

УДК 577.21:575.113:632.4

О. В. ГАЛАЄВ, к. б. н., пров. наук. співроб.
Л. Т. БАБАЯНЦ, к. с.-г. н., пров. наук. співроб.
СГІ–НЦНС, Одеса
e-mail: galaev7@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО ГРИБКОВИХ ЗАХВОРЮВАНЬ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*Triticum aestivum* L.)

*Подаються результати застосування молекулярно-генетичних маркерів для маркування та картування нового гена стійкості до твердої сажки, що перенесений від *Ae. cylindrica* в геном пшениці, ідентифікації головних расоспецифічних генів стійкості до листової та стеблової іржі у 80 сортах та 15 лініях пшениці м'якої, які створені з 1991 року у СГІ–НЦНС та виявлення гена мультипатогенної нерасоспецифічної стійкості Lr34/Yr18/Pm38 у сортів пшениці української і російської селекції. У вивчених сортів та ліній виявлені гени Lr21, Lr24/Sr24, Lr26/Sr31 (1BL.1RS), Lr34/Yr18/Pm38 та Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo} (1AL.1RS) окремо і в комбінаціях. Показано, що сорти та лінії з комбінацією генів Lr24+Lr34+Lr^{Amigo}, Lr21+Lr24+Lr34, Lr24+Lr^{Amigo} та Lr21+Lr24+Lr^{Amigo} забезпечують ефективний і надійний рівень стійкості на Півдні України і можуть використовуватись в якості донорів в селекційних програмах України.*

Ключові слова: пшениця м'яка, гени стійкості, тверда сажка, молекулярні маркери, Lr-гени, чужорідний генетичний матеріал.

Вступ. Поліпшення стійкості до патогенних грибків — одне з головних завдань, яке стоїть перед селекціонерами пшениці в усьому світі. Бура листовая, стеблова та жовта іржа, борошниста роса й тверда сажка є основними шкодочинними захворюваннями пшениці в усіх зонах України, що призводять до регулярної втрати врожаю та зниження його якості через мікотоксини. Захист рослин від патогенів здійснюється трьома способами: 1) застосуванням агротехнічних заходів; 2) використанням широкого спектру хімічних препаратів; 3) селекцією на стійкість рослин. Внесення хімічних засобів захисту посівів призводить до збільшення пестицидного навантаження на довкілля. Крім того, в популяціях шкідливих організмів накопичуються генотипи з мутаціями резистентності до фунгіцидів, що знижує ефективність їхнього застосування і потребує розробки й застосування нових препаратів. Отож, менш коштовним та екологічно чистим способом боротьби з хворобами й шкідниками є створення і впровадження стійких сортів [1].

Пошук джерел стійкості, маркерування та ідентифікація генів, що відповідають за стійкість рослин до захворювань, є основою технології створення нових сортів багатьох сільськогосподарських культур з високим рівнем стійкості до різних фітозахворювань. Стратегія селекції пшениці м'якої на стійкість до грибкових захворювань передбачає використання нових та відомих і раніше ефективних генів від диких співродичів пшениці. Доволі значного поширення набула практика використання відомих головних генів і їхніх комбінацій (пірамідкування), що пов'язано з наявністю молекулярних маркерів до цих генів і, відповідно, з можливістю використання їх у MAS (marker-assisted selection; добір за допомогою молекулярних маркерів). Залучання в селекційний процес нових генів стійкості потребує проведення додаткової тривалої і коштовної роботи з пошуку генетичних маркерів, які зчеплені або асоційовані з цільовими геном/генами.

До пірамідкування можна вдаватися і при використанні подоланих головних генів. У цьому випадку прийнятний рівень стійкості досягається за рахунок залишкових ефектів на стійкість, які проявляються кожним подоланим геном і їхньою адитивною дією [2]. Згідно з літературними даними, тривалість збереження стійкості сортів забезпечується, коли вертикальна (расоспецифічна) стійкість базується на використанні головних генів і поєднується з горизонтальною (нерасоспецифічною) стійкістю [3, 4]. Створення сортів з такою стійкістю більш складний і тривалий процес, що передбачає залучення молекулярних маркерів.

Використання відомих головних генів стійкості, до яких розроблені молекулярні маркери, полегшує їхнє комбінування в одному сорті і забезпечує майже ідеальну генетичну стійкість, яка знижує ймовірність того, що весь комплекс генів стійкості, наявний у сорті, буде швидко подоланий незалежними мутаціями патогена. У зв'язку з цим розробка ДНК-технології добору генотипів м'якої пшениці з певними комплексами алелів генів стійкості до основних шкодочинних захворювань пшениці є надто актуальною.

Мета даного дослідження полягала у вивченні можливостей використання молекулярних маркерів для: 1) маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного з *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці; 2) ідентифікації генів стійкості до листової та стеблової іржі у сортів та ліній пшениці м'якої озимої селекції СГІ; 3) ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, у 228 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження; 4) виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі, у сортів та ліній пшениці м'якої озимої в умовах Півдня України.

Матеріали і методи. *Рослинний матеріал.* Матеріалом для маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці, були зразки місцевої популяції

виду *Ae. cylindrica* Host (CCDD, $2n = 28$), рекурентний сорт м'якої пшениці Одеська напівкарликова і лінія Лютесценс 23397, інтрогресивна лінія пшениці 5/55–91 — [(Одеська напівкарликова х *Ae. cylindrica*) х Одеська напівкарликова] F_9 ($2n = 42$), інтрогресивна лінія пшениці 378/2000 — (5/55–91 х Одеська напівкарликова) F_9 ($2n = 42$), популяції BC_3F_2 та BC_3F_3 , що отримані від схрещування 378/2000 х Лютесценс 23397.

Ідентифікували гени стійкості до листової та стеблової іржі *Lr9*, *Lr19*/*Sr25*, *Lr21*, *Lr24*/*Sr24*, *Lr26*/*Sr31*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr^{Amigo}*/*Sr^{Amigo}* у 80 сортів пшениці м'якої озимої, які створені з 2000 року у СГІ та 15 ліній отриманих від міжвидових схрещувань 5/55–91, 5/20–91, 378/2000, КП 3/12, КП 15/12, КП 16/12, КП 28/12, КП 42/12, КП 64/12, КП 82/12, КП 83/12, КП 84/12, КП 153/12, СП 519/12, СП 520/12, які створено у відділі фітопатології та ентомології СГІ–НЦНС.

Матеріалом для ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, були 228 сортів пшениці м'якої озимої різного географічного походження.

Для виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі в умовах Півдня України, досліджували сорти Вихованка та Княгиня Ольга і 15 ліній, отриманих від міжвидових схрещувань.

Позитивним контролем для визначення відомих генів були використані майже ізогенні лінії сорту Thatcher з генами стійкості до листової іржі *Lr9* (TcLr9), *Lr19* (TcLr19), *Lr21* (TcLr21), *Lr24* (TcLr24), *Lr26* (TcLr26), *Lr34* (TcLr34), *Lr37* (TcLr37) та сорти/лінії носії генів стійкості: Amigo (*Lr^{Amigo}*/*Sr^{Amigo}*), *Ae. squarrosa* KS86WGRC02 (*Lr39*), *Ae. squarrosa* KS91WGRC11 (*Lr42*), ОК75Abd-386-Oklahoma (*Sr24*), ОК75Abd-380-Oklahoma (*Sr25*), які надані National Plant Germplasm System (США).

Виділення ДНК. ДНК виділяли з 5-денних паростків, зеленого листа або сухого зерна з застосуванням СТАВ-буфера [5].

Умови ампліфікації ДНК та візуалізації продуктів ампліфікації при маркеруванні та картуванні гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці, описано Галаєвим та ін. [6], при ідентифікації генів стійкості до листової та стеблової іржі наведено у роботі Гораша та ін. [7], при ідентифікації алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38*, описано Галаєвим та ін. [8].

Фітопатологічний аналіз. Стійкість на дорослих рослинах оцінювали за 9-бальною шкалою [9]. Ефективність генів стійкості до листової іржі вивчали на стадії проростків у теплиці і на дорослих рослинах у польових умовах разом з науковими співробітниками відділу фітопатології та ентомології СГІ за їхніми методиками. Оцінювали стійкість до листової іржі на стадії проростків за шкалою: VR — дуже стійкі, R — стійкі, MR — помірно стійкі, MS — помірно чутливі, S — чутливі, VS — дуже чутливі.

Статистична обробка результатів — за загальноприйнятими методиками [10].

Результати й обговорення. 1. Маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від *Aegilops cylindrica* в геном м'якої пшениці. Однією з стратегій селекції м'якої пшениці на стійкість до грибкових захворювань є залучення нових головних генів стійкості від диких співродичів пшениці, що потребує попереднього маркування цільового гена/генів.

Маркування чужорідних генів стійкості потребує декількох етапів: 1) пошук поліморфних локусів ДНК між батьківськими формами; 2) детекція інтрогресивних фрагментів у лінії пшениці; 3) виявлення стабільних інтрогресивних фрагментів; 4) скринінг популяцій, що розщеплюються, з використанням МС маркерів до стабільних інтрогресивних фрагментів для виявлення їхнього зчеплення з геном (генами) стійкості до фітопатогенів, перенесених від дикого співродича.

Молекулярно-генетичний поліморфізм генотипів батьківських форм. Для пошуку молекулярно-генетичного поліморфізму генотипів батьківських форм сорту Одеська напівкарликова та виду *Ae. cylindrica* використано 115 пар праймерів до 148 МС локусів пшениці. За результатами SSR-аналізу за 93 мікросателітними (МС) локусами пшениці (62,8 %) виявили продукти ампліфікації у *Ae. cylindrica*. Показана можливість використання МС маркерів м'якої пшениці для картування геному *Ae. cylindrica* [11]. 63 МС локуси (42,0 %) дозволили виявити поліморфізм між пшеницею та *Ae. cylindrica* [12, 13]. Виявлені поліморфні між батьківськими формами МС локуси є основою для детекції чужорідного генетичного матеріалу в гібридному геномі.

Детекція інтрогресивних фрагментів у лінії пшениці 5/55–91. ПЛР-аналізом з використанням 63 МС маркерів пшениці вдалося виявити у лінії 5/55–91 16 інтрогресивних фрагментів (табл. 1) [14]. Останнім часом існує проблема можливості переносу генів стійкості до гербіцидів від трансгенної пшениці до *Ae. cylindrica* за спонтанної гібридизації в польових умовах. У зв'язку з цим ряд авторів [15] пропонує вводити трансгени в негомологічні до *Ae. cylindrica* геноми А та В пшениці, що запобіжить потоку генів від трансгенної пшениці до диких видів. Однак у наших роботах виявлені інтрогресивні фрагменти у гібридних лініях не тільки в геномі D пшениці гомологічному геному D *Ae. cylindrica*, але і в негомологічних геномах А та В, що свідчить про можливість інтрогресії ДНК геномів С та D *Ae. cylindrica* в м'яку пшеницю і навпаки, — ДНК з геномів А, В та D м'якої пшениці може бути інтрогресована в *Ae. cylindrica* [13].

Стабільність інтрогресивних фрагментів. МС маркери, які виявили інтрогресивні фрагменти у лінії 5/55–91, було використано для дослідження її бекросного нащадка лінії 378/2000. За дванадцяти МС локусами виявлено стабільну інтрогресію (табл. 1); за даними маркерами можна виявити продукти інтрогресії зчеплених з геном (генами) стійкості до фітопатогенів, що перенесені від егілопсу до пшениці [12, 14].

Таблиця 1

Мікросателітні маркери, що виявили фрагменти геному егілопсу в геномах
бекросних нащадків пшенично-егілопсних гібридів

Локус	Локалізація	Алель, п. н.	Лінія	
			5/55–91 (BC ₁ F ₉)	378/2000 (BC ₂ F ₅)
Taglut	1AS	126	+	+
Barc17	1AL	300	+	+
Barc213	1AL	170	+	+
Xgwm18	1BS	196	+	+
Xgwm259	1BL	99	+	+
Xgwm33	1DS	null	+	+
Xgwm 619	2BL	184	+	–
Xgwm389	3BS	114	+	+
Xgwm314	3DL	171	+	+
Xgwm383	3DL	218	+	–
Xgwm499	5BL	140	+	+
Xcfd7	5BL	190	+	+
Xbarc88	5BL	94	+	+
Xgwm182	5DL	167	+	+
Xgwm427	6AL	null	+	–
Xgwm617	6AL	null	+	–

Примітка: «+» — присутність інтрогресивного алеля, «–» — відсутність інтрогресивного алеля.

Успадкування стійкості до твердої сажки. Фенотиповий прояв стійкості до твердої сажки визначали на 170 рослинах популяції BC₃F₂, що отримані від схрещування 378/2000 x Лютесценс 23397. Стійкість успадковувалась як моногенно домінантна ознака 3:1, з розщепленням у F₂ 138 стійких та 32 чутливих рослин ($\chi^2 = 3,16$). З 138 стійких рослин F₂ в F₃: 34 сім'ї — гомозиготні за стійкістю до твердої сажки та 104 — гетерозиготні. Однак співвідношення класів розщеплення F₂ не відповідає очікуваному 1:2:1 ($\chi^2 = 7,66$). В даному випадку спостерігається відхилення теоретичних класів від емпіричних: нестача обох типів гомозигот та надлишок гетерозигот. Чинник, що спотворює розщеплення, можливо, пов'язаний з розташуванням гена стійкості в складі чужорідної транслокації, внаслідок чого можуть виникати певні відхилення у співвідношенні розщеплення за досліджуваною ознакою.

Молекулярне маркування та картування гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від Ae. cylindrica в м'яку пшеницю. При генотипуванні рекомбінантів BC₃F₂ і фенотипового прояву стійкості до твердої сажки за допомогою програми «JOINMAP» ver. 2.0 з картуючою функцією Козамбі [16] визначили відстань MC маркера Xgwm259 від гена стійкості до твердої сажки, яка склала на хромосомній карті пшениці 7,6 сМ (рис. 1). Даний маркер можна використати в селекції на поліпшення генотипів пшениці щодо стійкості до твердої сажки [6, 17].

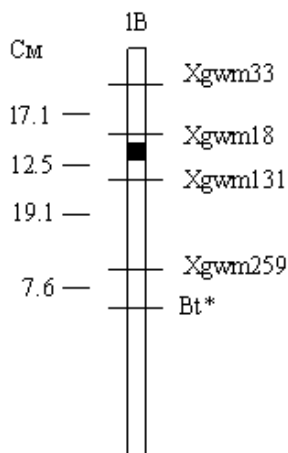


Рис. 1. Генетична карта 1В хромосоми пшениці з локалізацією інтрогресивного гена стійкості до твердої сажки

2. Ідентифікація генів стійкості до листової та стеблової іржі в сортах та лініях пшениці м'якої озимої селекції СГП. Пошук молекулярних маркерів, зчеплених з новим ефективним геном/генами стійкості до фітопатогенів, це досить тривала та коштовна робота. Також доволі рідко вдається використати нові гени від диких видів з комерційною метою через те, що інтрогресивні ділянки хромосом, крім корисних генів, часто містять генетичний матеріал, який може негативно впливати на прояв агрономічно цінних ознак.

Тому найчастіше в селекції на стійкість як донорів використовують сорти та лінії з відомими ефективними головними генами стійкості, щодо яких розроблені молекулярні маркери.

Через незначну кількість інформації, що стосується ідентифікації ефективних генів стійкості у сортів пшениці української селекції, актуальним є розширення відповідних досліджень з застосуванням молекулярних маркерів.

За даними відділу фітопатології та ентомології СГП в Україні високо-ефективними генами стійкості до листової та стеблової іржі є *Lr9*, *Lr19/Sr25*, частково ефективними — *Lr24/Sr24*, *Lr37/Sr38*, *Lr39 (=Lr41)*, *Lr42* і такі, що забезпечують помірну стійкість, — *Lr26/Sr31* (1BL.1RS) [18], *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}* (1AL.1RS) [18, 19, 20].

Ідентифікацію генів досліджуваної стійкості *Lr9*, *Lr19/Sr25*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31*, *Lr37/Sr38*, *Lr39*, *Lr42*, *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}* проводили у 80 сортів та 15 ліній пшениці м'якої озимої, створених з 2000 року у СГП за допомогою молекулярних маркерів [7]. У зв'язку з тим, що в якості джерел стійкості при створенні сортів Княгиня Ольга, Вихованка та відповідних ліній використовували види *Triticum tauschii*, *Aegilops cylindrica*, *Triticum erebuni*, які мають D геном, проводили ідентифікацію генів *Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*. Ідентифікували також ген *Lr53* у ліній, отриманих від міжвидових схрещувань за участі *Triticum dicoccoides*.

У результаті дослідження виявлено, що в сортах та лініях, створених з 1991 року у відділі фітопатології та ентомології СГП, не ідентифіковані гени *Lr9*, *Lr19/Sr25*, *Lr37/Sr38*, *Lr39* та *Lr42*. У сортах Княгиня Ольга, Вихованка та 15 лініях не виявлено також генів *Lr22a*, *Lr32* та *Lr53*. Серед вивчених сортів та ліній виявлені носії генів *Lr21*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31* (1BL.1RS) та *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}* (1AL.1RS) окремо і в комбінації: Щедрість (*Lr26/Sr31*); КП 153/12 (*Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}*, *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*); Княгиня Ольга, Вихованка одеська, КП 3/12, КП 15/12, КП 16/12, КП 64/12, СП 519/12, 5/55–91, 5/20–91 (*Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*); КП 28/12 та КП 42/12 (*Lr21*, *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*); КП 82/12 (*Lr21+Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*); КП 83/12 (*Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}*, *Lr21+Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}*, *Lr21+Lr24/Sr24*, *Lr21+Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*); КП 84/12 (*Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}*, *Lr21+Lr24/Sr24*, *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo} + Lr24/Sr24*); СП 520/12 (*Lr24/Sr24*, *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}+Lr24/Sr24*). На рисунку 2 показано результати ампліфікації при використанні універсального маркера *Xscm9*, який дозволяє, за даними Weng et al. [19], одночасно виявляти транслокації 1BL.1RS від сорту Кавказ і 1AL.1RS від сорту Amigo.

Отже, в результаті проведеного скринінгу за наявністю ефективних генів стійкості до листової та стеблової іржі виявлені сорти та лінії — носії чужорідних генів і їхніх комбінацій, які можна буде використовувати в селекції.

Однак досліджені сорти пшениці, в яких не виявлено ефективних в Україні генів стійкості, все ж володіють польовою стійкістю, яка, скоріш за все, забезпечується залишковими ефектами стійкості, які проявляються кожним подоланим геном та їхньою адитивною дією, а також поєднанням з генами загальної нерасоспецифічної стійкості.

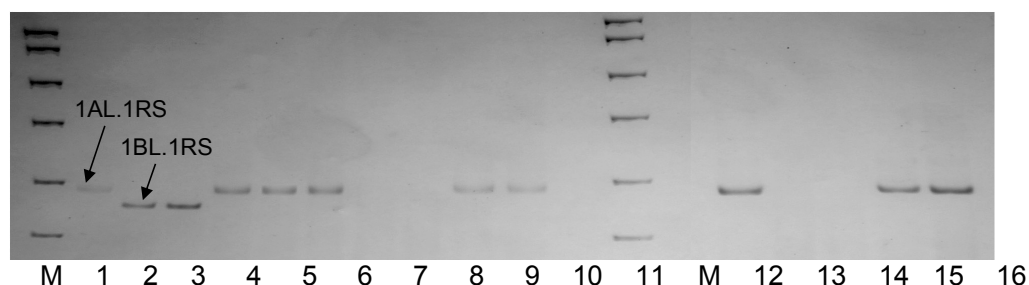


Рис. 2. Електрофореграма в 12 % неденатуруючому ПААГ продуктів ампліфікації ДНК сортів і ліній СГП з праймерами до локусу *Xscm9*: М — маркер молекулярної маси *pUC19/MspI*; 1– Amigo, 2, 3 — Щедрість; 4–6 — Вихованка одеська; 7–8 — Антонівка; 9–10 — Княгиня Ольга; 11–12 — Зорепад; 13–17 — СП 520/12

3. Ідентифікація алелів локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної нерасоспецифічної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* у сортів пшениці української і російської селекції.

Останнім десятиріччям популярності набуває стратегія селекції пшениці м'якої на стійкість до грибкових захворювань, яка базується на поєднанні у сортах генів вертикальної (расоспецифічної) та горизонтальної

(нерасоспецифічної) стійкості, що забезпечує високий рівень стійкості протягом тривалого часу.

Незважаючи на те, що расоспецифічна стійкість забезпечує високоєфективний захист, проте стійкість, яка не ґрунтується на специфічному упізнаванні між господарем і збудником, часто виявляється більш стабільною та довготривалою. Нерасоспецифічна стійкість характеризується не надчутливістю, а частковою стійкістю, пов'язаною з тривалим латентним періодом розвитку захворювання [21, 22]. Найбільш важливе значення в селекції пшениці мають локуси загальної стійкості до листової та жовтої іржі і борошнистої роси *Lr34/Yr18/Pm38* (локалізовано на хромосомі 7DS) і *Lr46/Yr29/Pm39* (локалізовано на хромосомі 1BL), оскільки вони дозволяють одночасно добирати нерасоспецифічну і потенційно тривалу стійкість до трьох найбільш важливих біотрофних патогенів у пшениці, що завжди успадковується разом, як одна менделююча ознака [23, 24]. Локус *Lr34/Yr18/Pm38* в комбінації з іншими расоспецифічними генами забезпечує високий рівень стійкості протягом багатьох десятиріч [3,4], також асоційований з толерантністю до вірусу жовтої карликовості ячменю *Bdv1* [25, 26]. У зв'язку з цим набуває великого значення *генотипування сортів пшениці м'якої різного географічного походження за алелями локусу csLV34 для виявлення гена Lr34/Yr18/Pm38.*

Проаналізовано колекцію із 198 сортів української та 30 російської селекції, які створені в основних селекційних центрах з 1959 року (виведення Безостої 1) по 2011-й рік, на наявність гена стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* [8]. За результатами ПЛР з парою праймерів до локусу *csLV34* [27] виявлено тільки два однозначні алелі: *csLV34a* довжиною 229 п. н. та *csLV34b* довжиною 150 п. н., асоційованих, відповідно, з відсутністю та присутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38*.

У більшості українських та російських сортів пшениці, відповідно 87,9 % та 93,3 %, виявлено один з двох алелів локусу *csLV34*. Гетерогенні за цим геном сорти склалися з двох генотипів *aa* та *bb* з різним співвідношенням часток генотипів. Найбільшого поширення алель *csLV34b* набув серед сортів Півдня України (67,8±3,9 %). На Півночі і в Центрі України серед сортів пшениці м'якої озимої найбільш поширений алель *csLV34a* (від 58,3 до 80,0 %) (рис. 3). На Сході України частота алелів *csLV34a* (54,5±15,0 %) та *csLV34b* (45,5±15,0 %) достовірно однакова. У російських сортах Західного Сибіру та Поволжя частота алеля *csLV34b* дорівнює 29,4±11,0 %, на Північному Кавказі — 38,5±13,5 %. Висока частота алеля *csLV34b*, асоційованого з геном *Lr34/Yr18/Pm38*, в сортах Півдня України пов'язана з активним використанням в селекційних програмах сортів-носіїв зазначеного алеля: Безоста 1, Одеська 51, Одеська напівкарликова, Зірка, Альбатрос одеський, Вікторія одеська, Українка одеська та Селянка. Висока частота алеля *csLV34a*, асоційованого з відсутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38*, у сортах Півночі, Центру України та Західного Сибіру пов'язана з активним використанням в селекційних

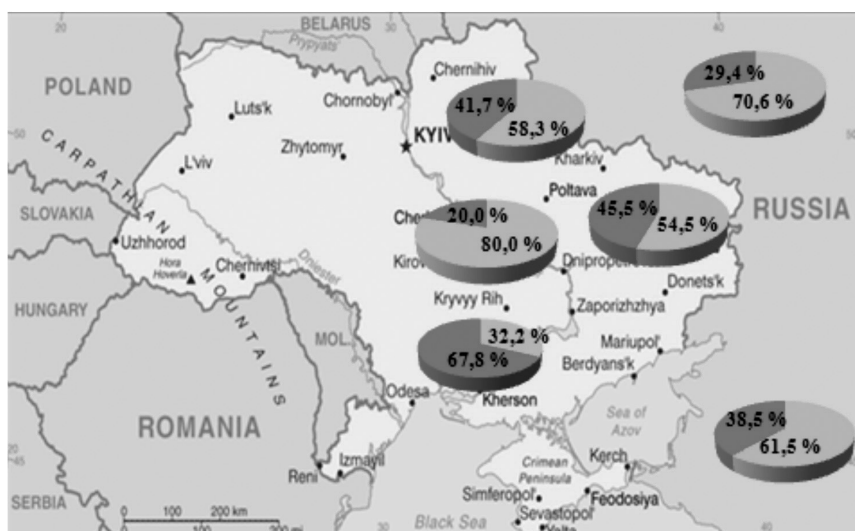


Рис. 3. Розподіл алелей локусу *csLV34* у сортів м'якої пшениці України та Росії:

■ — алель *csLV34a*; ■ — алель *csLV34b*

програмах адаптованих для даних регіонів морозозимостійких сортів-носіїв зазначеного алеля: Ульянівка, Миронівська 808, Багратіонівка.

Слід зауважити, що ген *Lr34/Yr18/Pm38* не є ефективним у сортах України та Росії. Такі пшениці уражаються листовою іржею в межах 15–90 % [4; 28; 29]. Експресія гена *Lr34/Yr18/Pm38* залежить від температури доквілля та стадії онтогенезу рослини. Прояв гена *Lr34/Yr18/Pm38* відбувається у польових умовах у діапазоні від 0 до 20°C, при збільшенні температури експресія гена інгібується [30]. Незважаючи на низьку ефективність гена *Lr34/Yr18/Pm38*, рядом авторів показано, що комбінація його з іншими расоспецифічними генами, такими як *Lr13*, *Lr22a*, *Lr26*, *Lr35* та *Lr37*, значно підвищує рівень польової стійкості [6, 7]. Також відомий позитивний вплив гена *Lr34/Yr18/Pm38* на гени стійкості до стеблової іржі [31]. При розподілі досліджених сортів пшениці м'якої озимої, створених у СГІ за етапами селекції, згідно з М. А. Литвиненком [32], виявлено зростання частоти алеля *csLV34b* з кожним новим етапом (рис. 4). Це свідчить про збереження ефективності гена *Lr34/Yr18/Pm38* на Півдні України (за присутності інших генів расоспецифічної стійкості), яка пов'язана зі стійкістю до листової і жовтої іржі, борошністої роси та вірусу жовтої карликовості ячменю, що сприяло добору селекціонерами генотипів рослин з цим геном.

4. Виявлення комбінації генів, що забезпечують стійкість до листової іржі в умовах Півдня України. У результаті проведеного скринінгу за наявністю ефективних генів стійкості до листової іржі виявлено сорти та лінії — носії чужорідних генів *Lr21*, *Lr24*, *Lr26* та *Lr^{Amigo}* і їх комбінацій (пункт. 2). У зв'язку з тим, що в сортах м'якої пшениці селекції СГІ найбільш поширений алель *csLV34b*, асоційований з присутністю гена *Lr34/Yr18/Pm38* ($67,8 \pm 3,9$ %) [8], то доцільно було провести іден-

тифікацію цього гена в 15 лініях, отриманих від міжвидових схрещувань. З-поміж ліній виявлені носії гена *Lr34*: КП 3/12, КП 16/12, КП 28/12, КП 42/12, КП 64/12, КП 82/12, КП 84/12, КП 153/12 та 378/2000. Найбільш важливі для вивчення взаємодії генів стійкості *Lr21*, *Lr24*, *Lr34*, *Lr^{Amigo}* є гетерогенні лінії, в яких виявлені кілька комбінацій *Lr* генів.

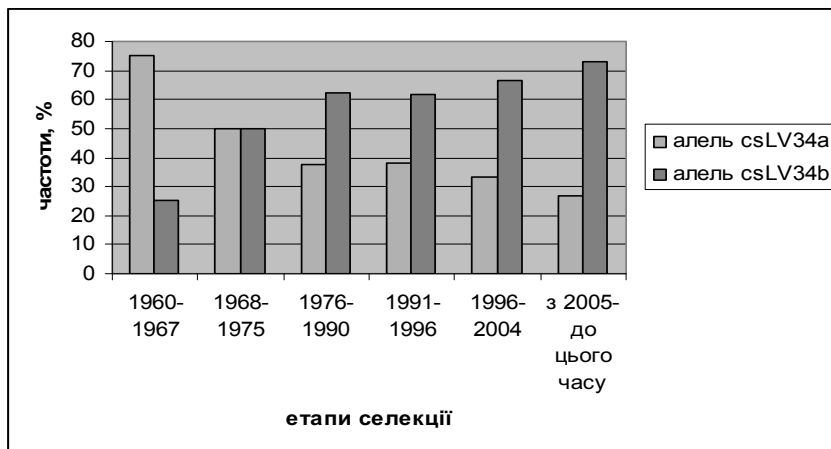


Рис. 4. Гістограма розподілу частот алелей локусу *csLV34* в сортах пшениці м'якої СГП різних етапів селекції

Рослини гетерогенних селекційних ліній по-різному реагували на листову іржу. Порівняння результатів молекулярно-генетичного аналізу з фенотиповим проявом стійкості до листової іржі на стадії проростків показало, що стійкість забезпечується різними комбінаціями *Lr* генів. Рослини з комбінацією *Lr24+Lr34+Lr^{Amigo}* (T1AL.1RS) були стійкі. Серед рослин з комбінацією *Lr21+Lr24+Lr34* три були стійкі і дві помірно стійкі. Рослини з комбінацією *Lr^{Amigo}+Lr24* були стійкі, з комбінаціями *Lr21+Lr^{Amigo}+Lr24* і *Lr21+Lr24* — помірно стійкі. З-поміж рослин з комбінацією *Lr^{Amigo}+Lr34* дві були стійкі, одна — чутлива. Рослини з комбінацією *Lr21+Lr^{Amigo}*, а також з одним геном *Lr24* — помірно чутливі. Рослини з комбінацією *Lr21+Lr34*, а також з одним геном *Lr^{Amigo}* чи *Lr34* були чутливі (табл. 2) [7].

У досліджуваному матеріалі ключовим геном, що забезпечує стійкість до бурої іржі, був *Lr24* (T1BL.1BS — 3Ae # 1L), який в окремому використанні забезпечує помірно чутливий тип стійкості. Гени *Lr21*, *Lr34* і транслокація T1AL.1RS в окремому використанні дають чутливість. У поєднанні їх з *Lr24* (T1BL.1BS — 3Ae # 1L) рослини показали стійкість або помірну стійкість. Згідно з повідомленням Huerta — Espino et al. [33], *Lr21* залишається ефективним у Канаді, Північній Америці, Південній Африці, на Середньому Сході, у Північній Африці та Центральній Азії; локально вірулентність до гена *Lr21* була виявлена в Європі, де він продовжує залишатися ефективним у багатьох країнах. Ген *Lr34* залишається ефективним у Північній Америці, Південній та Північній Африці, на Близькому Сході, в Центральній Азії. Також, згідно з повідомленнями багатьох до-

слідників, *Lr34* в комбінації з іншими генами може посилювати стійкість до бурої іржі [34, 35]. У наших дослідженнях виявлено також, що поєднання генів з частковою стійкістю або кількох неефективних/ефективних генів з геном *Lr34* забезпечує достатній рівень стійкості [7].

Таблиця 2

Порівняння результатів молекулярно-генетичного аналізу з фенотиповим проявом стійкості до листової іржі гетерогенних селекційних ліній [7]

Лінія	Рослина, №	Тип реакції	Ген				Рослина, №	Тип реакції	Ген			
			<i>Lr21</i>	<i>Lr^{Amigo}</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr34</i>			<i>Lr21</i>	<i>Lr^{Amigo}</i>	<i>Lr24</i>	<i>Lr34</i>
КП 28/12	1	R	-	+	+	+	4	S	+	-	-	+
	2	R	-	+	+	+	5	R	-	+	+	+
	3	R	-	+	+	+	6	R	-	+	+	+
КП 42/12	1	R	-	+	+	+	4	R	-	+	+	+
	2	S	+	-	-	+	5	R	-	+	+	+
	3	R	-	+	+	+						
КП 83/12	1	MR	+	+	+	-	6	S	-	+	-	-
	2	MS	+	-	+	-	7	MS	+	+	-	-
	3	MS	+	+	-	-	8	MR	+	+	+	-
	4	MR	+	+	+	-	9	MS	+	+	-	-
	5	MR	+	+	+	-	10	MR	+	+	+	-
КП 84/12	1	R	+	-	+	+	7	R	-	+	+	+
	2	R	-	+	+	+	8	R	+	-	+	+
	3	MR	+	-	+	+	9	R	-	+	+	+
	4	S	-	+	-	+	10	S	-	+	-	+
	5	MS	+	-	+	+	11	R	+	-	+	+
	6	S	-	-	-	+						
КП 153/12	1	R	-	+	-	+	5	R	-	+	+	+
	2	R	-	+	+	+	6	S	+	-	-	+
	3	R	-	+	+	+	7	R	-	+	+	+
	4	R	-	+	+	+	8	R	-	+	+	+
СП 520/12	1	MS	-	-	+	-	4	R	-	+	+	-
	2	R	-	+	+	-	5	MS	-	-	+	-
	3	MS	-	-	+	-	6	R	-	+	+	-

Примітка: R — стійкі, MR — помірно стійкі, MS — помірно чутливі, S — чутливі.

Виходячи з цього, ми можемо припустити, що селекційний матеріал з комбінацією генів *Lr24+Lr34+Lr^{Amigo}*, *Lr21+Lr24+Lr34*, *Lr24+Lr^{Amigo}* та *Lr21+Lr24+Lr^{Amigo}* може мати ефективний і надійний рівень стійкості не тільки на Півдні України, а й у багатьох інших кліматичних зонах. Лінії з такою комбінацією генів є цінним вихідним матеріалом для селекції пшениці на стійкість до бурої іржі.

Висновки. Отже, в результаті досліджень доведена реальна ефективність використання молекулярних маркерів для маркування та картування нового гена стійкості до твердої сажки, перенесеного від

Ae. cylindrica в геномі пшениці, ідентифікації головних расоспецифічних та нерасоспецифічних генів стійкості до листової та стеблової іржі у сортах та лініях пшениці м'якої.

Проведеним скринінгом стійкості до листової іржі виявлені комбінації генів та зразки сортів і ліній — носіїв цих комбінацій, які варто використовувати у вітчизняній селекції при залученні стратегії MAS.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Волуевич Е. А. Генетические подходы в селекции мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине / Е. В. Волуевич // Молекулярная и прикладная генетика. — 2013. — Том 14. — С. 36–45.
2. Lillemo M. Multiple rust resistance and gene additivity in wheat: lessons from multi-location case studies in the cultivars Parula and Saar / M. Lillemo, R. P. Singh [et al.] // Global Rust Initiative Meeting, St. Paul. — 2011. — P. 111–120.
3. Kolmer J. A. Genetics of resistance to wheat leaf rust / J. A. Kolmer // Annu. Rev. Phytopathol. — 1996. — 34. — P. 435–455.
4. Штубей Т. Ю. Цитофизиологические аспекты возрастной устойчивости мягкой пшеницы к возбудителю бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss : автореф. дис. ... к. б. н. / Т. Ю. Штубей. — Москва, 2009. — 24 с.
5. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: науч.-метод. руководство. — К. : Аграр. наука, 1998. — 156 с.
6. Галаев А. В. Молекулярное картирование и маркирование гена устойчивости к твердой головне, перенесенного от *Aegilops cylindrica* в мягкую пшеницу / А. В. Галаев, Л. Т. Бабаянц, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2006. — Т. 40, № 2. — С. 3–11.
7. Gorash A. Leaf rust resistance of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) lines derived from interspecific crosses / A. Gorash, A. Galaev, O. Babayants, L. Babayants // Zemdirbyste-Agriculture. — 2014. — V. 101, No. 3. — P. 295–302.
8. Галаев О. В. Характеристика сортів пшениці м'якої української і російської селекції за алелями локусу *csLV34*, зчепленого з геном мультипатогенної стійкості *Lr34/Yr18/Pm38* / О. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Цитология и генетика. — 2015. — Т. 49, № 1. — С. 18–25.
9. Методы селекции и оценки устойчивости пшеницы и ячменя к болезням в странах-членах СЭВ. — Прага, 1988. — С. 178–188.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — М. : Колос, 1973. — 327 с.
11. Мутерко О. Ф. Можливість використання мікросателітних маркерів пшениці в ПЛР-аналізі геному *Aegilops cylindrica* Host / О. Ф. Мутерко, О. В. Галаев // Вісник ОНУ. — 2010. — Том 15, вип. 17. — С. 59–64.
12. Галаев О. В. Особливості змін геному *Triticum aestivum* внаслідок гібридизації з *Aegilops cylindrica* / О. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. — 2006. — Том. 4, № 1. — С. 31–39.
13. Галаев А. В. Контроль переноса генетического материала геномов С и D *Ae. cylindrica* в геномы А, В и D мягкой пшеницы / А. В. Галаев, Ю. М. Сиволап // Збірник наукових праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології». — Київ, 2007. — Том 2. — С. 251–255.
14. Галаев О. В. Маркери до інтрогресивних фрагментів геному *Aegilops cylindrica* та їх використання для поліпшення стійкості сортів пшениці м'якої

- до фітопатогенів / О. В. Галаєв, Л. Т. Бабаянц, Ю. М. Сиволап // Наукові праці південного філіалу «Сучасний стан та перспективи розвитку насінництва в Україні». — Сімферополь, 2008. — Випуск 107. — С. 132–135.
15. Gandhi H. Hybridization between wheat and jointed goatgrass (*Aegilops cylindrica*) under field conditions / H. Gandhi, C. A. Mallory-Smith, C. J. W. Watson [et al.] // *Weed Sci.* — 2006. — Vol. 54. — P. 1073–1079.
 16. Stam P. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap / P. Stam // *Plant Journal.* — 1993. — V. 3. — P. 739–744.
 17. Galaev A. V. DNA-markers for resistance to common bunt transferred from *Aegilops cylindrica* Host to hexaploid wheat / A. V. Galaev, L. T. Babayants, Yu. M. Sivolap // XVth Biennial Workshop on the Smut Fungi, Research Institute of Crop Production (June 11–14, 2006) Prague, Czech Republic. — 2006. — P. 30–32.
 18. Бабаянц О. В. Основы селекции и методология оценок устойчивости пшеницы к возбудителям болезней / О. В. Бабаянц, Л. Т. Бабаянц ; НААН, СГІ–НЦСС. — Одесса : БМБ, 2014. — 401.
 19. Weng Y. PCR-based markers for detection of different sources 1AL, 1RS and 1BL, 1RS wheat-rye translocations in wheat background / Y. Weng, P. Azhaguel, R. N. Devkota, J. C. Rudd // *Plant Breeding.* — 2007. — V. 126. — P. 482–486.
 20. Садовая А. С. Характеристика устойчивости к возбудителю бурой ржавчины сортов и линий мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих чужеродный генетический материал / А. С. Садовая, Е. И. Гульяева, О. П. Митрофанова [и др.] // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* — 2014. — Том 18, № 4/1. — С. 739–750.
 21. Caldwell R. M. Breeding for general and/or specific plant disease resistance / R. M. Caldwell // Finlay KW, Shepherd KW (eds) *Proc 3rd Int Wheat Genet Symp*, Australian Academy of Science, Canberra, Australia. — 1968. — P. 263–272.
 22. Rubiales D. Characterisation of *Lr34*, major gene conferring non-hypersensitive resistance to wheat leaf rust / D. Rubiales, R. E. Niks // *Plant Dis.* — 1995. — 94. — P. 1208–1212.
 23. Spielmeyer W. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat / W. Spielmeyer, R. A. McIntosh, J. Kolmer, E. S. Lagudah // *Theor. Appl. Genet.* — 2005. — 111. — P. 731–735.
 24. Lillemo M. The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar / M. Lillemo, B. Asalf, R. P. Singh, J. Huerta-Espino [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2008. — 116. — P. 1155–1166.
 25. Singh R. P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat / R. P. Singh // *Phytopathology.* — 1992. — V. 82. — P.835–838.
 26. Singh R. P. Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat /R. P. Singh // *Crop Sci.* — 1992. — 32. — P.874–878.
 27. Lagudah E. S. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat / E. S. Lagudah, H. McFadden, R. P. Singh [et al.] // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — V. 114. — P. 21–30.

28. Kolmer J. A. Inheritance of leaf rust resistance in the wheat cultivars AC Majestic, AC Splendor, and AC Karma / J. A. Kolmer, J. Q. Liu // *Can. J. Plant Pathol.* — 2002. — V. 24. — P. 327–331.
29. Бабаянц Л. Т. Расовый состав *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* в степи Украины и сортоустойчивость пшеницы / Л. Т. Бабаянц, О. В. Бабаянц, А. А. Васильев, В. А. Трасковецкая // Збірник наукових праць СГІ. — 2004. — Вип. 6 (46). — С. 279–288.
30. Marshall D. Virulence of *Puccinia recondita* in Texas from 1988 to 1990 / D. Marshall // *Plant Disease.* — 1992. — V. 76. — P. 296–299.
31. Kerber E. R. Leaf resistance gene *Lr34* associated with non suppression of stem rust resistance in the wheat cultivate Canthatch / E. R. Kerber, T. Aung // *Phytopathology.* — 1999. — V. 88. — P. 518–521.
32. Литвиненко М. А. Відділ селекції та насінництва пшениці в 100-річній історії інституту / М. А. Литвиненко // Збірник наукових праць СГІ–НЦНС. — 2012. — Вип.20 (60). — С. 11–27.
33. Huerta-Espino J. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* /
34. J. Huerta-Espino, R. P. Singh, S. German [et al.] // *Euphytica.* — 2011. — V. 179 (1). — P. 143–160.
35. Keller B. How has *Lr34/Yr18* conferred effective rust resistance in wheat for so long? / B. Keller, E. S. Lagudah, L. L. Selter [et al.] // *Borlaug Global Rust Initiative. Technical Workshop. Beijing, China, 2012.* — 2012. — P. 49–56.
36. Singh R. P. Race non-specific resistance to rust diseases in CIMMYT spring wheats / R. P. Singh, J. Huerta-Espino, S. Bhavani [et al.] // *Euphytica.* — 2011. — V. 179 (1). — P. 175–186.

Надійшла 10.09.2015.

UDC 577.21:575.113:632.4

Galaev O. V., Babayan L. T. Plant Breeding and Genetics Institute —
National Center of Seed and Cultivar Investigations

**MOLECULAR-GENETIC MARKERS FOR IDENTIFICATION OF GENES
RESISTANCE TO FUNGAL DISEASES OF BREAD WHEAT
(*Triticum aestivum* L.)**

Molecular-genetic markers was used for marking and mapping the new gene resistance to common bunt transferred from *Ae. cylindrica* into wheat genome, identification of the main raso-specific genes for resistance to leaf and stem rust in 80 varieties and 15 lines of bread wheat created 1991 in the PBGI-NCSCI, and identifying the gene multi pathogenic non race-specific resistance *Lr34/Yr18/Pm38* in wheat varieties Ukrainian and Russian breeding. Varieties and lines with genes *Lr21*, *Lr24 / Sr24*, *Lr26 / Sr31* (1BL.1RS), *Lr34 / Yr18 / Pm38* and *Lr^{Amigo} / Sr^{Amigo}* (1AL.1RS) individually or in combination were found. The combination of genes *Lr24+Lr34+T1AL.1RS*, *Lr24+Lr34+Lr21*, *T1AL.1RS+Lr24* and *Lr21+T1AL.1RS+Lr24* conferred resistance varieties and lines in South Ukraine are promising donors in Ukrainian breeding programs.

УДК 577.21:575.113:632.4

Галаев А. В., Бабаянц Л. Т.

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ГРИБКОВЫМ
ЗАБОЛЕВАНИЯМ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*Triticum aestivum* L.)**

Представлены результаты использования молекулярно-генетических маркеров для маркирования и картирования нового гена устойчивости к твердой головне, перенесенного из *Ae. cylindrica* в геном пшеницы, идентификации главных расоспецифических генов устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине в 80 сортах и 15 линиях пшеницы мягкой, созданные с 1991 года в СГИ–НЦСС, а также выявление гена мультипатогенной нерасоспецифической устойчивости *Lr34/Yr18/Pm38* в сортах пшеницы украинской и российской селекции. Выявлено наличие у изученных сортов и линий генов *Lr21*, *Lr24/Sr24*, *Lr26/Sr31* (1BL.1RS), *Lr34/Yr18/Pm38* и *Lr^{Amigo}/Sr^{Amigo}* (1AL.1RS) отдельно и в комбинациях. Показано, что сорта и линии с комбинацией генов *Lr24+Lr34+Lr^{Amigo}*, *Lr21+Lr24+Lr34*, *Lr24+Lr^{Amigo}* и *Lr21+Lr24+Lr^{Amigo}* обеспечивают эффективный и надежный уровень устойчивости на Юге Украины и могут использоваться в качестве доноров в селекционных программах Украины.