. — М.: Наука, 1985. — 272 с.

5. *Global status of Ug99 spread and efforts to mitigate the threat* / R.P. Singh, D.P. Hodson, J. Huerto-Espino et al. // International Conference on Wheat Stem Rust Ug99 — a Threat to Food Security, 6—8 November 2008: executive summaries of invited lectures. — New Dehli, India. — P. 1—8.

6. *Koebner R.M.D.* Controlled introgression to wheat of genes from rye chromosome arm 1RS by induction of allosyndesis 1. Isolation of recombinants / R.M.D. Koebner, K.W. Shepherd // Theor. Appl. Genet. — 1986. — Vol. 73, N 2. — P. 197—208.

7. *Linkage mapping of powdery mildew and greenbug resistance genes on recombinant 1RS from Amigo and Kavkaz wheat-rye translocations on chromosome 1RS.1AL / Y. Mater, S. Baenziger, K. Gill [et al.]* // Genome. — 2004. — Vol 47. — P. 292—298.

8. *Mac Gene*, Gene Symbols, Gene Classes and References [Електронний ресурс]. — 2013. — Режим доступу: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf>

9. *Metakovsky E.V.* Gliadin allele identification in common wheat. II Catalogue of gliadin alleles in common wheat // J. Genet. Breed. — 1991. — Vol. 45. — P. 325—344.

10. *Molecular mapping of the Russian wheat aphid resistance gene Dn2114 in wheat* / Peng J., Wang H., Haley S.D., Pears F.B., Lapitan N.L.V. // Crop Science. — 2007. — Vol. 47. — P. 2418—2429.

11. *Pretorius Z.A.* Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda / Z.A. Pretorius // Plant Disease. — 2000. — Vol. 84, N 2. — P. 203.

12. *Rabinovich S.V.* Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. / Rabinovich S.V. // Euphytica. — 1998. — Vol. 100. — P. 323—340.

13. *Registration of Gaucho greenbug-resistant triticale germplasm* / E.E. Sebesta, E.A.Jr. Wood [et. al.] // Crop Sci. — 1994. — Vol. 34. — P. 1428.

14. Singh S. Stem rust / S. Singh, R.P. Singh, J. Huerta-Espino // Disease Resistance in Wheat, ed. I. Sharma, CAB International, 2012. — P. 18—32.

15. *The wheat Sr50 gene reveals rich diversity at a cereal disease resistance locus* / R. Mago, P. Zhang, S. Vautrin, [et al.] // Nature Plants. — 2015. — Vol. 1, N 15186. — P. 1—3.

16. *Variation at storage protein loci in winter common wheat cultivars of the Central Forest-Steppe of Ukraine* / N.A. Kozub, I.A. Sozinov, T.A. Sobko [et al.] // Цитология и генетика. — 2009. — Т. 43, № 1. — С. 69—77.

17. *Wheat Stem Rust — Ug99 (Race TTKSK)* [Электронный ресурс] Режим доступа: (<http://www.fao.org/agriculture/crops/rust/stem/rust-report/stem-ug99racetkksk/en/>).

Козуб Н.А., Созинов И.А., Биднык А.Я., Демьянова Н.А., Блюм Я.Б., Созинов А.А. Создание линий пшеницы мягкой с рекомбинантным плечем IRS как источника новых сочетаний генов устойчивости против возбудителей болезней и против вредителей

Создана популяция рекомбинантно-инбредных линий поколения F₆ от скрещивания B-16 × AR 7086 между линиями с двумя пшенично-ржаными транслокациями: 1BL/IRS от ржи Petkus и 1AL/IRS от ржи Insave. С использованием локусов глиадинов и секалинов, как генетических маркеров, идентифицированы около 10% линий с рекомбинантным плечем IRS в положениях 1A и 1B. Остальные линии с ржаным материалом также могут иметь рекомбинантные IRS, для анализа которых необходимо применять ДНК-маркеры. Линии с рекомбинантным плечем IRS могут служить источником новых сочетаний ржаных генов устойчивости против возбудителей болезней и против вредителей.

Kozub N.A., Sozinov I.A., Bidnyk A.Ya., Demianova N.A., Blume Ya.B., Sozinov A.A. Development of common wheat lines with the recombinant arm IRS as a source of new combinations of disease and pest resistance genes

A combination of recombinant-inbred lines of the F₆ generation from the cross B-16 × AR 7086 between lines with two wheat-rye translocations, 1BL/IRS from the Petkus and 1AL/IRS from the rye Insave, was developed. Using gliadin and secalin loci as genetic markers we identified recombinant arm IRS in positions 1A and 1B in about 10% of lines. The rest of lines with the rye material may also carry recombinant IRS, which can be identified with DNA markers. Lines with recombinant arm IRS may serve as a source of new combination of rye genes for disease and pest resistance.