

Миков Дмитрий Сергеевич

**СЕЛЕКЦИОННО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ
МАТЕРИАЛОМ *AEGILOPS SPELTOIDES***

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство
сельскохозяйственных растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

**Краснодар
2020**

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Национальный центр зерна имени П.П. Лукьяненко» в 2016-2019 гг, а также в ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет»

Научный руководитель: Давоян Румик Оганесович,

доктор биологических наук, заведующий отделом биотехнологии ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П.П. Лукьяненко»

Официальные оппоненты: Гончаров Сергей Владимирович, доктор биологических наук, заведующий кафедры генетики, селекции и семеноводства ФГБОУ ВО «КубГАУ»

Астапчук Ирина Леонидовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научного центра садоводства, виноградарства, виноделия»

Ведущая организация – ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»

Защита диссертации состоится 27 октября 2020 г. в 10 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета Д 006.026.01 при ФГБНУ "Федеральный научный центр риса" по адресу: 350921, Россия, Краснодарский край, город Краснодар, поселок Белозерный, 3, Тел./факс: (861) 229-41-49

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» и на сайте - <http://www.vniirice.ru>

Объявление о защите и автореферат размещены на официальном сайте ВАК РФ -<http://www.vak.ed.gov.ru> и ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» – <http://www.vniirice.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Есаулова Л.В.

Актуальность. Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из самых широко возделываемых и важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Расширение ее генетического разнообразия на основе использования генофонда дикорастущих сородичей остается актуальной задачей.

Диплоидный вид *Aegilops speltoides* ($2n=14$, SS) генетически близок *T. aestivum* ($2n=42$, BBAADD) и содержит геном S, который гомеологичен геному В. Для облегчения передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу под руководством Жирова Е.Г. в 1980-х годах в лаборатории цитогенетики КНИИСХ (сейчас НЦЗ им. П.П. Лукьяненко) была получена геномно-добавленная форма Авродес (BBAASS). От скрещивания Авродес/Аврора были получены интрогрессивные линии озимой мягкой пшеницы. Они отличались высокой устойчивостью к различным болезням, в том числе к бурой ржавчине, а также высоким содержанием белка (Давоян, 2006).

Для вовлечения интрогрессивных линий в селекционный процесс линии должны быть цитологически стабильными и иметь определенный набор хозяйственно-ценных признаков. Также большое значение имеет форма, в которой представлен генетический материал *Ae. speltoides* в геноме мягкой пшеницы.

Получение и изучение интрогрессивных линий с новым генетическим материалом от *Ae. speltoides* позволяет решать проблему расширения генетического разнообразия сортов мягкой пшеницы, тем самым способствуя успешному развитию ее селекции.

Цель и задачи исследования. Целью исследования являлось селекционно-генетическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

В связи с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Провести оценку интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* на устойчивость к болезням;
2. С помощью гибридологического анализа установить природу устойчивости интрогрессивных линий к бурой ржавчине;
3. Использовать ДНК-маркеры для идентификации генов устойчивости к

бурой ржавчине в образцах *Ae. speltoides*, синтетической формы Авродес и интрогрессивных линиях, полученных на их основе;

4. Провести хозяйственно-биологическую оценку отобранных перспективных интрогрессивных линий;

5. Установить форму передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в интрогрессивные линии мягкой пшеницы с использованием цитологических методов.

Объектами исследований являлись интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*, синтетическая форма Авродес, образцы *Ae. speltoides*, сорта мягкой пшеницы Аврора и Краснодарская 99.

Научная новизна. Впервые изучены 39 новых интрогрессивных линий, полученных на основе синтетической формы Авродес, по устойчивости к бурой ржавчине, желтой ржавчине и мучнистой росе. Выявлено 16 линий, устойчивых к трем болезням, 15 – к двум, 7 – к одной.

Проведен анализ интрогрессивных линий на наличие генов устойчивости к бурой ржавчине (*Lr*-генов), источниками которых могли быть виды *Ae. speltoides*, *T. aestivum* и *Secale cereale*. В 17 линиях был идентифицирован ген *Lr34*, в 20 линиях обнаружен ген *Lr26*. Комбинация генов *Lr26+Lr34* выявлена в 10 линиях. Гетерозиготное состояние гена *Lr34* идентифицировано в линии 4849. Ни одного известного гена устойчивости к бурой ржавчине, источником которого является *Ae. speltoides*, не было обнаружено в интрогрессивных линиях.

Изучены показатели продуктивности и технологических свойств зерна. Линии 4915 и 5041 являются наиболее перспективными для использования в селекции, так как сочетают в себе высокую продуктивность, высокое содержание белка, клейковины и хорошую хлебопекарную оценку, а также устойчивость к комплексу болезней.

Цитологический анализ линий 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053 установил наличие в них двух новых, ещё не описанных в литературе, транслокаций от *Ae. speltoides*. В линиях 4909, 4915 и 5041 идентифицирована транслокация T5BS.5BL-5SL, а в линиях 5047 и 5053 – T2DL.2DS-2SS. Также в линии 5047 установлено замещение хромосомы 5В хромосомой 5S.

Теоретическая значимость работы. Полученные результаты свидетельствуют об эффективности использования синтетической формы Авродес для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы за счет генетического материала *Ae. speltoides*.

Практическая значимость работы. Отобрано 16 интрогрессивных линий в качестве доноров групповой устойчивости к мучнистой росе, желтой и бурой ржавчинам.

Линия 5047 с замещенной хромосомой 5D на 5S может быть использована для получения новых транслокаций от *Ae. speltoides*.

Линии с новыми транслокациями от *Ae. speltoides* 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053, которые сочетают устойчивость к комплексу болезней, высокое содержание белка и клейковины, рекомендуются для включения в селекционные программы в качестве исходного материала.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты оценки устойчивости к бурой, жёлтой ржавчине и мучнистой росе;
2. Генетический анализ устойчивости к бурой ржавчине в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы;
3. Результаты изучения линий по показателям продуктивности и технологическим свойствам зерна;
4. Анализ перспективных интрогрессивных линий с помощью цитологических методов.

Апробация работы. Исследования проводились в рамках работ ФГБНУ «НЦЗ им. П.П. Лукьяненко» по темам: 1. Создать новые синтетические формы, интрогрессивные линии мягкой пшеницы с ценными признаками диких сородичей с использованием методов геномной и хромосомной инженерии. 2. Использовать методы молекулярно-генетического маркирования для исследования и селекции зерновых культур.

Результаты работ были представлены на различных всероссийских и международных конференциях и конференциях молодых учёных: 9-я

Международная научно-практическая конференция «Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем» с молодежной стратегической сессией «Кадры, ресурсы, возможности, инновации» (20-22 сентября 2016 г., ВНИИБЗР, г. Краснодар); 17-я и 18-я научная конференция молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (7 апреля 2017 г.; 19 апреля 2018 г., ВНИИСБ, г. Москва); Международный конгресс «VII съезд вавилонского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СпбГУ и ассоциированные симпозиумы» (18-22 июня 2019 г., Санкт-Петербург, Россия); The Fifth International Scientific Conference PlantGen2019 plant genetics, genomics, bioinformatics, and biotechnology (24-29 июня 2019, Новосибирск), IV международная научно-практическая конференция «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки» (9-13 сентября 2019 г., Ялта).

Публикация результатов работы. Материалы исследований представлены в 20 публикациях, среди которых 5 входят в рецензируемые издания ВАК (в том числе 4 – в системы SCOPUS и Web of Science).

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 109 страницах машинописного текста, состоит из введения, 5 глав, заключения, предложений для селекционной практики, списка литературы, содержит 22 таблицы и 17 рисунков. Список литературы содержит 191 источник, из них – 62 отечественных и 129 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. УЛУЧШЕНИЕ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*) С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА *AEGILOPS SPELTOIDES*

В главе представлен анализ научной литературы, в которой описывается возможность использования вида *Ae. speltoides* в качестве источника ценных хозяйственных признаков, способы передачи генетического материала в мягкую пшеницу и его идентификации в геноме мягкой пшеницы.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена в отделе биотехнологии ФГБНУ «Национального центра зерна им. П.П. Лукьяненко» в 2016–2019 годах.

Объект исследования – 10 образцов *Ae. speltoides*, 39 интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* из коллекции отдела биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, сорта Аврора и Краснодарская 99. Линии получены путём беккроссирования гибридов F₁ Авродес/Аврора сортами Аврора и Безостая 1.

Посев производился на опытном участке отдела биотехнологии с помощью селекционной шестирядной сеялки, размер делянки составлял 1x1,30 метра. Уборка опытных делянок для подсчёта показателей продуктивности проводилась вручную с помощью рамки, площадью 1 м². Предшественником по всем полевым опытам являлся черный пар. Содержание гумуса в пахотном слое 3,2-3,6%. Среднегодовая температура в 2017-2018 годах составляла +14,3 °С, среднегодовое количество осадков – 627,1 мм.

Тип реакции поражения бурой ржавчиной определяли на искусственном инфекционном фоне с помощью шкалы Майнса и Джексона с модификациями (Давоян, 2006). Устойчивость линий к жёлтой ржавчине определяли по международной шкале Гаснера и Штрайба с модификациями (Gassner G., Straib W., 1932) на естественном инфекционном фоне. К устойчивым к бурой и желтой ржавчинам относили растения с типами реакции 0, 01, 1 и 2, к восприимчивым – 3 и 4. Для анализа растений по устойчивости к мучнистой росе применялась шкала Гешеле (Гешеле Э.Э., 1978). Устойчивыми являлись растения со степенью поражения до 20%.

Гибридологический анализ проводился на взрослых растениях. Семена гибридных растений F₂ высевались вручную в делянки из 6 рядков, по 20-30 зерновок в каждом. Каждый третий рядок засевался восприимчивым к бурой ржавчине сортом Аврора.

Выделение геномной ДНК проводилось с помощью коммерческих наборов

ДНК-Экстран-3, производства компании «Синтол». Каждый образец представлял собой смесь ДНК, выделенную из нарезки молодых зеленых листьев растений, весом 15-20 мг.

Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовался для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*. Данные о маркерах к искомым генам, а также праймерах и их последовательности отбирали с помощью литературных данных.

Все вычисления выполнялись с использованием программ STATISTICA и MsExcel.

Число хромосом в соматических клетках определяли на временных давленных препаратах кончиков первичных корешков. Препараты готовились по методу Ванинге (Waninge J.A., 1965).

Конъюгация хромосом в процессе мейоза изучалась в материнских клетках пыльцы (МКП). Для этого использовались временные и постоянные давленные препараты пыльников.

Дифференциальная окраска хромосом проводилась в Институте общей генетики им. Н.И. Вавилова. Методика окрашивания и последующей идентификации хромосом подробно описана в работе Бадаевой Е.Д. (Badaeva E.D. et al., 1994).

Флуоресцентная *in situ* гибридизация (FISH) проводилась в Институте цитологии и генетики СО РАН. В ходе работы использовались зонды pSc119.2 и pAs1 для идентификации хромосом, сам метод описан в работе Салиной Е.А. (Salina E.A. et al., 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 3. АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ *AEGILOPS SPELTOIDES*

Вид *Aegilops speltoides* может служить источником не только устойчивости к болезням, но также и высокого содержания белка и клейковины (Богуславский Р.Л.,

Голик О.В., 2004). Для передачи генетического материала в сорта-реципиенты использовалась синтетическая форма Авродес, которая является амфидиплоидом с геномной формулой ВВААSS, где D геном мягкой пшеницы замещен геном S от *Ae. speltoides*.

3.1 Оценка устойчивости к болезням

По результатам полевой оценки 18 интрогрессивных линий показали себя высокоустойчивыми с типом реакции 01. Оценку 1 получили пять линий. Две линии 4866 и 5053 проявили умеренную устойчивость к патогену (тип реакции – 2). Умеренно восприимчивыми к бурой ржавчине оказались образцы под номерами 4845, 4847, 4865, 4877, 4892, 4894, 4895, 4896 и 4903 (тип реакции – 3). К линиям с высокой восприимчивостью, на уровне сорта реципиента Аврора (тип реакции 4), относятся 4855, 4885, 4891, 4893, 4904.

Высокоустойчивыми к желтой ржавчине оказались 20 интрогрессивных линий, получивших оценку 01. К устойчивым (тип реакции 1) относятся линии 4845, 4859, 4885, 4887, 4893, 4894, 4906, 4908, 4915, 5041 и 5047. Умеренную устойчивость к патогену проявили линии 4849, 4856, 4892, 4897, 4903 и 5053. Сильное поражение жёлтой ржавчиной имели линии 4855 и 4877.

Тридцать одна интрогрессивная линия мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* имела степень поражения мучнистой росой не выше 20%, что означает наличие устойчивости к болезни. Остальные линии имели степень поражения до 35%.

Особый интерес представляют образцы, имеющие устойчивость к комплексу болезней. Соотношение устойчивых интрогрессивных линий к разным болезням представлена на рисунке 1. Высокой устойчивостью сразу к трем заболеваниям обладают 16 интрогрессивных линий, что составляет 42% от общего числа линий. Тридцать девять процентов образцов поражались одной из болезней и были устойчивы к двум другим. Резистентность к одной из болезней имели 7 линий, что составило 19%. Одна линия оказалась восприимчивой к трём болезням.

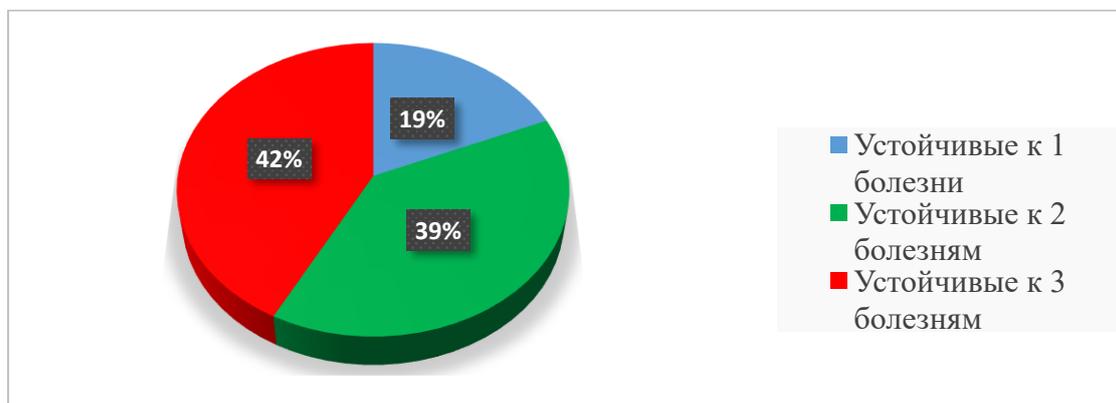


Рисунок 1 – соотношение интрогрессивных линий по устойчивости к одной, двум и трем болезням.

3.2 Гибридологический анализ устойчивости к бурой ржавчине

Для гибридологического анализа использовались линии 4909, 4915 и 5053, выбор которых обусловлен их различным типом реакции на поражение бурой ржавчиной. Все линии были скрещены с сортом Краснодарская 99 (Кр99), так как он является одним из наиболее цитологически стабильных и сильно поражается бурой ржавчиной. Все гибридные растения F_1 в комбинациях 4909/Кр99, 4915/Кр99 и 5053/Кр99 оказались устойчивыми к болезни, что свидетельствует о доминантном типе наследования признака. Задачей следующего этапа работы было определение количества генов, контролирующей устойчивость, поэтому путем самоопыления из каждой комбинации гибридов F_1 были получены растения F_2 . Распределение устойчивых и восприимчивых к бурой ржавчине растений приведено в таблице 1. Во всех комбинациях расщепление устойчивых и восприимчивых растений соответствовало теоретическому 3:1, что свидетельствует о наличии одного доминантного гена устойчивости к бурой ржавчине у трёх анализируемых линий.

Таблица 1 – Соотношение устойчивых и восприимчивых растений F_2 в комбинациях 4909/Кр99, 4915/Кр99 и 5053/Кр99

Комбинация скрещивания	Всего растений	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		χ^2	P
		Эмпирическое	Теоретическое		
4909/Кр99	186	143:43	139,5:46,5	0,35	0,75-0,50
4915/Кр99	217	165:52	162,75:54,25	0,12	0,75-0,50
5053/Кр99	194	149:45	145,5:48,5	0,34	0,75-0,50

После установления типа наследования и количества генов устойчивости к бурой ржавчине было необходимо выяснить их различие или идентичность. Для этого линии скрещивались между собой в виде комбинаций 4909/4915, 4909/5053 и 4915/5053. Анализ соотношения устойчивых и восприимчивых растений проводили в F₂ с помощью вычисления значения χ^2 , результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Соотношение устойчивых и восприимчивых гибридов F₂ в комбинациях 4909/4915, 4909/5053 и 4915/5053

Комбинация скрещивания	Всего растений	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		χ^2	P
		Эмпирическое	Теоретическое		
4909/4915	212	212:0			
4909/5053	198	187:11	185,63:12,37	0,16	0,75-0,50
4915/5053	203	192:11	190,31:12,69	0,23	0,75-0,50

Все растения F₂ в комбинации 4909/4915 были устойчивыми к бурой ржавчине, что означает идентичность генов в двух линиях. В комбинациях 4909/5053 и 4915/5053 соотношение устойчивых и восприимчивых растений соответствовало теоретическому 15:1. Это свидетельствует о том, что ген, обуславливающий устойчивость к бурой ржавчине в линии 5053, отличается от гена устойчивости в линиях 4909 и 4915.

Для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине были отобраны две линии: 4909 и 5053, обе линии были скрещены с тестерными линиями, в которых присутствуют гены *Lr28* и *Lr35*. В ходе работы были получены популяции растений F₂ от комбинаций 4909/*Lr28*, 4909/*Lr35*, 5053/*Lr28* и 5053/*Lr35*. Во всех комбинациях расщепление гибридов по устойчивости к бурой ржавчине соответствовало теоретически ожидаемому 15:1, что свидетельствует об отличии генов устойчивости к болезням в анализируемых линиях от *Lr28* и *Lr35*.

3.3 Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* с помощью ДНК-маркеров

В ходе исследования проводился скрининг образцов *Ae. speltoides*, синтетической формы Авродес и интрогрессивных линий мягкой пшеницы с

генетическим материалом *Ae. speltoides* на наличие генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr10*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66*. Выбор генов для анализа обусловлен родословной образцов.

Ген *Lr47* обнаружен лишь в образце *Ae. speltoides* №3256, ген *Lr66* – в образцах *Ae. speltoides* C4, C5, 2036, 2280, 2716, 3256. Во всех проанализированных образцах *Ae. speltoides*, а также в синтетической форме Авродес идентифицированы гены *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* (рисунок 2). Однако ни в одной из интрогрессивных линий мягкой пшеницы эти гены не были выявлены. Таким образом, в анализируемых линиях устойчивость к бурой ржавчине контролируется другими, отличными от известных, генами устойчивости.

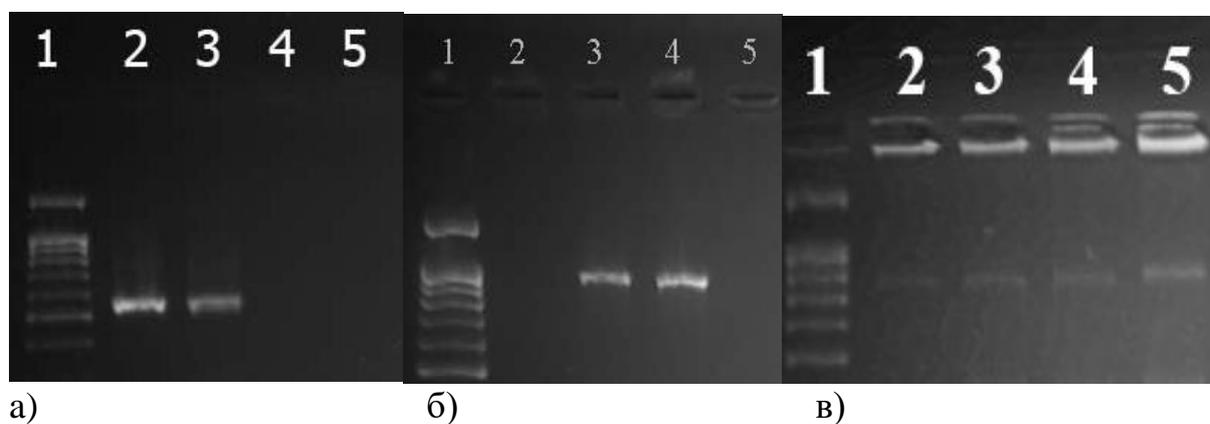


Рисунок 2 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации в 2% агарозном геле: а) к маркеру гена *Lr28*: 1 – маркер молекулярного веса, 2 – образец *Ae. speltoides* C5; 3 – Авродес; 4 – сорт Аврора; 5 – линия 4915; б) к маркеру гена *Lr35*: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – сорт Аврора; 3- образец *Ae. speltoides* C5; 4 – Авродес; 5 – линия 4915; в) к маркеру гена *Lr51* 1 – маркер молекулярного веса; 2 – сорт Аврора; 3 – сорт Гром; 4 – линия 4915; 5 – Авродес.

Гены *Lr25*, источником которого является вид *Secale cereale*, и *Lr10* не были идентифицированы в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы с генетическим материалом с помощью ПЦР.

Анализ на присутствие ДНК-маркеров, сцепленных с генами *Lr34* и *Lr26* показал их наличие в 17 и 20 линиях соответственно (рисунок 3). Несмотря на то, что данные гены не являются эффективными, они могут использоваться в комбинации с другими генами для получения устойчивых к бурой ржавчине форм.

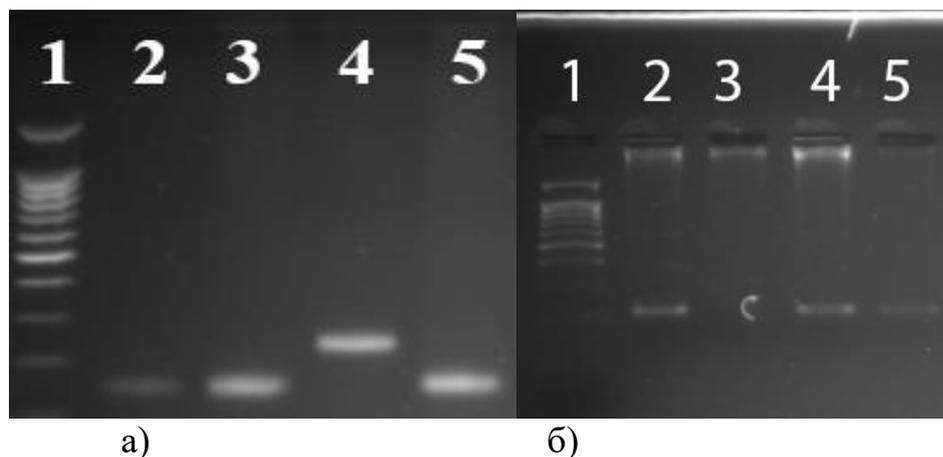


Рисунок 3 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации в 2% агарозном геле: а) к маркеру гена *Lr34*: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – положительный контроль; 3-5 – интрогрессивные линии; б) к маркеру гена *Lr26*: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – сорт Аврора; 3-5 – интрогрессивные линии.

Было выделено несколько линий, которые имеют комбинацию из двух генов: *Lr34 + Lr26* (таблица 3). Однако линии 4894 и 4895 поражаются бурой ржавчиной, несмотря на наличии такой пирамиды генов. Возможно, комбинация *Lr34+Lr26* не является эффективной в условиях Краснодарского края, но этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Таблица 3 – Линии с идентифицированными генами устойчивости к бурой ржавчине и их полевая устойчивость

Ген, комбинация генов	Тип реакции, балл	Линии
<i>Lr26</i>	01	4849, 4856, 5047
	1	4887, 4908
	2	5053
	3	4877, 4892, 4903
	4	4885
<i>Lr34</i>	01	4839, 4889
	3	4865
	4	4855, 4858, 4891, 4904
<i>Lr26+Lr34</i>	01	4843, 4873, 4875, 4879, 4897, 4906, 4915, 5041
	3	4894, 4895

ГЛАВА 4. ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ

4.1 Оценка интрогрессивных линий мягкой пшеницы по компонентам продуктивности

Оценка линий по комплексу признаков продуктивности проводилась в течении двух лет (2017 и 2018 гг.). Характер генотипических различий устанавливался путем сравнения средних признаков с вычислением наименьшей существенной разности ($НСР_{05}$).

Наибольший интерес для практического использования полученных линий представляет их продуктивность. В таблице 4 представлены значения таких признаков, как масса зерна с колоса, масса 1000 зёрен, масса зерна с 1 м^2 и число продуктивных колосьев с 1 м^2 , которые являются основными компонентами урожайности.

Таблица 4 – Характеристика интрогрессивных линий мягкой пшеницы по показателям продуктивности, 2017-2018 гг

Линия	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зёрен, г	Масса зерна с 1 м^2 , г	Число продуктивных колосьев с 1 м^2 , шт
4849	2,09	46,86	406,00	205,16
4867	1,35	35,00	339,38	248,14
4879	1,45	31,60	467,50	351,29
4897	2,40	45,45	453,38	211,92
4909	2,03	42,09	670,88	345,95
4915	2,12	40,77	775,00	383,52
5041	2,29	41,47	746,88	352,78
5047	2,17	41,41	694,38	315,78
5053	1,83	37,39	610,63	342,37
Аврора (ст)	1,40	35,26	333,13	250,90
Кр99 (ст)	1,77	43,35	794,38	455,81
$НСР_{05}$	0,5	3,46	19,6	59,9

У шести интрогрессивных линий среднее значение массы зерна с колоса было выше, чем у сорта-реципиента Аврора, линии 4897 и 5041 превысили показатель стандартного сорта Краснодарская 99. В ходе анализа средних значений признака массы тысячи зёрен выделяется линия 4849, превысившая показатель стандартов.

Наивысшим показателем признака масса зерна с 1 м² обладает линия 4915, который соответствует стандартному сорту Краснодарская 99. Сравнивая средние значения такого важного показателя урожайности как количество продуктивных колосьев на 1 м², выделяются линии 4879, 4909, 4915, 5041, 5047, 5053, значения которых превышают таковой у сорта-реципиента Аврора. Наивысшим показателем признака обладает стандартный сорт Краснодарская 99 со значением 455,81.

Для отбора лучших линий была доказана корреляция между признаками, проведён дискриминантный анализ, в результате были выбраны две дискриминантные функции, что позволило разделить линии по группам. Для выбора лучших линий была создана селекционная модель, которую ввели в пространство дискриминантных функций. Конечным этапом статистической обработки данных стал кластерный анализ, который позволил оценить степень близости анализируемых генотипов к селекционной модели (рисунок 4).

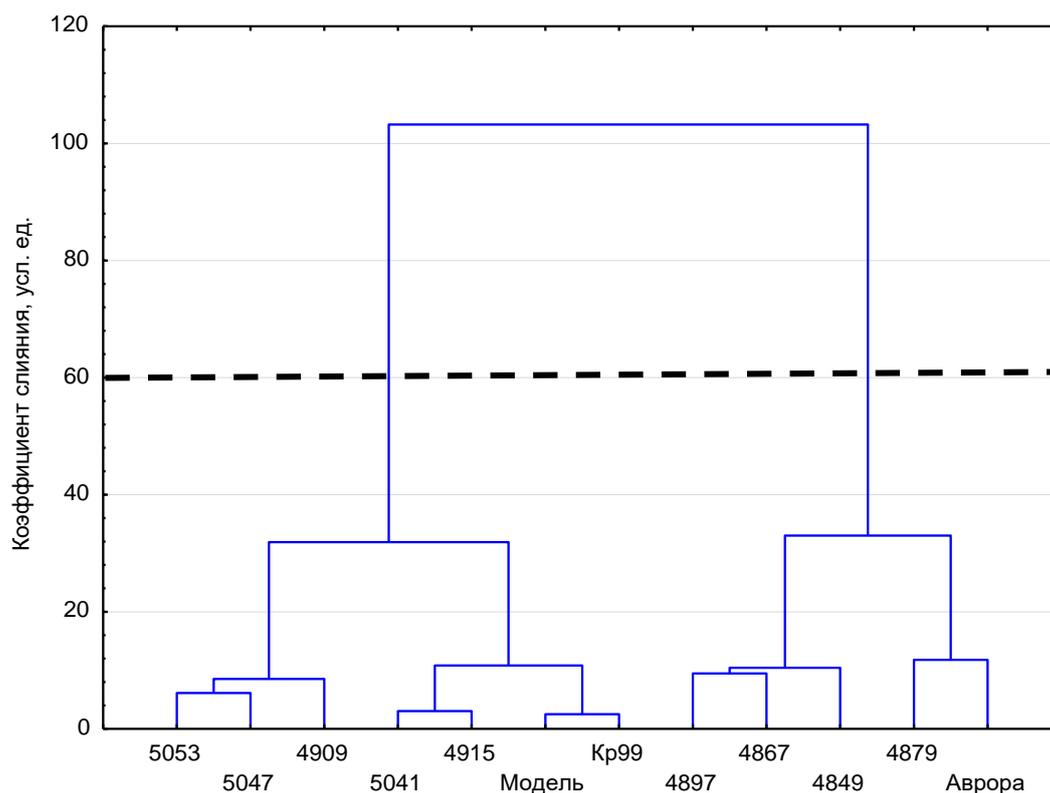


Рисунок 4 – Дендрограмма кластерного анализа групповых генотипов и точки селекционной модели в пространстве дискриминантных функций

При уровне разрезания в 60 усл. ед. выделяется два кластера. В первый из них вошли линии 5053, 5047, 4909, 5041, 4915, сорт Краснодарская 99 и селекционная

модель. Во второй кластер включены линии 4897, 4867, 4849, 4879 и сорт Аврора.

Таким образом, в результате анализа комплекса признаков продуктивности к перспективным следует отнести линии 5053, 5047, 4909, 5041 и 4915.

4.2 Оценка линий по содержанию белка, клейковины и хлебопекарным качествам

Пять наиболее перспективных линий с генетическим материалом *Ae. speltoides* урожая 2018 года оценивались по содержанию белка и клейковины (таблица 5).

Таблица 5 – Содержание белка и клейковины в интрогрессивных линиях, 2018 г

Линия	Содержание белка, %	Содержание клейковины, %	ИДК
4909	16,7	34,2	75
4915	17,1	35,7	84
5041	16,0	32,5	79
5047	15,3	29,5	87
5053	17,2	34,6	85
Аврора	14,0	28,2	75

По результатам анализа все проанализированные линии превышали сорт Аврора по содержанию белка и клейковины. Только линия 4909 имеет показатель ИДК на уровне сорта-реципиента. Результаты оценки линий по хлебопекарным качествам представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Хлебопекарная оценка интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*, 2018 г

Линия	Объемный выход, см ³	Распльвчатость, балл	Форма хлеба, балл	Цвет мякиша, балл	Эластичность, балл	Пористость, балл	Общая хлебопекарная оценка, балл
4909	730	5,0	4,0	5,0	3,5	2,5	4,2
4915	750	5,0	5,0	5,0	3,5	2,5	4,3
5041	800	5,0	5,0	5,0	4,0	3,0	4,5
5047	750	5,0	3,3	5,0	3,5	2,5	4,0
5053	780	5,0	4,2	4,5	4,0	2,0	4,1
Аврора	650	5,0	4,3	5,0	3,5	3,5	4,4

Все анализируемые линии превысили стандарт по объемному выходу хлеба, но имели меньшую пористость. Наивысшую общую хлебопекарную оценку 4,5 балла имеет линия 5041. Хлеб, испеченный из муки сорта Аврора, получил оценку в 4,4 балла. Остальные линии имели общую оценку от 4,0 до 4,3 баллов.

ГЛАВА 5. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ

Девять интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* были отобраны для проведения цитологического анализа. На первом этапе проводилось изучение конъюгации хромосом в метафазе I мейоза для установления цитологической стабильности линий. Общее число просмотренных клеток на каждую линию варьировало от 218 до 235, их характеристика приведена в таблице 7.

Таблица 7 – Цитологическая характеристика интрогрессивных линий с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Линия	Число растений	Число хромосом	Число просмотренных клеток	Ассоциация хромосом в МI мейоза, число клеток в%			
				21 ^{II} , %	20 ^{II} +2 ^I , %	>2 ^I	Мультивалентности, %
4849	4	42	225	92,44	5,33	-	2,23
4867	4	42	226	94,91	4,65	-	0,44
4879	4	42	218	92,66	6,88	-	0,46
4897	4	42	222	94,36	5,19	-	0,45
4909	4	42	234	94,44	3,42	-	2,14
4915	4	42	229	96,07	3,49	-	0,44
5041	4	42	219	94,97	4,57	-	0,46
5047	4	42	235	96,60	2,98	-	0,42
5053	4	42	230	96,52	3,04	-	0,44
Кр99	4	42	228	97,48	2,48	-	0,04

Линии, с количеством клеток, имеющих бивалентную конфигурацию хромосом (21^{II}), превышающим 90%, считались цитологически стабильными. Анализ конъюгации хромосом в метафазе I мейоза в материнских клетках пыльцы изучаемых линий показал, что большинство из них образуют 21 бивалент (выше 90% в каждой

линии), что свидетельствует об их цитологической стабильности.

Для определения формы передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу, отобранные линии были скрещены с сортом Краснодарская 99. Мейоз полученных в результате скрещивания гибридов F₁ был проанализирован на ассоциации хромосом и количество унивалентов, бивалентов и мультивалентов (таблица 8).

Таблица 8 – Цитологическая характеристика гибридов F₁ от скрещивания интрогрессивных линий мягкой пшеницы с сортом Краснодарская 99

Гибриды с линиями и родительскими формами	Просмотрено клеток	21 ^{II} , %	20 ^{II} +2 ^I , %	Клетки с унивалентами, отличными от 2 ^I , %	Клетки с мультивалентами, %
4849	201	81,09	10,45	5,47	2,99
4867	220	81,36	10,45	4,55	3,64
4879	198	79,80	11,11	6,06	3,03
4897	208	82,21	9,62	5,29	2,88
4909	199	79,40	12,56	4,02	4,02
4915	209	79,90	13,40	3,83	2,87
5041	207	76,81	14,49	5,80	2,90
5047	204	27,45	63,24	5,39	3,92
5053	205	78,54	12,68	5,37	3,41
Аврора	208	82,69	9,13	4,81	3,37

В большинстве клеток гибридов F₁ комбинаций линия/Краснодарская99 преобладала ассоциация хромосом 21^{II} (выше 70%), что свидетельствует о передаче генетического материала от *Ae. speltoides* в виде транслокации. Однако у гибрида F₁ от комбинации 5047/Кр99 преобладает ассоциация хромосом 20^{II}+2^I, что свидетельствует о наличии хромосомного замещения.

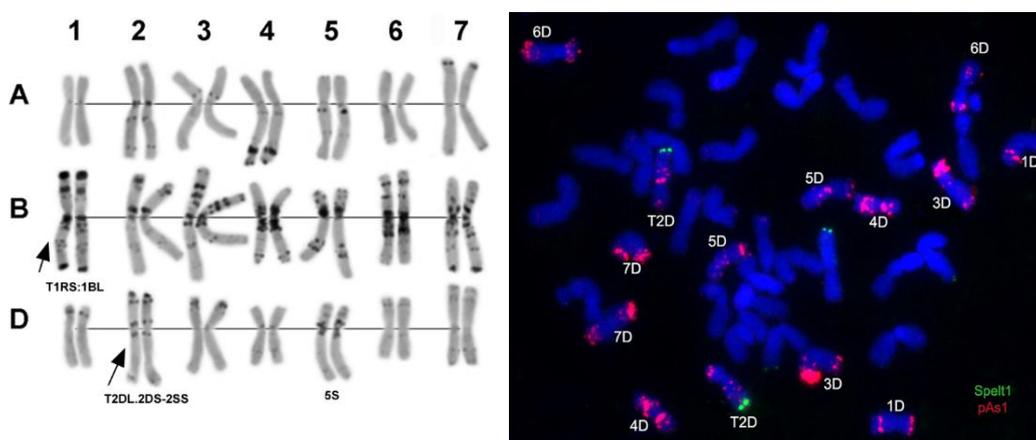
Для более точной идентификации генетического материала *Ae. speltoides* в изучаемых линиях были использованы методы дифференциального окрашивания хромосом (С-окрашивания) и использования FISH с зондами pAs1 и spelt1.

Всего для анализа было отобрано 5 линий: 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053. Выбор линий обусловлен их цитологическими особенностями, а также хорошей хозяйственно-биологической оценкой. Результаты анализа представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Интрогрессивные линии с идентифицированными транслокациями

Линия	Источник	Транслокация	Замещение
4909	<i>Ae. speltooides</i>	T5BS.5BL-5SL	
4915	<i>Ae. speltooides</i>	T1RS.1BL, T5BS.5BL-5SL	
5041	<i>Ae. speltooides</i>	T1RS.1BL, T5BS.5BL-5SL	
5047	<i>Ae. speltooides</i>	T1RS.1BL T2DL.2DS-2SS	5S – 5D
5053	<i>Ae. speltooides</i>	T1RS.1BL T2DL.2DS-2SS	

На рисунке 5 представлены пластины дифференциальной окраски хромосом линии 5047, где указаны чужеродные транслокации T1RS.1BL и T2DL.2DS-2SS и хромосомное замещение 5S – 5D, и флуоресцентной гибридизации *in situ* линии 5053, на которой видна транслокация от *Ae. speltooides* на хромосоме 2D (выделена зеленым цветом).



а)

б)

Рисунок 5 – а). Дифференциальная окраска хромосом линии 5047.

б) Окраска хромосом линии 5053 методом FISH

Транслокации с генетическим материалом *Ae. speltooides* в линиях 4909, 4915 и 5041 выявлены на 5В хромосоме пшеницы, а в линиях 5047 и 5053 – на хромосоме 2D. Также стоит отметить замещение 5D хромосомы у линии 5047 на гомеологичную от вида *Ae. speltooides*. В литературе не встречается описание получения и использования таких транслокаций в селекционном процессе, поэтому они

представляют большую теоретическую ценность и требуют дальнейшего их изучения. Также в линиях 4915, 5041, 5047 и 5053 установлено наличие транслокации 1RS.1BL, переданной от сорта Аврора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Проведена оценка устойчивости интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы Авродес, по устойчивости к бурой, желтой ржавчинам и мучнистой росе. Выявлено 16 линий, устойчивых к трем болезням, 15 – к двум, 7 – к одной.

2. Гибридологическим анализом установлено, что устойчивость к бурой ржавчине у линий 4909, 4915 и 5053 контролируется одним доминантным геном. Установлена идентичность генов устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909 и 4915 и различие с геном, контролирующим устойчивость у линии 5053. Гены устойчивости в линиях отличаются от генов *Lr28* и *Lr35*.

3. Проведен анализ с использованием ПЦР 10 образцов *Ae. speltoides*, синтетической формы Авродес и 39 интрогрессивных линий, полученных на его основе на наличие генов устойчивости к бурой ржавчине. Ген *Lr47* выявлен в образце *Ae. speltoides* 3256, ген *Lr66* идентифицирован в 10 образцах *Ae. speltoides*; гены *Lr28*, *Lr35* и *Lr51* обнаружены в 10 образцах *Ae. speltoides* и синтетической форме Авродес. Ген *Lr34* идентифицирован в 17 линиях, ген *Lr26* – в 20 линиях, комбинации генов *Lr26+Lr34* – в 10 линиях. В устойчивых линиях возможно наличие генов устойчивости к бурой ржавчине, отличных от *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*.

4. Отобраны линии 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053 с показателями продуктивности, превышающими эти показатели у сорта-реципиента Аврора. Наивысшие показатели содержания белка (17,1% и 17,2 %) и клейковины (34,6% и 35,7%) установлены в линиях 4915 и 5053 соответственно. Лучшей хлебопекарной оценкой обладают линии 5041 и 4915 (4,5 и 4,3 балла соответственно).

5. Линии 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053 являются цитологически стабильными. С помощью анализа мейоза было установлено, что во всех линиях

присутствуют транслокации. В линии 5047 было обнаружено замещение хромосомы 5D хромосомой 5S от *Ae. speltoides*. Результаты подтверждены методами дифференциальной окраски хромосом и флуоресцентной окраски хромосом (FISH). Выявлены новые, ранее не описанные, транслокации от *Ae. speltoides*: в линиях 4909, 4915 и 5041 – T5BS.5BL-5SL, в линиях 5047 и 5053 – T2DL.2DS-2SS. В линиях 4915, 5041, 5047 и 5053 была обнаружена транслокация 1RS.1BL, полученная от сорта Аврора.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ СЕЛЕКЦИОННОЙ ПРАКТИКЕ

1. Рекомендуется использовать линии 4839, 4841, 4843, 4844, 4859, 4861, 4863, 4887, 4889, 4897, 4906 и 4908 в качестве доноров устойчивости к комплексу болезней: бурая ржавчина, жёлтая ржавчина, мучнистая роса.

2. Для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы рекомендуется использовать линии с новыми транслокациями от *Ae. speltoides* 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053, отличающиеся устойчивостью к комплексу болезней, высоким содержанием белка и клейковины.

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Давоян, Э.Р., Использование молекулярных маркеров в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков, В.А. Филобок, Ж.Н. Худокормова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – № 4-1. – С. 732-738. (входит в SCOPUS и Web Of Science)

2. Davoyan, E.R. Use of molecular markers in wheat breeding for resistance to leaf rust at the Lukyanenko research institute of agriculture / E.R. Davoyan, L.A. Bepalova, R.O. Davoyan, Yu.S. Zubanova, D.S. Mikov, V.A. Filobok, Zh. N. Khudokormova // Russian Journal of Genetics: Applied Research. – 2015. – V. 5. – No. 3. – P. 227-232. (входит в SCOPUS и Web Of Science)

3. Давоян, Э.Р. Изучение аллельных вариантов генов короткостебельности у интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом от *Triticum*

miguschovae и Авродес / Э.Р. Давоян, Р.О. Давоян, **Д.С. Миков**, Ю.С. Зубанова, Г.И. Карлов, М.Г. Дивашук, А.А. Кочешкова, А.Г. Черноок // Рисоводство. – 2017. – № 4 (37). – С. 11-16.

4. Давоян, Р.О. Использование синтетической формы авродес для передачи устойчивости к листовой ржавчине от *Aegilops speltoides* мягкой пшенице / Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, **Д.С. Миков**, Е.Д. Бадаева, И.Г. Адонина, Е.А. Салина, А.С. Зинченко, Ю.С. Зубанова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – № 6. – С. 663-670. (входит в SCOPUS и Web Of Science)

5. Давоян, Р.О. Создание и изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе синтетической формы RS7 / Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, **Д.С. Миков**, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, Е.Д. Бадаева, И.Г. Адонина, Е.А. Салина, А.Н. Зинченко // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – № 7. – С. 827-835. (входит в SCOPUS и Web Of Science)

Статьи в аналитических сборниках и материалах конференций

6. Давоян, Э.Р. Использование молекулярных маркеров в селекции пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине в краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Ю.С. Зубанова, **Д.С. Миков** // В сборнике: Биотехнология: состояние и перспективы развития материалы VIII Московского Международного Конгресса. ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2015. – С. 55-56.

7. **Миков, Д.С.** Идентификация эффективных генов устойчивости *Lr35*, *Lr47*, *Sr32*, *Sr39* к бурой и стеблевой ржавчинам в образцах *Aegilops speltoides*, синтетической форме Авродес и линиях, полученных на их основе / **Д.С. Миков**, Э.Р. Давоян, Р.О. Давоян, Ю.С. Зубанова, Н.П. Жарченко // В книге: Биология – наука XXI века 19-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. Сборник тезисов. Федеральное государственное бюджетное учреждение Пушинский научный центр Российской академии наук, Межфакультетский научно-образовательный центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова в г.Пушино. – 2015. – С. 29

8. Бебякина, И.В. Создание и изучение рекомбинантных синтетических форм мягкой пшеницы для расширения ее генетического разнообразия / И.В. Бебякина, Р.О. Давоян, Э.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, А.Н. Зинченко, **Д.С. Миков** // В сборнике: Вклад вавилонского общества генетиков и селекционеров в инновационное развитие Российской Федерации Сборник статей по материалам научно-практической конференции Кубанского отделения ВОГиС. – 2015. – С. 13-14.

9. Давоян, Э.Р. Молекулярная идентификация маркеров, сцепленных с генами устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr39* и *Sr47* / Э.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, **Д.С. Миков**, Д.М. Болдаков, Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, А.Н. Зинченко // Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем. – 2016. – С. 416-418.

10. **Миков, Д. С.** Идентификация генов устойчивости *Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51* к бурой ржавчине в образцах *Aegilops speltoides*, синтетической форме Авродес и ее производных с использованием молекулярных маркеров / **Д.С. Миков**, Э.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, Р.О. Давоян, Д.М. Болдаков // Научное обеспечение агропромышленного комплекса. – 2016. – С. 88-89.

11. Davoyan, R.O. Introgression of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* into bread wheat (*Triticum aestivum*) / R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, Y.S. Zabanova, **D.S. Mikov** // В книге: Генетика и геномика растений для продовольственной безопасности Abstract Book . Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Novosibirsk State University; Federal Agency for Scientific Organizations; Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences. – 2016. – P. 6.

12. Миков, Д.С. Передача мутации *Ph1b* в сорт мягкой пшеницы Краснодарская 99 с использованием молекулярных маркеров / **Д.С. Миков**, Р.О. Давоян, Э.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков // В книге: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии Конференция посвящается памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии (Москва, 06-07 апреля 2017). – 2017. – С. 17-18.

13. Миков, Д. С. Применение молекулярных маркеров для идентификации генов хозяйственно-ценных признаков мягкой пшеницы / Д.С. Миков, Э.Р. Давоян, Д.М. Болдаков, Ю.С. Зубанова // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии: сборник тезисов XVIII Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева (Москва, 19-20 апреля 2018 г.). – 2018. – С. 49.

14. Давоян, Э. Р. Создание ценного исходного материала мягкой пшеницы с применением технологии MAS / Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян, Д.М. Болдаков, Ю.С. Зубанова, Д.С. Миков, Е.В. Агаева, В.А. Филобок // VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы. – 2019. – С. 907-907.

15. Davoyan, R. O. et al. Use of a synthetic form Avrodes for modification of the genome of common wheat / R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, E.R. Davoyan, **Mikov D.S.**, Yu.S. Zubanova, D.M. Boldakov, A.N. Zinchenko, E.D. Badaeva, E.A. Salina, I.G. Adonina // Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2019). – 2019. – P. 58-58.

16. Зубанова, Ю.С. Изучение устойчивости к листовой ржавчине у интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops speltoides* и *Aegilops squarrosa* / Ю.С. Зубанова, Э.Р. Давоян, И.В. Бебякина, Р.О. Давоян, Д.С. Миков, Д.М. Болдаков // В книге: Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии сборник тезисов докладов 19-ой Всероссийской конференции молодых учёных, посвященной памяти академика РАСХН Георгия Сергеевича Муромцева. – 2019. – С. 42-43.

17. Davoyan, E. R. Study of introgression lines of common wheat obtained with the participation of the synthetic forms *T. miguschovae* and Avrodes by allelic variants of the *Wx* genes / E.R. Davoyan, R.O. Davoyan, Yu.S. Zubanova, **D.S. Mikov**, D.M. Boldakov, A.G. Chernook, M.G. Divashuk // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology. – 2019. – Vol. 24. – P. 199.

18. Давоян, Р.О. Создание и использование синтетических форм для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы на основе генофонда

диких сородичей / Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, **Д.С. Миков**, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков, А.С. Зинченко, Е.К. Бадаева, Е.А. Салина // В книге: VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы Сборник тезисов Международного Конгресса. – 2019. – С. 178.

19. Давоян, Э.Р. Изучение линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilops speltoides* по устойчивости к листовой ржавчине / Э.Р. Давоян, Р.О. Давоян, **Д.С. Миков**, Д.М. Болдаков, Ю.С. Зубанова // В книге: Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки Материалы IV международной научно-практической конференции. Научный редактор В.С. Паштецкий. – 2019. – С. 150-152.

20. Давоян, Р.О. Использование генофонда диких родичей для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы в НЦЗ имени П.П. Лукьяненко / Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, Э.Р. Давоян, **Д.С. Миков**, Ю.С. Зубанова, Д.М. Болдаков // В книге: Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки Материалы IV международной научно-практической конференции. Научный редактор В.С. Паштецкий. – 2019. – С. 149-150.