

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение  
«НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ЗЕРНА ИМЕНИ П.П. ЛУКЬЯНЕНКО»  
Федеральное Государственное Бюджетное Образовательное Учреждение  
Высшего Образования  
«КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

**Миков Дмитрий Сергеевич**

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

Специальность: 06.01.05 – селекция и семеноводство  
сельскохозяйственных растений

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
д. б. н. Давоян Р.О.

Краснодар  
2020

ВВЕДЕНИЕ.....	4
<b>ГЛАВА 1. УЛУЧШЕНИЕ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM</i>) С ПОМОЩЬЮ ГЕНЕТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА <i>AE. SPELTOIDES</i> (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) .....</b>	<b>9</b>
1.1 Таксономия рода <i>Triticum</i> .....	9
1.2 Род <i>Aegilops</i> как источник ценных сельскохозяйственных признаков.....	12
1.2.1 Устойчивость к болезням у видов рода <i>Aegilops</i> .....	12
1.2.2 Хозяйственно-ценные признаки представителей рода <i>Aegilops</i> .....	16
1.3 Передача генетического материала <i>Ae. speltoides</i> мягкой пшенице.....	17
1.4 Влияние чужеродных хромосом на фенотипические признаки мягкой пшеницы.....	19
1.5 Идентификация чужеродного материала в геноме мягкой пшеницы. ....	22
1.5.1 Цитологические методы идентификации чужеродных хромосом в геноме пшеницы.....	22
1.5.2 Применение ДНК-маркеров для идентификации генов и локусов, детерминирующих различные морфологические и биологические признаки .....	24
1.4.4 Маркер-вспомогательная селекция (MAS).....	30
<b>2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....</b>	<b>33</b>
2.1. Полевые методы исследования.....	33
2.2 Выделение геномной ДНК .....	35
2.3. Анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы с помощью	

ПЦР .....	36
2.4 Статистические методы исследования.....	39
2.5 Цитологические методы исследований.....	39
<b>ГЛАВА 3. АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ К БОЛЕЗНЯМ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ГЕНЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ <i>AEGILOPS SPELTOIDES</i> .....</b>	<b>42</b>
3.1 Оценка устойчивости к болезням.....	43
3.2 Гибридологический анализ устойчивости к бурой ржавчине	47
3.3 Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы с генетическим материалом <i>Ae. speltoides</i> с помощью ДНК-маркеров .....	51
3.3.1 Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине <i>Lr28, Lr35, Lr47, Lr51, Lr66</i> .....	51
3.3.2 Идентификация генов устойчивости <i>Lr10, Lr34, Lr25, Lr26</i> . .....	58
<b>ГЛАВА 4. ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ.....</b>	<b>64</b>
4.1 Оценка интрогрессивных линий мягкой пшеницы по компонентам продуктивности.....	64
4.2 Оценка линий по содержанию белка, клейковины и хлебопекарным качествам.....	79
<b>ГЛАВА 5. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ.....</b>	<b>82</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>87</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>89</b>

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность.** Мягкая пшеница (*Triticum aestivum* L.) является одной из самых широко возделываемых и важнейших сельскохозяйственных культур в мире. Наряду с высокой продуктивностью остается актуальным создание новых сортов, генотип которых будет способствовать не только повышенной урожайности, но также ценному качеству зерна и нести в себе гены, детерминирующие устойчивость к различным негативным биотическим и абиотическим факторам окружающей среды. Для решения таких задач необходимо иметь генетически разнообразный исходный селекционный материал.

Расширение генофонда мягкой пшеницы может достигаться различными способами. Так как эта культура распространена и выращивается практически повсеместно, то одним из самых простых с генетической точки зрения способов является скрещивание сортов из различных географических зон. Однако такой подход имеет определенные ограничения ввиду генетической однородности культурной пшеницы в отношении ценных хозяйственных признаков, где особняком стоит генетическая устойчивость к заболеваниям. Именно здесь приходит на помощь генофонд многочисленных дикорастущих сородичей мягкой пшеницы, в котором имеется большое разнообразие эффективных генов устойчивости к болезням. Ставшая классической в своей области работа Сирса (1961) по переносу гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr9* от *Ae. umbellulata* послужила начальной точкой по созданию программ по вовлечению различных дикорастущих видов в селекцию. В настоящее время такие виды являются источниками практически всех эффективных генов устойчивости ко многим заболеваниям, среди которых ржавчинные болезни и мучнистая роса.

Диплоидный вид *Aegilops speltoides* ( $2n=14$ , SS) генетически близок *T. aestivum* ( $2n=42$ , VBAADD) и содержит геном S, который гомеологичен геному В. От этого вида в настоящее время переданы гены устойчивости к

таким болезням, как бурая и стеблевая ржавчины, гены-супрессоры системы *Rh*.

Для облегчения передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу можно использовать синтетические формы, которые выполняют роль «генетического мостика». С этой целью под руководством Жирова Е.Г. в 80-х годах прошлого века в лаборатории цитогенетики КНИИСХ (сейчас НЦЗ им. П.П. Лукьяненко) была получена геномно-добавленная форма Авродес (ВВААСС). От скрещивания Авродес/Аврора были получены интрогрессивные линии мягкой пшеницы. Они отличались устойчивостью к болезням, в том числе к бурой ржавчине, а также высоким содержанием белка (Давоян Р.О., 2006).

Для вовлечения интрогрессивных линий в селекционный процесс они должны быть цитологически стабильными и иметь определенный набор хозяйственно-ценных признаков. Также большую роль играет 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 развитию 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 линий установить природу устойчивости к бурой ржавчине;
3. Использовать ДНК-маркеры для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине в образцах *Ae. speltoides*, синтетической

форме Авродес и интрогрессивных линиях, полученных на их основе;

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

5. Используя цитологические методы установить форму передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в наиболее перспективные интрогрессивные линии мягкой пшеницы.

**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 интрогрессивных линий, полученных на основе синтетической формы Авродес, по устойчивости к бурой и желтой ржавчинам и мучнистой росе. Отобрано 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 образцах обнаружен ген *Lr26*. Комбинация генов *Lr26+Lr34* выявлена в 10 линиях. Гетерозиготное состояние гена *Lr34* идентифицировано в линии 4849. Ни одного гена устойчивости, источником которого является *Ae. speltoides*, не было обнаружено в интрогрессивных линиях.

Выявлены две новые линии (4915 и 5041), которые являются наиболее перспективными для использования в селекции, так как сочетают в себе высокую продуктивность, содержание белка и клейковины и хорошую хлебопекарную оценку, а также устойчивость к комплексу болезней.

Цитологическим анализом линий 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053 установлено наличие в них двух новых, ещё не описанных в литературе, транслокаций от *Ae. speltoides*. В образцах 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 с помощью вида *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. Изучение показателей продуктивности и технологических свойств зерна в интрогрессивных линиях;
4. Результаты анализа интрогрессивных линий с помощью цитологических методов.

**Апробация работы.** Исследования проводились в рамках государственного задания для 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 (в том числе 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 вавиловского 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, 4 – в системы SCOPUS и Web of Science.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 109 страницах текста в компьютерном исполнении, 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.

**Личный вклад автора.** Заключается в выполнении основного объема теоретических и экспериментальных исследований, изложенных в диссертационной работе; анализе и оформлении результатов в виде научных публикаций и их апробации при выступлении на всероссийских и международных конференциях; создании исходного материала для его вовлечения в селекционные программы.

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

## 1.1 Таксономия рода *Triticum* L.

Пшеница является наиболее распространенной в мире зерновой культурой. Она возделывается во всех климатических зонах и на различных высотах относительно уровня моря, что показывает на высокую пластичность и приспособляемость пшеницы к различным условиям окружающей среды (Дорофеев В.Ф. и др., 1987).

Вид *Triticum aestivum* L. является аллогексаплоидным, в состав которого входят три удвоенных генома: А, В и D. В каждом геноме присутствует по 7 хромосом, таким образом полный геном насчитывает 42 хромосомы. Происхождение *T. aestivum* до сих пор является не подтвержденным, многие исследователи занимались этим вопросом в течение продолжительного времени (Регель Р.Э., 1915; Фляксбергер К.А., 1938; Дорофеев В.Ф. и др., 1979, 1987; Гончаров Н.П., 2012). Тем не менее развитие молекулярно-биологических методов и сопоставление их результатов таковыми сравнительно-генетических методов дало возможность наиболее полного описания внутривидовых филогенетических взаимоотношений и корректной оценки времени обособления отдельных видов (Гончаров Н.П., 2002; Kosina R., 1999; Gill B.S. et al., 2004; Golovina K.A. et al., 2010). Однако установление предков рода *Triticum* и отдельных его групп является затруднительным из-за отсутствия общепринятой схемы происхождения пшениц.

Гончаров Н.П. в 2012 году предложил вероятную схему происхождения вида *T. aestivum*, который мог возникнуть в результате естественной гибридизации с последующим формированием амфиполиплоида, в состав которого входят три диплоидных вида, которые относятся к родам *Aegilops* и *Triticum* (рисунок 1). Согласно этой схеме, донором генома В является вид *Ae. speltoides*, генома А – *T. uratru*, генома D – *Ae. squarrosa* (Гончаров Н.П., 2012).

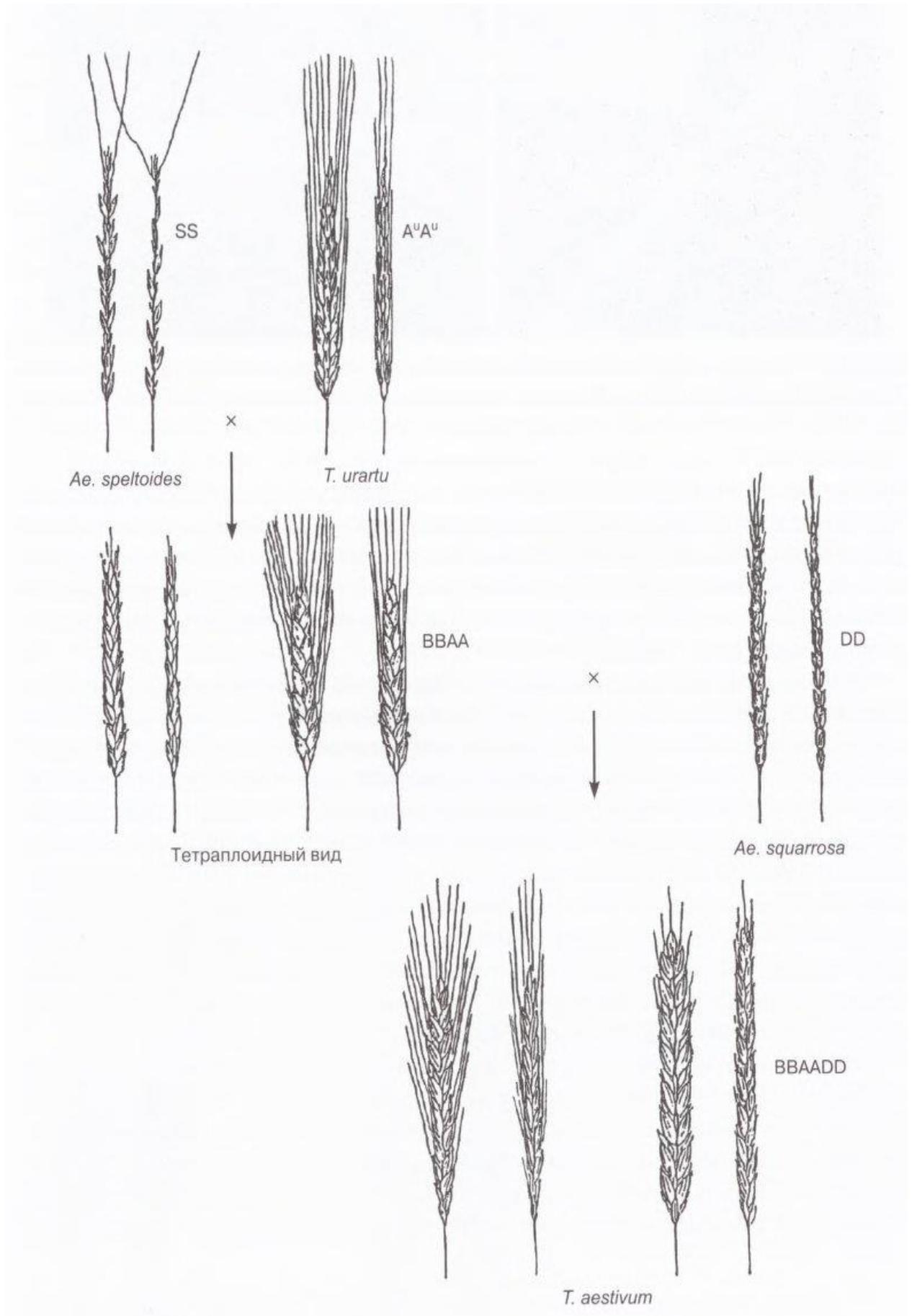


Рисунок 1 – Схема происхождения мягкой пшеницы (Гончаров Н.П., 2012)

Современный вид *T. aestivum* L. можно отнести в состав трибы *Triticeae* L. семейства *Poaceae* Barnhart (*Gramineae* Juss.), как и другие две хлебные культуры – ячмень и рожь, а также ряд важных кормовых и пастбищных культур (Цвелев Н.Н., 1976, 1987). Формирование и состав этой трибы до сих пор вызывает споры в виду множества классификаций самого рода *Triticum* (Дорофеев В.Ф. и др., 1979; Bowden W.M., 1959; MacKey J., 2005, Goncharov N.P. et al., 2009). Неоднозначно определен объем как самой трибы *Triticeae* (Barkworth M.E., 1992), так и подтрибы, в которую входит род *Triticum* (Цвелев Н.Н., 1976).

Роды *Aegilops* и *Secale* филогенетически близки роду *Triticum*, и составляют вместе с ним подтрибу *Fruментaceae* Dum в составе трибы *Triticeae*. (Гончаров Н.П., 2012). Самые древние представители данной таксономической единицы, вероятно, являлись многолетними, перекрестноопыляемыми диплоидными видами (Дж. М. К., 1989). Представители родов *Aegilops* и *Triticum* подтрибы *Fruментaceae* имеют политипные серии, в то время как представители рода *Secale* – монотипные, что свидетельствует об их эволюционной «продвинутой» (Дорофеев В.Ф., 1979; Кобылянский В.Д., 1982; Witcombe G. R. A., 1983; Miller T.E., 1987). Полиплоидные представители родов *Aegilops* и *Triticum* являются по своей природе аллополиплоидами, получение автополиплоидных форм возможно только экспериментально. Для представителей рода *Triticum* характерно наличие геномов Au, Ab, B, G и D. У различных представителей рода *Aegilops* встречаются геномы C, D, M, N, S, U. Первоначально пшеничными геномами среди перечисленных являются только Au, Ab, что свидетельствует о том, что донорами трех других элементарных геномов полиплоидных пшениц являются диплоидные виды рода *Aegilops* (Kihara H, 1929; Kerby K., Kuspira J., 1987). В связи с этим неоднократно предпринимались попытки объединения этих двух родов в один (Моррис Е.Р., Сирс Э.Р., 1970; Bowden W.M., 1959). В то же время имели место предложения включать род *Triticum* только представителей, входящих в секцию *Sitopsis* (Chennaveeraiah M.S., 1960).

## 1.2 Род *Aegilops L.* как источник ценных сельскохозяйственных признаков

### 1.2.1 Устойчивость к болезням у видов рода *Aegilops L.*

Генофонд родственных мягкой пшеницы видов и родов представляет собой богатейший источник многих хозяйственно-ценных признаков, которые уже были успешно переданы в мягкую пшеницу (Мигушова Э.Ф., 1973; Скурыгина Н.А., 1979; Чикида Н. Н., 2001; Zeller F.J., Hsam L., 1983; Knott D.R., 1987; Shepherd K.W., Islam A., 1988; Jiang J. et al., 1994).

Создание сортов с устойчивостью к комплексу болезней возможно благодаря использованию дикорастущих форм пшеницы и её многочисленных сородичей. Исследования генофонда родов *Triticum L.* и *Aegilops L.* по признаку устойчивости к фитопатогенным грибам позволяют существенно расширить возможности селекции в борьбе с ними (Чикида Н.Н., Максимов И.В., Давоян Р.О., 2011).

Перспективным способом борьбы с фитопатогенными грибами является создание сортов культурной пшеницы, которые обладают к ним устойчивостью наряду с высокой продуктивностью. В связи с утратой эффективности большинства генов устойчивости к фитопатогенным грибам имеющийся в арсенале селекционеров генофонд не позволяет обеспечивать резистентность к широкому спектру болезней, возбудителями которых они являются. Из этого утверждения следует вывод, что генетического материала самой пшеницы недостаточно для решения этой проблемы. Такая ситуация стала следствием выращивания однотипных сортов с перекрывающимися родословными. Ярким примером является потеря эффективности гена устойчивости к листовой ржавчине *Lr26* из-за широкого возделывания сортов Аврора и Кавказ на Северном Кавказе в конце 1960-х годов. На рубеже 20 и 21 веков аналогичным способом утратил эффективность ген *Lr19* в Поволжье, а

в конце 2000-х – ген *Lr9* в Западной Сибири (Сибикеев С.Н., Крупнов В.А., 2007; Мешкова Л.В. и др., 2008; Гультяева Е.И., 2012).

Поражение пшеницы различными заболеваниями существенно снижает количество и качество урожая. Очевидно, что проблема заболеваний на полях решается с помощью химических средств защиты растений, однако каждая дополнительная обработка посевов несет в себе дополнительные затраты, а также наносит вред окружающей среде. Именно поэтому создание сортов пшеницы, обладающих генетической устойчивостью к болезням, является необходимым, так как их выращивание является более рентабельным с экономической точки зрения и менее вредным для экологии. На современном этапе развития генетики существует несколько путей решения проблемы внедрения новых генов устойчивости к заболеваниям в генофонд культуры. Стремительными темпами развиваются методики геномного редактирования с помощью CRISPR/CAS9. По данным Коротковой А.М. (2019) известно о модификации 7 генов и 7 генотипов пшеницы с помощью этой технологии. Однако для массового внедрения и использования в селекционных программах данный способ имеет ряд ограничений, в том числе юридических.

Другим актуальным способом передачи устойчивости к болезням в сорта мягкой пшеницы является использование дикорастущих сородичей *T. aestivum*. Особый интерес в качестве источников устойчивости к болезням стоит уделить представителям рода *Aegilops*. Так, виды *Ae. speltoides* (геном S), *Ae. triaristata* (U<sup>Mt</sup>), *Ae. recta* (U<sup>MrN</sup>), *Ae. caudata* (C) имеют высокую устойчивость к бурой, желтой ржавчинам и мучнистой росе (Чикида Н.Н., Максимов И.В., Давоян Р.О., 2011). В отделе биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко создана большая коллекция линий с генетическим материалом от видов *Ae. speltoides* и *Ae. tauschii* с идентифицированными генами устойчивости к бурой ржавчине (Давоян Р.О. и др., 2017; Давоян Э.Р. и др., 2018). Сорт Roazon, созданный во Франции методом интрогрессивной гибридизации между *T. aestivum* и *Ae. ventricosa*, имеет высокую устойчивость к церкоспореллезу (Jahier J. et al., 1978). Линия, полученная с использованием

генетического материала *Ae. ovata*, обладает высокой устойчивостью к *Bipolaris sorokiniana* (Bailey K.L., Harding H., Nucl P., 1995). Также стоит отметить линии озимой мягкой пшеницы, созданные в Селекционно-генетическом институте Украинской Академии Аграрных наук с участием *Ae. cylindrica*, которые обладают комплексной устойчивостью сразу к нескольким болезням: мучнистая роса, бурая и стеблевая ржавчина, твердая и пыльная головня, фузариоз (Галаев А. В., Бабаянц Л. Т., Сиволап Ю. М., 2004).

В большинстве случаев устойчивость к различным болезням наследуется независимо от других морфо-биологических признаков (Valkoun J. et al., 1985; Вавилов Н.И., Андреев Л.Н., 1986). Но в некоторых случаях, особенно при межвидовых и межродовых скрещиваниях, возможна передача устойчивости вместе с хозяйственно-негативными признаками, такими как снижение продуктивности, склонность к полеганию, ухудшение технологических свойств зерна и другими (Будашкина Е.Б. и др., 1990; Knott D.R., 1968, 1989; Zeven C., Wanige J., 1986; Worland A.J. et al., 1988). Таким образом, аллели, детерминирующие устойчивость, могут быть сцеплены с генами, отвечающими за проявления хозяйственно-негативных признаков (Dvorak J., Knott D.R., 1977; Dvorak J., Chen K.C., 1984). Такое явление также возможно из-за дисбаланса коадаптивного комплекса генов (Zeven C., Wanige J., 1986). Проявление отрицательных эффектов при передаче генетического материала от диких сородичей в некоторых ситуациях происходит из-за неспособности компенсации генов, локализованных в отсутствующем участке хромосомы (Zeven C., Wanige J., 1986). Количество негативных признаков и тип их проявления напрямую зависит от формы передачи. Передача чужеродного материала в мягкую пшеницу через транслокации является наиболее приемлемой. Однако даже при такой форме передачи может оставаться значительным количество отрицательных эффектов. Например, Sears (1956) в своем эксперименте по передаче устойчивости к бурой ржавчине от *Ae. umbellulata* в сорт мягкой пшеницы Chinese Spring, получил лишь одно растение с транслокацией из сорока, которое не имело негативных

хозяйственных признаков, а его резистентность хорошо передавалась через гаметы обоих родителей. Метод беккроссирования является одним из способов освобождения от нежелательных признаков. Но в некоторых случаях необходимо использовать более эффективные методы. Такими методами могут являться стимулирование конъюгации между гомеологическими хромосомами, либо искусственный мутагенез. Эффективность искусственного мутагенеза показал Knott (1984), который с его помощью разорвал сцепление между пырейным геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr19* и желтым цветом муки. Транслокация 1RS в гомеологичную хромосому мягкой пшеницы использовалась для обеспечения устойчивости к болезням, но в то же время снижала качество зерна (Rogowsky P.M., 1993). Для разрыва сцепления между генами агрономически ценных признаков и низкого качества зерна использовался мутант *Ph1*. С его помощью были получены рекомбинанты между коротким плечом хромосомы 1RS ржи и коротким плечом хромосомы 1DS пшеницы.

С другой стороны, передаваемые аллели могут быть сцеплены с генами, детерминирующими хозяйственно-положительные признаки, в том числе устойчивость к разным болезням. J.H. Jorgensen и C.J. Jensen (1972) в своей работе описали тесное сцепление гена устойчивости к стеблевой ржавчине *SrTt-1* с геном устойчивости к мучнистой росе *Pm6*, источником которых является *T. timopheevii*. Гены устойчивости к бурой ржавчине (*Lr26*), стеблевой ржавчине (*Sr31*) и мучнистой росе (*Pm8*) тесно сцеплены друг с другом и локализованы на ржаной хромосоме 1RS, участок которой был передан многим сортам мягкой пшеницы в виде транслокации с этими генами (Bartos P. et al., 1973; Zeller F.J., Fuchs E., 1983). Устойчивость к бурой и стеблевой ржавчинам в сортах Agent и Agata контролируется сцепленными между собой генами *Lr24* и *Sr24*, *Lr19* и *Sr25*, источниками которых является *Ag. elongatum*, соответственно (McIntosh R.A., 1977). От вида *Ae. ventricosa* в мягкую пшеницу передан ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr37*, который сцеплен с устойчивостью к глазковой пятнистости (Worland A.J. et al., 1988).

Е.Р. Kerber и Р.Л. Dыck в своей работе описали передачу сцепленных генов, детерминирующих возрастную устойчивость к бурой ржавчине и устойчивость проростков к стеблевой ржавчине мягкой пшенице, от амфидиплоида *Ae. speltoides* x *T. monococcum* (Kerber E.R., Dыck P.L., 1990).

### 1.2.2 Хозяйственно-ценные признаки представителей рода *Aegilops*

Виды рода *Aegilops* обладают различными хозяйственно-ценными признаками помимо устойчивости к болезням. Высокое содержание белка (18-34% на сухое вещество) характерно для зерна эгилопсов, что превышает стандартные значения мягкой пшеницы в 1,5-2,5 раза. Показатель микроседиментации (SDS) варьирует от 1,8 до 9,5 мл при 4,1 мл у мягкой пшеницы (Мамадюсуфова М. Г. и др., 2013; Dai S. et al., 2015). Комплекс генов, локализованных в геноме D, вероятным источником которого является *Ae. tauschii*, оказывает наибольшее влияние на хлебопекарные качества зерна мягкой пшеницы (Конарев В.Г., 1980). Этим объясняются хорошие хлебопекарные качества видов рода *Aegilops*, имеющих в своем составе геном D (Конарев В.Г. и др., 1993). Гены, локализованные в этом геноме, детерминируют синтез определенного состава проламинов и глютенинов, который оказывает наиболее благоприятное влияние на хлебопекарные качества зерна. Прочность и эластичность теста, газодерживающая способность и высокий объем хлеба в основном обеспечивается за счёт липопропротеида, содержащего дигалактозилдиглицерид. Гены, отвечающие за синтез этого вещества, локализованы в хромосоме 5D. Важную роль в формировании эластичной клейковины играют компоненты глиадина омега-89, формирование которых происходит под действием генов, локализованных в 1D хромосоме. Стоит отметить факт наличия таких компонентов у видов *Ae. umbellulata* (геном U, 2n=14), *Ae. comosa* (геном M, 2n=14) и их полиплоидных производных. Низкое соотношение глиадина к глютенину, обусловленное высоким содержанием нерастворимой клейковинной фракции, характерно для

мягкой пшеницы. Таким соотношением обладают виды *Ae. tauschii*, *Ae. sharonensis* и *Ae. longissima*, а также производные от них полиплоидные виды. Низкое содержание нерастворимой клейковинной фракции обусловлено отсутствием альфа-глиадинов, что соответствует слабой клейковине и является характерным для вида *Ae. speltoides* (Богуславский Г.Л., Голик О.Б. 2004). При переносе генов, детерминирующих синтез высокомолекулярных субъединиц, от некоторых представителей рода *Aegilops* в мягкую пшеницу возможно добиться улучшения её хлебопекарных качеств (Лапочкина И.Ф., Власова Е.В., Ячевская Г.Л., 2000а; Давоян Р.О., 2006).

Использование различных видов рода *Aegilops* в качестве донора ценных признаков уже зарекомендовало себя как хороший метод расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы. При использовании такого подхода в селекции возможен перенос сразу комплекса ценных хозяйственных признаков, получение новых транслокаций и замещений в геноме мягкой пшеницы. Созданные таким методом линии имеют практическую значимость, так как могут являться кандидатами в коммерческие сорта, сочетающие в себе высокое качество зерна и повышенную устойчивость к болезням.

### **1.3 Передача генетического материала *Ae. speltoides* мягкой пшенице**

*Ae. speltoides* (SS,  $2n=14$ ), является одним из ближайших родственных мягкой пшенице видов. S-геном считается предшественником генома В *T. aestivum*, поэтому вид представляет большую теоретическую значимость (Гончаров Н.П., 2012).

Представители вида *Ae. speltoides* проявляют иммунитет ко многим заболеваниям, в том числе актуальным для Краснодарского края. В коллекции отдела биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко присутствует 10 образцов *Ae. speltoides*, и все они проявляют устойчивость к наиболее распространенным и вредоносным болезням региона – бурой и желтой ржавчинам, мучнистой росе

(Давоян, 2006). В литературе описано использование транслокаций от *Ae. speltoides* в коммерческих сортах мягкой пшеницы: транслокации 4AL/4AS-4AL.7S#2 и 7AS/7AS-7S#1S-7AS·7AL, в которых локализованы гены *Lr28* и *Lr47* соответственно (Леонова И.Н., 2018).

В дополнение к высокому иммунитету образцы вида могут обладать и другими ценными хозяйственными признаками: высокое содержание белка и клейковины, устойчивость к таким абиотическим стрессам, как низкие температуры, засуха и засоление (McGuire P.E., Dvorak J., 1981; Gill B.S. et al., 1985).

Одной из важных особенностей генома S является наличие генов, которые подавляют работу системы *Ph* в геноме мягкой пшеницы (J. Dvořák, K. R. Deal, M. C. Luo, 2006). Гены *Ph* препятствуют конъюгации любых хромосом, не являющихся гомологичными друг другу, служа тем самым естественным барьером межвидовой гибридизации (Sears E.R., Okamoto M., 1957; Riley R., Chapman V., 1958; Riley et al., 1960). Подавление действия этой системы приводит к возможности кроссинговера между гомеологичными хромосомами, а значит и к обмену генетическим материалом между разными видами. Это является одним из способов получения новых транслокаций в геноме *T. aestivum*.

Передачу ценного генетического материала в мягкую пшеницу можно осуществлять несколькими способами. Самым простым является метод прямого скрещивания, однако для него существует ряд серьезных ограничений в виду естественного барьера. При прямых скрещиваниях *Ae. speltoides* x *T. aestivum* возможно получение новых образцов с интрогрессией. Однако велика вероятность получения цитологически нестабильных или стерильных гибридов. Поэтому для переноса генетического материала от диких сородичей в мягкую пшеницу была разработана методика получения синтетических амфидиплоидных форм, первооткрывателем которой стал Карпеченко в 1927 году. Именно он разработал и описал метод преодоления стерильности отдаленных гибридов, использовав для этого химическое

вещество колхицин (Карпеченко Г.Д., 1927). Благодаря явлению полиплоидии уже к 1966 году были получены амфидиплоиды от скрещивания культурной пшеницы со многими своими дикими сородичами (Riley R., Kimber J., 1966).

Геномно-замещенные формы, полученные на основе тетракомпонента мягкой пшеницы (ВВАА,  $2n=28$ ), в котором отсутствует геном D, представляют особый интерес. Возможность получения таких форм описана Кербером (Kerber R.E., 1964). Тетраплоидные компоненты сортов Canthach, Selkirk, а позднее – Prelude, Thatcher и Rescue были выделены в результате их скрещивания с твёрдой пшеницей, цитологического отбора пентаплоидов с геномной формулой AABBDD ( $2n=35$ ) и шестикратного беккроссирования мягкой пшеницей и самоопыления (Kerber R.E., Dusk P. L., 1969).

Опираясь на описанную выше методику, с небольшими модификациями, в лаборатории цитогенетики Краснодарского НИИ сельского хозяйства (в настоящее время Национальный центр зерна) под руководством Е.Г. Жирова был получен тетракомпонент сорта Аврора с геномной формулой ВВАА. На основе этого тетракомпонента в дальнейшем была получена геномно-замещенная синтетическая форма Авродес, которая отличалась от *T. aestivum* наличием генома S, который заменил геном D. Именно Авродес стал основой для получения целого ряда интрогрессивных линий мягкой пшеницы. Подробное описание, характеристика и получение первых интрогрессивных линий с генетическим материалом *Ae. speltoides* описана в работе Р.О. Давояна (2006).

#### **1.4 Влияние чужеродных хромосом на фенотипические признаки мягкой пшеницы**

При передаче чужеродного материала в геноме мягкой пшеницы могут происходить изменения, которые впоследствии отражаются на важных для селекции признаках: зимостойкость, засухоустойчивость, продолжительность

вегетационного периода, технологические свойства зерна, устойчивость к болезням и вредителям (Knott D.R., 1987; Nevo E., 1993).

R. Riley с соавторами (1958) в своей работе описали фенотипические изменения сорта мягкой пшеницы Голдфаст, связанные с добавлением отдельного хромосом ржи к его геному. При добавлении хромосомы I наблюдалось опущение шейки колоса, хромосомы II – устойчивость к жёлтой ржавчине, хромосом IV и V – увеличение и уменьшение размеров всего растения соответственно, хромосом VI и VII – изменение формы колоса. При замещении пшеничных хромосом на соответствующие ржаные гибридные растения становились устойчивыми к болезням. Например, в хромосоме 1R ржи локализованы гены устойчивости к желтой, бурой и стеблевой ржавчинам, а также мучнистой росе. Носителями такой ржаной транслокации являются сорта Zorba, Salzmunde и Neuzucht, которые использовались в качестве доноров устойчивости к этим болезням (Zeller F.J., Fuchs E., 1983; Berzonsky W.A., Francki M.G., 1999). К опущению узла стебля приводило замещение пшеничной хромосомы на 5R от ржи. Замена на хромосому 6R гомеологичной пшеничной способствовала появлению зерна красного цвета и устойчивости к желтой ржавчине (Miller T.E., 1984).

G. Kimber в 1967 году изучил и описал шесть линий мягкой пшеницы, полученных на основе сорта Chinese Spring, с добавлением хромосом от *Ae. umbellulata* (Kimber G., 1967). Чужеродные хромосомы имели различное влияние на фенотип. Так наличие хромосомы 1U оказывало влияние на высоту растения, хромосом 2U, 4U, 5U – на длину, форму колоса и остистость соответственно, хромосомы 5U – на количество колосков в колосе и продолжительность вегетационного периода. При наличии хромосомы 6U от *Ae. umbellulata* линия становилась устойчивой к бурой ржавчине. Вследствие замещения кариотипа мягкой пшеницы 1В хромосомой 1U от *Ae. umbellulata*, а также пятой гомеологичной группы хромосомой 5U у растений появлялась черная окраска колоса и увеличивалась продолжительность вегетационного периода соответственно (Riley R., Law C.N., 1971; Miller T.E., 1984).

Появление устойчивости к стеблевой и бурой ржавчинам у мягкой пшеницы происходило при замещении хромосом 6A и 6D мягкой пшеницы на соответствующие кариотипы *Ag. elongatum* (Johnson R. 1966; Knott D.R., 1987). Сорт *Agus*, известный своей устойчивостью к бурой ржавчине, имеет замещение хромосомы 7D кариотипом от *Agropyron*. Голубая окраска зерновки появляется при замещении хромосомы 4D на кариотип от вида *Ag. elongatum* (Li Z.S., Mu S.M., Chou H.P., Li B., 1993).

Появление растений с крупным зерном и колосом красного цвета с отсутствием воскового налета наблюдалось при замещении кариотипа пшеницы на хромосомы *Ae. speltoides*. Другими особенностями линий с генетическим материалом *Ae. speltoides* являлись: устойчивость к мучнистой росе и бурой ржавчине, а также повышение гомеологических конъюгаций за счёт генов-супрессоров системы *Ph* мягкой пшеницы (Лапочкина И.Ф., Власова Е.В., Ячевская Г.Л., 2000б; Давоян Р.О., 2006).

При замещении хромосомы мягкой пшеницы на 6V от *Haynaldia villosa* были получены линии, характеризующиеся устойчивостью к мучнистой росе (Qi L.L., Chen P.D., Liu D.J., et al., 1993).

Линии мягкой пшеницы, полученные на основе сорта *Chinese spring* с использованием генетического материала *Ae. uniaristata* (замещение третьей гомеологичной группы хромосом), являются устойчивыми к высокой концентрации алюминия в почве (Miller T.E. et al., 1993).

Изменения морфо-биологических признаков у мягкой пшеницы могут свидетельствовать о наличии чужеродного генетического материала. Но в то же время встречаются случаи, когда хромосомы других видов в мягкой пшенице никак не проявляют себя фенотипически.

## 1.5 Идентификация чужеродного материала в геноме мягкой пшеницы.

### 1.5.1 Цитологические методы идентификации чужеродных хромосом в геноме пшеницы

Для поиска чужеродного генетического материала в геноме мягкой пшеницы могут использоваться различные методы. Наиболее точными и распространёнными являются цитологические методы анализа. Различия в морфологии пшеничных и чужеродных хромосом являлись первоначальным базисом такого подхода: субмедиальное положение центромеры характерно для хромосом мягкой пшеницы, субтерминальное – для кариотипов представителей вида *Aegilops*. Главным недостатком такой методики является идентичность всех чужеродных хромосом при их обычной окраске в метафазе (Riley R., Law C.N., 1984; Mujeeb-Kasi A., Kimber G., 1985). Поперечное деление унивалентной хромосомы у моносомиков, которое обнаружил Sears в 1956 году, открыло возможность создания серий телоцентрических линий для идентификации плеч хромосом. Такие линии были созданы с участием видов *Aegilops caudata* (Friebe B., Shubert V., Blutner W.D., Hammer K., 1992), *Ae. umbellulata* (Friebe B. et al., 1995a), *Ae. searsii* (Friebe B., Tuleen N.A., Gill B.S., 1995b). Они были использованы в работах по идентификации чужеродных хромосом в геноме мягкой пшеницы, а также их перестроек. Относительная длина плеч хромосом диких сородичей и величина их спутника может отличаться от таковых в хромосомах мягкой пшеницы. Однако различия спутничных хромосом и обычных не всегда видны визуально, так как у гибридных растений происходит явление амфипластии. Амфипластия – это подавление активности спутничных хромосом одного вида кариотипами другого. Так, хромосома 1U (*Ae. umbellulata*) может подавлять активность 1В и 6В спутничных хромосом мягкой пшеницы (Martini G., O'Dell M., Flavell R.V., 1982). Аналогичным свойством обладает хромосома ржи 1R (Miller T.E.,

1984). Одним из способов решения такой проблемы является гибридизация РНК *in situ* (Ячевская Г.Л., Наумов А.А., 1990), другим – обработка препаратов митотических хромосом насыщенным раствором солей серебра, которая позволяет выделить ядрышкообразующие районы (Lakadena J.K., Cermeno M.C., Orellana J., Santos J.L., 1984).

Дифференциальная окраска хромосом также является одним из наиболее эффективных методов для обнаружения чужеродного генетического материала в геноме мягкой пшеницы. Метод основан на использовании красителя Гимза, который дифференцирует структурный гетерохроматин и эухроматин различных хромосом после предварительной обработки их концентрированным раствором гидроокиси бария (Gill B.S., Kimber G., 1974).

Методики дифференциального окрашивания хромосом были разработаны для различных видов животных и растений, а также человека (Зурабишвили Т.Г., Иорданский А.Б., 1976). Характер исчерченности хромосом в метафазе зависит от метода предварительной обработки материала перед приготовлением препаратов.

Наиболее применяемым для идентификации хромосом растений является метод С-окрашивания. С его помощью удалось идентифицировать хромосомы мягкой и твердой пшеницы (Зурабишвили Т.Г., Иорданский А.Б., 1976; Gill B.S., Kimber G., 1974; Dvorak J., Chen K., 1984; Gill B.S., Friebe V., Endo T.R., 1991), ржи (Большева Н.П., Бадаева Е.Д., 1984), тритикале (Щапова А.И., Кравцова Л.А., 1990; Hutchison J., Miller T.E., Reader S.M., 1983), диких сородичей пшеницы (Семенов В.И., Семенова Е.В., 1986; Badaeva E.D., Badaev N.S., Gill B.S., 1994; Friebe V.et.al., 1992; Friebe V.et. al., 1995a).

Метод дифференциальной окраски сыграл важную роль в решении филогенетических взаимоотношений и определении гомеологии хромосом различных видов семейства *Poaceae* (Gill B.S., Kimber G., 1974; Hutchinson J., Miller T.E., Reader S.M., 1983).

Недостатком такого метода является не всегда корректное толкование его результатов в некоторых лабораториях, которое могло быть субъективным

из-за различных модификаций способов дифференциального окрашивания хромосом (Riley R., Law C.N., 1984).

Наиболее распространенным методом идентификации хромосом растений в последние годы стала гибридизация *in situ*. Первое описание такого подхода появилось в конце 1960-х–начале 1970-х гг. на животных (Pardue, Gall, 1970). Метод гибридизация *in situ* предусматривает применение радиоактивных зондов из нуклеиновых кислот. В качестве метчиков используются тритий или изотоп йода  $^{125}\text{I}$ . Совершенствование методик привело к появлению различных модификаций и способов Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) и Genomic *in situ* Hybridization (GISH), а также более безопасных зондов для детекции хромосом разных растений, в том числе мягкой пшеницы и её сородичей. В современном виде гибридизация *in situ* представляет собой комплекс различных методик. В зависимости от поставленных задач и материала исследования они могут различаться между собой по характеру зондов и способу их детекции, а также по методу приготовления хромосомных препаратов (Бадаева Е.Д., Салина Е.А., 2015).

### **1.5.2 Применение ДНК-маркеров для идентификации генов и локусов, детерминирующих различные морфологические и биологические признаки**

Большая роль генетических маркеров была predeterminedена уже на первых этапах развития генетики. В виду особенностей морфологических и белковых маркеров, их использование имело ряд серьезных ограничений, что не способствовало широкому применению их в практических работах. Появление ДНК-маркеров позволило снять эти ограничения благодаря высокой встречаемости в геноме и развитию молекулярных методов анализа, что в свою очередь послужило начальной точкой интенсивного развития направлений селекции, основанных на их применении.

В сельском хозяйстве одной из главных задач селекционеров растений

является улучшение существующих сортов культурных растений, которым не хватает одного или более признаков, путем скрещивания этих сортов с линиями, имеющими его. Так, классическая селекция подразумевает скрещивания полнокомплектных геномов с последующим отбором лучших рекомбинантов среди потомства, которое как правило имеет различные расщепления по искомому признаку. В действительности на практике такой подход является трудоёмким и требует больших затрат времени, включает несколько скрещиваний, формирует ряд поколений, тщательный фенотипический отбор и преодоление негативного сцепленного наследования, когда нежелательный локус находится очень близко к желаемому локусу, что может сделать очень трудным достижение желаемого результата. Развитие технологии ДНК маркирования, разработка и создание нескольких типов молекулярных маркеров и селекция, проводимая с их использованием, дают широкие возможности селекционерам и генетикам решить множество проблем классической селекции.

В настоящее время молекулярные маркеры широко используются для идентификации локусов и частей генома в селекционных программах по некоторым культурам, так как они тесно сцеплены с большим количеством ценных агрономических признаков, известны для большинства возделываемых видов (Phillips R.L., Vasil I.K., 2013). Такие молекулярные маркеры включают в себя:

- маркеры, основанные на гибридизации ДНК (полиморфизм длины рестрикционных фрагментов, RFLP);
- ПЦР-маркеры: случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (AFLP) и микросателлиты (SSR);
- сиквенс-маркеры: полиморфизм одного нуклеотида (SNP).

Большинство этих маркеров были получены и на основе библиотек геномной ДНК (RFLP и SSR) и от случайной амплификации ДНК в ПЦР (RAPD), или же и от тех, и от других (например, AFLP). Эти ДНК-маркеры

могут производиться в огромных количествах и доказать свою пользу в решении различных задач по улучшению возделываемых культур. Например, эти маркеры могут широко использоваться в построении насыщенных молекулярных карт (генетических и физических). Их связь с генами или локусами количественных признаков (QTL), детерминирующими экономически важные признаки, может быть применена в непрямой селекции с использованием маркеров (маркер-вспомогательная селекция, MAS) (Korzun V., 2002; Koebner R.M.D., 2004).

Также молекулярные маркеры можно использовать в интрогрессии генов при возвратных скрещиваниях, при описании зародышевой плазмы, генетической диагностике, при описании трансформантов, при изучении организации генома и в филогенетическом анализе (Хлесткина Е.К., 2013). В селекции растений среди существующих маркеров SSRs доказали наибольшую рентабельность. Поэтому их в основном исследователи и выбирают для своих работ (Gupta P.K., Varshney R.K., Prasad M., 2002). RFLP-маркеры не приспособлены к большому объему материала, а RAPD анализы недостаточно воспроизводимы между различными лабораториями. В то время, как и SSR-, и AFLP-маркеры достаточно эффективны в идентификации полиморфизма, SSR-маркеры более автоматизированы (McLauchlan A. et al., 2001). Также AFLP-маркеры могут быть преобразованы для простого ПЦР-анализа (например, STS). Такое преобразование может быть громоздким и трудоемким, так как отдельные бэнды хромосомы состоят из повторяющихся фрагментов (Shan X., Blake T.K., Talbert L.E., 1999), особенно в больших геномных матрицах.

В связи с тем, что за последние годы функциям геномики уделяют больше внимания, появилось множество открытий последовательности генома, транскриптонных последовательностей или учений об экспрессии генов. В результате при проведении экспериментов на практике было идентифицировано большое количество генов. Изобилие баз данных с сиквенсами было собрано на общедоступных ресурсах (например,

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; <http://www.ebi.ac.uk>) в виде клонов ВАС (бактериальных искусственных хромосом), ESTs (экспрессирующая последовательность тегов), клонов кДНК по всей длине и генов. Доступность баз данных с огромным количеством последовательностей целых генов или их частей сделала возможным создание молекулярных маркеров напрямую из частей генов. Эти маркеры были названы «генные молекулярные маркеры» (ГММ).

Большинство маркеров, развивавшихся и использовавшихся в прошлом, напрямую извлечены из геномной ДНК и поэтому могут принадлежать как к транскрибированным, так и к нетранскрибированным частям генома без какой-либо информации об их функциях. В отличие от них, ГММ, полученные из кодирующих последовательностей, таких как ESTs или из полностью описанных генов, часто несли в себе информацию о функции гена. ГММ были разделены на 2 группы, основанные на сайте полиморфизма и последующем его влиянии на фенотипическую изменчивость (Andersen J.R., Lübberstedt T., 2003):

1. Маркеры, ориентированные на гены (GTM): полученные из полиморфизмов внутри генов, тем не менее не всегда несут в себе признак в фенотипической изменчивости, например, нерасшифрованные области (UTR) EST сиквенсов (Arnholdt-Schmitt B., Costa J.H., de Melo D.F., 2006; Aggarwal R.K., et al., 2007);

2. Функциональные маркеры (FM): полученные из полиморфных последовательностей или сайтов в генах и, таким образом, более вероятно несущие в себе признак фенотипической изменчивости (например, основанные на кандидатных генах молекулярные маркеры). FMs также подразделены на две подгруппы, по типу влияния на фенотипическую изменчивость: (а) непрямые функциональные маркеры (IFMs), чья роль в фенотипической изменчивости неизвестна, и (б) прямые функциональные маркеры, чья роль в фенотипической изменчивости доказана.

Согласно вышеизложенной терминологии, молекулярные маркеры,

полученные из неизвестных областей генома, называются случайные ДНК маркеры (RDM), которые могут зависеть или не зависеть от сайта полиморфизма гена или не могут зависеть от гена вообще.

Хотя генные маркеры были также созданы раньше, они существовали в виде кДНК-RLFP (Graner A. et al., 1991, Causse M. A. et al., 1994), функции которых не могли быть предсказаны в то время. Тем не менее, были некоторые достижения по секвенированию этих ранних копий кДНК для обнаружения генов и их функций (Michalek W., Künzel J., Graner A., 1999). По сравнению с этими ранними достижениями, развитие генных маркеров стало реальностью только благодаря аккумуляции больших ресурсов ESTs и последовательностей генов, получившейся в результате проектов по EST и секвенированию геномов культурных растений, а также благодаря развитию отрасли биоинформатики (Gupta P.K., Rustgi S., 2004). Например, несколько ресурсов по транскриптомам стали доступны ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html)), и развились программные инструменты или perl скрипты для поиска SSRs и SNPs в ESTs или сиквенсах гена (Varshney R.K. et al., 2002, 2004, 2005).

Хотя секвенирование всего генома и его документирование – путь к определению всего хранилища генов вида, это возможно только для ограниченного числа видов возделываемых культур, включая огромный масштаб секвенирования их генома или пространства гена. С другой стороны, ESTs представляет собой базовый предмет потребления, включающий в себя анализы геномов и их генов для вида (Rudd S., Mewes H.W., Mayer K.F.X., 2003). В то время как полное секвенирование генома может использовать как способ clone-by-clone или способ whole genome shotgun для достижения адекватных объемов сбора значимой основы, ESTs секвенирование направлено на быстрое, дешевое и простое секвенирование неполных генных транскриптов (Sreenivasulu N. et al., 2002). В итоге может наблюдаться значительный избыток в базе данных сиквенса генов, полученной в проектах по EST секвенированию (Varshney R. K., Korzun V., Börner A., 2004). Поэтому

перед тем как производить маркеры из ESTs, необходимо определить «унигены» после кластерного анализа случайных ESTs с использованием соответствующих компьютерных программ, таких как stackPack (Miller R. T. et al., 1999).

После того как получена база данных по последовательности унигенов с помощью EST анализа или же доступен безызбыточный набор генов, молекулярные маркеры могут быть разработаны двумя основными способами:

1. Прямое картирование: при таком подходе как копии кДНК соответствующие значению ESTs могут быть использованы в качестве образцов ПДРФ, так и ПЦР праймеры могут быть разработаны для EST/гена и использованы как STS или CAPS маркер. Способ прямого картирования должен быть использован только с унигенным набором ESTs или генов.

2. Разработка на практике: при таком подходе программные инструменты обнаружения SSR или SNP используются для скрининга базы данных по сиквенсу ESTs/генов. Для идентификации SNPs используется база данных с избыточным набором EST, полученная от более чем одного генотипа данного вида. Тем не менее после идентификации SNPs только безызбыточный набор ESTs должен быть рассмотрен для SNP картирования.

Схема развития ГММ представлена на рисунке 2. Развитие FMs, тем не менее, требует: а) функционального описания генов, б) установление аллельной последовательности таких генов, в) идентификацию полиморфных, функциональных участков, влияющих на фенотип растения, внутри генов, и (г) проверку взаимосвязи между полиморфизмом ДНК и изменчивостью признака. Поэтому в зависимости от поставленной задачи, а также доступной информации и осуществимости, может быть получен FMs, особый класс ГММ.

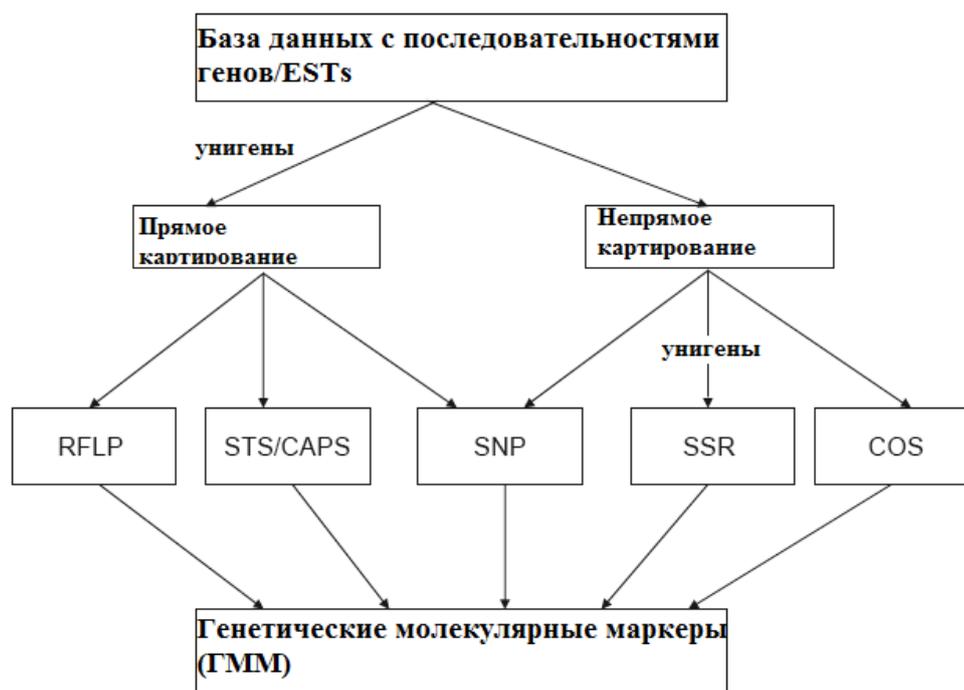


Рисунок 2 – Схема развития генетических маркеров (ГММ)

Два основных пути развития ГММ показаны на схеме. В первом случае используется база данных с последовательностями для идентификации унигенов, и затем кДНК или генные клоны, связанные с унигенами, могут быть проанализированы как RFLP, или база данных с последовательностью унигенов может быть применена для создания пар праймеров и проанализирована с использованием STS/CAPS или SNP. Во втором случае, база данных с последовательностью может быть разработана с использованием компьютерных программ или скриптов для идентификации SSRs, SNPs или COSs из данной базы данных, и затем после идентификации этих унигенов эти маркеры могут быть проанализированы с использованием соответствующих генотипных платформ.

#### 1.4.4 Маркер-вспомогательная селекция (MAS)

Существует два основных метода селекции с использованием ДНК-маркеров: отбор с помощью маркеров, или маркер-вспомогательная селекция (marker-assisted selection, MAS) и геномная селекция.

В основе маркер-вспомогательной селекции лежит отбор растений или животных, являющихся носителями генов, детерминирующих селективируемый признак. Идентификация таких генов проводится с использованием специфических ДНК-маркеров. Их можно условно разделить на две группы в зависимости от локализации в хромосоме. В первую группу входят маркеры, которые тесно сцеплены с геном-мишенью. В некоторых случаях для повышения точности анализа возможно использование сразу двух маркеров, находящихся на близком расстоянии двух сторон от искомого гена. Такие маркеры называются фланкирующими. Во вторую группу относятся внутригенные ДНК-маркеры. Они обладают наибольшей точностью, но для разработки таких маркеров необходимы данные нуклеотидной последовательности гена-мишени и его различных аллелей. С помощью MAS возможен отбор индивидуальных организмов, в которых присутствует ДНК-маркер, тесно сцепленный с геном-мишенью, либо же находящийся внутри такого гена. Таким образом происходит отбор особей, обладающих геном, который детерминирует селективируемый признак. При использовании геномной селекции происходит отбор растений или животных по генотипам в целом за счет данных по ДНК-маркерам, равномерно распределенных по их геному. В этом случае отсутствуют данные о генах, влияющих на селективируемый признак. Метод MAS широко используется при беккросной и линейной селекции, а также при пирамидировании генов, имеющих аддитивный эффект (Moose S.P., Mumm R.H., 2008).

В основе геномной селекции лежит анализ большого количества ДНК-маркеров, равномерно распределенных по всему геному. При этом данные о генах, контролирующих хозяйственно-ценные признаки, отсутствуют в отличие от MAS. Такой подход имеет преимущества при селекции на признаки, имеющие сложный полигенный контроль. Однако для использования геномной селекции на практике необходимо проделывать большую подготовительную работу по секвенированию генома, или отдельных его участков, наработке большой библиотеки DArT и SNP

маркеров.

Развитие метода MAS обратило на себя внимание селекционеров НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, где с 2010 года была запущена программа по внедрению в традиционную схему селекции отбора с помощью ДНК-маркеров. На первых этапах работ проходила валидация маркеров, сцепленных с генами, детерминирующими ценные для селекции признаки, в число которых входили устойчивость к болезням, редукция высоты растений, чувствительность к фотопериоду, потребность в яровизации, качественный состав крахмала и другие (Беспалова Л.А. и др., 2012). В результате были разработаны методики идентификации целевых генов на различных этапах селекционного процесса. Была проделана большая работа по повышению устойчивости сортов мягкой пшеницы к бурой ржавчине с помощью пирамидирования нескольких генов в одном растении с применением ДНК-маркеров (Давоян Э.Р. и др., 2014; Миков Д.С. и др., 2018).

Несмотря на успехи MAS, полноценная работа по внедрению молекулярных маркеров требует изучения новых объектов с учетом требований и задач конкретной селекционной программы. К таким объектам относится генетическая основа некоторых ценных признаков, природа которых ещё недостаточно изучена. Поэтому остается важным комплексный подход и сочетание достижений в областях генетики, селекции и биотехнологии для их использования для решения практических задач, в которые входит создание и получение новых сортов различных возделываемых культур.

## 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 F<sub>1</sub> Авродес/Аврора сортами Аврора и Безостая 1 (Давоян Р.О., 2006).

Для идентификации маркеров, сцепленных с анализируемыми генами, использовалась геномная ДНК. В ходе анализа с помощью ПЦР распознавались маркеры известных генов устойчивости к бурой ржавчине (*Lr10*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*).

### 2.1. Полевые методы исследования

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 м<sup>2</sup>. Предшественником по всем полевым опытам являлся черный пар. Почвы опытных полей – сверхмощные малогумусные западнокавказские черноземы. 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 искусственно инфекционном фоне с помощью шкалы Майнса и Джексона с модификациями (рисунок 3). Растения заражались в фазе колошения смесью уредоспор ржавчины, собранных с листьев растений разных сортов мягкой пшеницы. Устойчивость линий к жёлтой ржавчине определяли по международной шкале

Гаснера и Штрайба с модификациями (Gassner G., Straib W., 1932) на естественном инфекционном фоне. В обоих случаях растения с типом реакции 0 относили в группу иммунных, 01 – высокоустойчивых, 1 – устойчивых, 2 – умеренно устойчивых, 3 – умеренно восприимчивых, 4 – сильно восприимчивых.

Для анализа растений по устойчивости к мучнистой росе применялась шкала Гешеле (Гешеле Э.Э., 1978). Все образцы со степенью поражения до 20% относились к устойчивым к болезни, выше 20% – к восприимчивым.

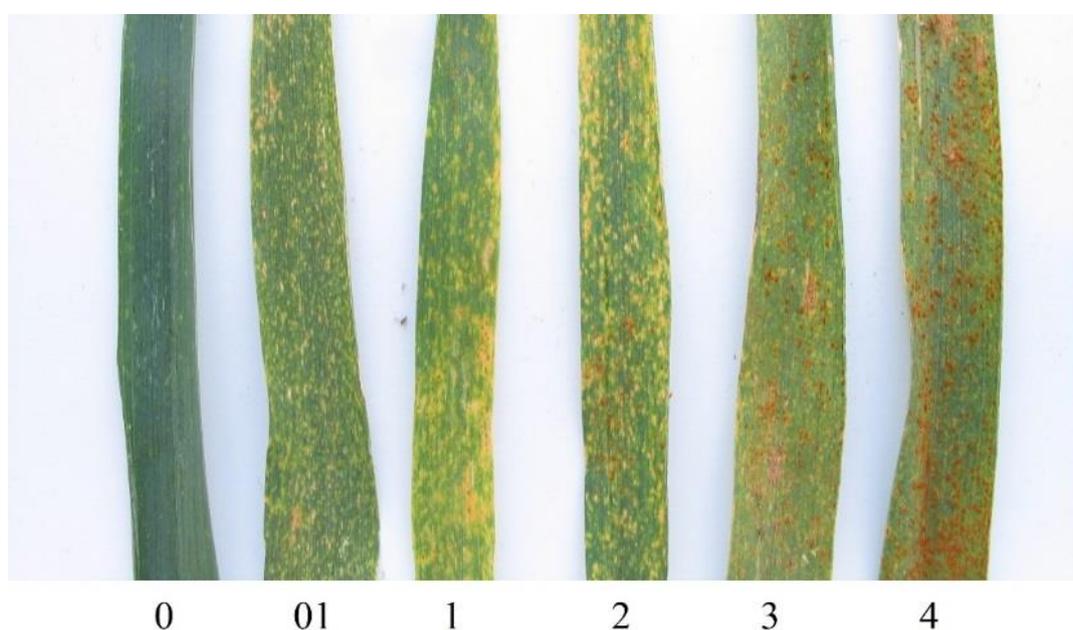


Рисунок 3 – Шкала устойчивости Мейнса и Джексона, с модификациями (Давоян Р.О., 2006)

Гибринологический анализ проводился на взрослых растениях. Семена гибридных растений  $F_2$  высевались вручную в делянки из 6 рядков, по 20-30 зерновок в каждом. Каждый третий рядок засевался восприимчивым к бурой ржавчине сортом Аврора.

С помощью анализа соотношения устойчивых и восприимчивых растений  $F_1$  и  $F_2$ , которые были получены от скрещивания интрогрессивных линий с сортом Аврора, определялось число генов, контролирующих устойчивость к бурой ржавчине, а также их доминантность или рецессивность.

Идентичность или отличие этих генов друг от друга определяли, анализируя расщепление популяции растений  $F_2$ , полученной от скрещивания этих линий между собой. Идентификация генов *Lr28* и *Lr35* в интрогрессивных линиях проводилась путем анализа соотношения устойчивых и восприимчивых растений поколения  $F_2$ , полученного от их скрещивания с тестерными линиями на искомые гены. Все полученные данные обрабатывались с использованием метода  $\chi^2$ .

## 2.2 Выделение геномной ДНК

Выделение геномной ДНК проводилось с помощью коммерческих наборов ДНК-Экстран-3. Каждый образец представлял собой смесь ДНК, выделенную из нарезки молодых зеленых листьев растений, весом 15-20 мг. Методика выделения:

- сделать нарезку высушенных листьев, весом от 15 до 20 мг и поместить нарезку каждого образца в отдельную пробирку;
- измельчить материал с помощью металлических шариков и прибора для гомогенизации;
- Из пробирки с гомогенатом извлечь металлический шарик и добавить 300 мкл лизирующего раствора и 3 мкл РНКазы в каждую пробирку, затем перемешать с помощью вортекса;
- Инкубировать пробирки 1 час при температуре 60<sup>0</sup> С, периодически помешивая;
- К лизату добавить 100 мкл осаждающего раствора в каждую пробирку и перемешать на вортексе;
- Центрифугировать смесь при 13000 об. в течение 5 минут. После центрифугирования на дне должен образоваться плотный осадок;
- Перенести супернатант полностью, не задевая осадок, в чистые пробирки;
- Добавить 300 мкл осаждающего раствора, перемешать до

появления видимого осадка ДНК;

– Центрифугировать смесь при 13000 об. в течение 5 минут, затем осторожно слить надосадочную жидкость и подсушить пробирки в термостате в течение 10-15 мин при 37<sup>0</sup>С до полного высыхания;

– Добавить 400 мкл осаждающего раствора, перемешать несколько раз переворачиванием;

– Центрифугировать смесь при 13000 об. в течение 2 минут, затем осторожно слить надосадочную жидкость и выдерживать пробирки в термостате в течение 10-15 минут при 37<sup>0</sup>С до полного высыхания;

– Добавить к осадку 30-50 мкл элюирующего раствора. Перемешать и прогреть при 65<sup>0</sup>С 5 минут до растворения ДНК;

– Полученный раствор ДНК хранить при -20<sup>0</sup>С.

### 2.3. Анализ интрогрессивных линий мягкой пшеницы с помощью ПЦР

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 (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика праймеров

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов (5' – 3')	Источник
<i>Lr10</i>	<i>Lrk10-D1</i>	GAAGCCCTTCGTCTCATCTG	Schachermayr et al., 1997
	<i>Lrk10-D2</i>	TTGATTCATTGCAGATGAGATCACG	
<i>Lr25</i>	<i>Lr25F20</i>	CCACCCAGAGTATACCAGAG	Procunier, 1995
	<i>Lr25F19</i>	CCACCCAGAGCTCATAGAA	
<i>Lr26</i>	SCM9F	TGACAACCCCTTTCCCTCGT	Weng et al., 2007
	SCM9R	TCATCGACGCTAAGGAGGACCC	
<i>Lr28</i>	SCS421F	ACAAGGTAAGTCTCCAACCA	Cherukuri et al., 2005
	SCS421L	AGTCGACCGAGATTTTAACC	

Продолжение таблицы 1

Ген	Праймер	Последовательность нуклеотидов (5' – 3')	Источник
<i>Lr34</i>	scLV34F	GTTGGTTAAGACTGGTGATGG	Lagudah et al., 2006
	scLV34R	TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	
<i>Lr35</i>	BCD260F1	GAAGTTAAAGAGGTCTTGAC	Seyfarth et al., 1999
	35R2	TTTTGAGAATCAGTCATCAC	
<i>Lr47</i>	PS10R	GCTGATGACCCTGACCGGT	Helguera et al., 2000
	PS10L	TCTTCATGCCCGGTCGGGT	
<i>Lr51</i>	S30-13L	GCATCAACAAGATATTCGTTATGACC	Helguera et al., 2005
	AGA7-759R	TGGCTGCTCAGAAAACCTGGACC	
<i>Lr66</i>	16-S13F	GGTGAACGCTAAACCCAGGTAACC	Marais et al., 2010
	16-S13R	CAACCTGGGAAGATGCTGAG	

Концентрация компонентов смеси для проведения ПЦР выбиралась следующая: 1x PCR buffer (50мМ KCl, 20 мМ трис-Н Cl, рН 8,4, 2-5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01% твин-20), 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, по 0,2 мМ каждого dNTP, 12.5 pmol каждого праймера, 50 нг ДНК и 1 ед. Taq-полимеразы.

Для проведения ПЦР использовались термоциклеры Esco Healthcare Swift MaxPro. Температурные условия для работы праймеров приведены в таблице 2.

В качестве положительных контролей использовались образцы ДНК *Ae. speltoides*, синтетической формы Авродес, почти изогенных линий сорта Thatcher. В качестве отрицательных контролей использовались образцы ДНК пшеничных сортов Аврора, Краснодарская 99.

Таблица 2 – Условия ПЦР для праймеров, использованных в работе

Маркер к гену	Условия амплификации	Мол. вес продукта, п.н.	Источник
<i>Lr10</i>	94°C 3 мин; 30 циклов (94°C - 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 1 мин); 72°C – 10 мин.	282	Schachermayr et al., 1997
<i>Lr25</i>	94°C 5 мин; 35 циклов (94°C - 30 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 1 мин); 72°C – 10 мин.	1800	Procunier D., 1995

Продолжение таблицы 2

Маркер к гену	Условия амплификации	Мол. вес продукта, п.н.	Источник
<i>Lr26</i>	95°C 3 мин; 30 циклов (94°C - 45 сек, 60°C - 1 мин, 72°C - 90 сек); 72°C – 5 мин.	207, 228	Weng et al., 2007
<i>Lr28</i>	95°C 2 мин; 40 циклов (94°C - 1 мин, 60°C - 1 мин, 72°C - 1 мин); 72°C – 7 мин.	570	Cherukuri et al., 2005
<i>Lr34</i>	94°C 5 мин; 40 циклов (94°C - 45 сек, 55°C - 45 сек, 72°C - 1 мин); 72°C – 7 мин.	150	Lagudah et al., 2006
<i>Lr35</i>	94° 3 мин; 35 циклов (94° 45 с, 60° 45 с, 72° 60 с); 72° 7 мин	900	Seyfarth et al., 1999
<i>Lr47</i>	94° 5 мин; 35 циклов (94° 45 с, 61° 30 с, 72° 30 с); 72° 7 мин	282	Helguera et al., 2000
<i>Lr51</i>	94°C 4 мин; 40 циклов (94°C - 45 с, 52°C - 45 с, 72°C - 60 с); 72°C – 10 мин.	783	Helguera et al., 2005
<i>Lr66</i>	94°C 5 мин; 35 циклов (94°C - 45 с, 52°C - 60 с, 72°C - 60 с); 72°C – 10 мин.	900	Marais et al., 2010

Разделение продуктов амплификации проходило в 1,8-2% агарозном геле, окрашенным бромистым этидием. Гель помещался в специальные горизонтальные камеры производства компании BioRad, наполненные 10-кратным TBE-буфером. Электрофорез проходил под действием силы тока в 60-70 Ампер.

Для определения величины фрагмента использовался маркер с молекулярным весом 100 bp (10 фрагментов от 100 до 1000 bp) производства компании «СибЭнзим».

## 2.4 Статистические методы исследования

Статистический анализ данных включал как стандартные биометрические методы, так и методы многомерного статистического анализа. Из первой категории использовался однофакторный дисперсионный анализ с последующим вычислением наименьшей существенной разности (НСР) (Доспехов Б.А., 2011). Для оценки связей между признаками применяли парный коэффициент корреляции Пирсона (Лакин Г.Ф., 1990).

Анализ комплексов признаков был основан на широком использовании дискриминантного анализа, позволяющего изучать межгрупповые различия при условии минимизации внутригрупповой изменчивости. В этом случае достигались объективные оценки сходства-различия групп (Афифи А., Эйзен С., 1982; Кендалл М. Дж., Стьюарт А., 1976; Клекка У.Р., 1989).

Для выявления линий, перспективных по продуктивности, была выполнена их классификация с использованием кластерного анализа, позволяющего разделять объекты, описанные по комплексу признаков на группы сходные между собой – кластеры (Олдендерфер М.С., Блэшфилд, Р.К. 1989).

Все вычисления выполнялись с использованием программы STATISTICA.

## 2.5 Цитологические методы исследований

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

Проращивание семян проводилось в чашках Петри на влажной фильтровальной бумаге в ростовой камере. Наклюнувшиеся семена помещались в холодильник при температуре 4-5°C на сутки, затем снова переносились в ростовую камеру. Перед фиксацией корешки длиной 0,8-1,5

см выдерживали в насыщенном растворе  $\alpha$ -бромнафталина при температуре 4-5°C. Затем корешки фиксировали в 45% уксусной кислоте в течение 4-х часов, после чего помещали в смесь спирта и уксусной кислоты (3:1) на 4 часа, переносили раствор 70% этилового спирта, где материал хранился. Перед окрашиванием корешки промывались в дистиллированной воде. После их промывания проводился гидролиз в 1Н соляной кислоте при температуре 58-60° С в течение 10-12 мин. После гидролиза корешки 3-4 раза ополаскивались дистиллированной водой и помещались в реактив Шиффа на 1,5 часа для окрашивания. Перед приготовлением временных давленных препаратов и подсчетом хромосом корешки помещались в дистиллированную воду.

Конъюгация хромосом в процессе мейоза изучалась в материнских клетках пыльцы (МКП). Для этого использовались временные и постоянные давленные препараты пыльников. Заключаящей средой в препаратах служили смесь Гойера или канадский бальзам. Для фиксации пыльников отбирались колосья, расположенные между вторым и третьим верхними листьями стебля. Пыльники фиксировались и окрашивались в ацетокармине (раствор 4 г кармина в 100 мл горячей 45% уксусной кислоте). Приготовление постоянных препаратов проводилось следующим способом: полученные временные препараты проводились через серию спиртов разной концентрации (45%-70%- 96%- 100%) и заклеивались канадским бальзамом.

Для выяснения природы передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в интрогрессивные линии проводился подсчёт бивалентов, унивалентов и мультивалентов в М1 мейоза гибридных растений F<sub>1</sub>, которые были получены путем скрещивания этих линий с сортом мягкой пшеницы Краснодарская 99.

Для цитологического анализа использовался микроскоп Laboval 4 Karl Zeiss и АХЮ imager M2с увеличением 10 x 10; 40 x 10; 100 x 10 раз.

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. (Bedbrook J.R., et al., 1980; Rayburn A.L., Gill B.S., 1986; Schneider A. et al., 2003; Salina E.A. et al., 2006).

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

Расширение генетического разнообразия культивируемых сортов мягкой пшеницы является актуальной проблемой современной селекции. Прежде всего это необходимо для решения задач по поддержанию устойчивости к болезням. Вовлечение в селекционный процесс диких сородичей позволяет обогащать генофонд мягкой пшеницы генами, контролирующими хозяйственно-ценные признаки. От диких сородичей передано большинство ныне эффективных генов устойчивости к многим грибным болезням (McIntosh et al., 2012, 2016).

Вид *Aegilops speltoides* L. может служить донором 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*. На их основе были получены интрогрессивные линии мягкой пшеницы (Давоян Р.О., 2006).

Для вовлечения полученных линий в селекционный процесс необходимо провести их предварительное комплексное изучение. В первую очередь это проверка на цитологическую стабильность. Кроме того, линии должны обладать такими важнейшими признаками, как устойчивость к болезням, абиотическим стрессам, иметь определенные показатели качества зерна и продуктивности.

### 3.1 Оценка устойчивости к болезням

Поражение мягкой пшеницы болезнями приводит к значительному снижению урожайности и ухудшению качества зерна.

На территории Краснодарского края наиболее распространенными и вредоносными болезнями являются бурая ржавчина (возбудитель – *Puccinia triticina* Eriks.), жёлтая ржавчина (возбудитель – *Puccinia striiformis f. sp. tritici*) и мучнистая роса (возбудитель – *Blumeria graminis f. sp. tritici*). Высокую устойчивость ко всем этим болезням проявляет синтетическая форма Авродес. Поэтому важнейшим этапом исследования являлось изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* по устойчивости к названным грибным болезням.

Результаты оценки устойчивости к бурой ржавчине интрогрессивных линий мягкой пшеницы приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Характеристика интрогрессивных линий по устойчивости к бурой ржавчине, 2016-2018 гг.

№	Линия	Тип реакции, балл	№	Линия	Тип реакции, балл
1	4839	01	21	4885	4
2	4841	1	22	4887	1
3	4843	01	23	4889	01
4	4844	01	24	4891	4
5	4845	3	25	4892	3
6	4847	3	26	4893	4
7	4849	01	27	4894	3
8	4855	4	28	4895	3
9	4856	01	29	4896	3
10	4858	01	30	4897	01
11	4859	1	31	4903	3
12	4861	01	32	4904	4
13	4863	01	33	4906	01
14	4865	3	34	4908	01
15	4866	1	35	4909	1
16	4867	01	36	4915	01
17	4873	01	37	5041	01
18	4875	01	38	5047	01
19	4877	3	39	5053	2
20	4879	01	40	Аврора (ст)	4

По результатам полевой оценки 18 линий показали себя высокоустойчивыми с оценкой 01. Оценку 1 получили пять интрогрессивных линий с генетическим материалом *Ae. speltoides*. У линий 4866 и 5053 наблюдались небольшие пустулы ржавчины на листьях, поэтому она получила оценку как умеренно устойчивая. Умеренно восприимчивыми к бурой ржавчине оказались образцы под номерами 4845, 4847, 4865, 4877, 4892, 4894, 4895, 4896 и 4903. К линиям с высокой восприимчивостью, на уровне сорта реципиента Аврора (тип реакции 4), относятся 4855, 4885, 4891, 4893, 4904.

К числу наиболее вредоносных прогрессирующих болезней во многих зонах возделывания пшеницы следует отнести жёлтую ржавчину (*Puccinia striiformis*) (Яхьяуи А. и др., 2003; Ziyaev Z.M. et al., 2010). Оценка устойчивости линий к болезни проводилась по шкале Гаснера и Штрайба с модификациями (таблица 4).

Таблица 4 – Характеристика интрогрессивных линий по устойчивости к жёлтой ржавчине, 2016-2018 г.

№	Линия	Тип реакции, балл	№	Линия	Тип реакции, балл
1	4839	01	21	4885	1
2	4841	01	22	4887	1
3	4843	01	23	4889	01
4	4844	01	24	4891	01
5	4845	1	25	4892	2
6	4847	01	26	4893	1
7	4849	2	27	4894	1
8	4855	3	28	4895	01
9	4856	2	29	4896	01
10	4858	01	30	4897	2
11	4859	1	31	4903	2
12	4861	01	32	4904	01
13	4863	01	33	4906	1
14	4865	01	34	4908	1
15	4866	01	35	4909	01
16	4867	01	36	4915	1
17	4873	01	37	5041	1
18	4875	01	38	5047	1
19	4877	3	39	5053	2
20	4879	01	40	Ростислав (ст)	4

Высокоустойчивыми к желтой ржавчине оказались 20 интрогрессивных линий, получивших оценку 01 в баллах. 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.

Мучнистая роса ежегодно проявляется на посевах пшеницы. Она поражает все наземные части растения, и при сильном развитии болезни может распространяться до колоса. Изучаемые линии оценивались по степени поражения (Гешеле Э.Э., 1978). Результаты оценки приведены в таблице 5.

Таблица 5 – Характеристика интрогрессивных линий мягкой пшеницы по устойчивости к мучнистой росе, 2016-2018 гг.

№	Линия	Степень поражения, %	№	Линия	Степень поражения, %
1	4839	15	21	4885	10
2	4841	10	22	4887	30
3	4843	10	23	4889	10
4	4844	10	24	4891	10
5	4845	10	25	4892	30
6	4847	10	26	4893	10
7	4849	35	27	4894	10
8	4855	25	28	4895	10
9	4856	10	29	4896	30
10	4858	10	30	4897	20
11	4859	10	31	4903	30
12	4861	10	32	4904	25
13	4863	10	33	4906	10
14	4865	10	34	4908	10
15	4866	10	35	4909	10
16	4867	10	36	4915	10
17	4873	10	37	5041	15
18	4875	10	38	5047	10
19	4877	35	39	5053	10
20	4879	10	40	Аврора (ст)	40

Тридцать одна интрогрессивная линия мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltooides* имела степень поражения 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 4. 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.

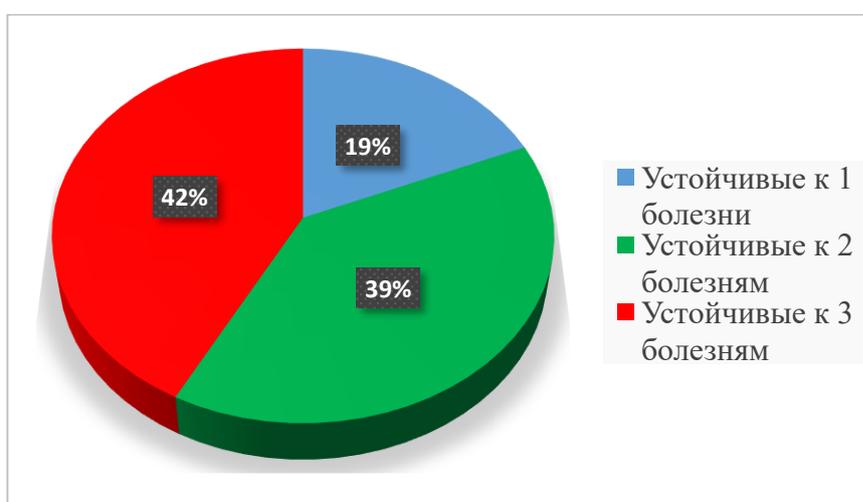


Рисунок 4 – соотношение интрогрессивных линий по устойчивости к одной, двум и трем болезням.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности передачи групповой устойчивости к бурой ржавчине, жёлтой ржавчине и мучнистой росе от вида *Ae. speltoides* мягкой пшенице посредством синтетической формы Авродес.

### 3.2 Гибридологический анализ устойчивости к бурой ржавчине

Определение природы устойчивости к бурой ржавчине, доминантности или рецессивности генов, детерминирующих этот признак, а также их число и наследуемость является важным этапом генетических исследований. С этой целью для проведения гибридологического анализа были отобраны три интрогрессивные линии мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*: 4909, 4915 и 5053. Выбор линий обусловлен их различным типом реакции на бурую ржавчину (тип реакции 01, 1 и 2 соответственно). Статистическая обработка данных по расщеплению гибридов в F<sub>2</sub> проводилась с помощью метода хи-квадрат.

Первый этап работы заключался в определении типа наследования устойчивости к болезни, а также количества генов, контролирующих этот признак. Все линии были скрещены с сортом Краснодарская 99, так как он является одним из наиболее цитологически стабильных и поражается бурой ржавчиной.

Все гибридные растения F<sub>1</sub> в комбинациях 4909/Кр99, 4915/Кр99 и 5053/Кр99 оказались устойчивыми к болезни, восприимчивых не наблюдалось. Это свидетельствует о доминантном типе наследования устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909, 4915 и 5053.

Задачей следующего этапа работы было определение количества генов, контролирующих устойчивость, поэтому путем самоопыления из каждой комбинации гибридов F<sub>1</sub> были получены растения F<sub>2</sub>. Распределение устойчивых и восприимчивых к бурой ржавчине растений приведено в таблице 6.

Таблица 6 – Соотношение устойчивых и восприимчивых растений F<sub>2</sub> в комбинациях 4909/Кр99, 4915/Кр99 и 5053/Кр99

Комбинация скрещивания	Всего растений	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		$\chi^2$	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

Согласно полученным результатам расщепления, было выдвинуто предположение, что устойчивость контролируется одним доминантным геном. В таком случае соотношение устойчивых растений к восприимчивым в  $F_2$  составляет 3:1. В комбинации 4909/Кр99 было проанализировано 186 растений  $F_2$ , среди которых 143 проявили устойчивость к бурой ржавчине, а 43 оказались восприимчивы. Значение хи-квадрат для этой комбинации составило 0,35, полученное значение входит в диапазон вероятности 0,75-0,5 и подтверждает выдвинутую гипотезу. В этом диапазоне вероятности находится значение  $\chi^2$  расщепления и в комбинации 5053/Кр99. Наиболее близким к теоретически ожидаемому соотношению оказалась комбинация 4915/Кр99, где значение хи-квадрат составило 0,12. Таким образом, предположение о наличии одного доминантного гена устойчивости в исследуемых интрогрессивных линиях 4909, 4915 и 5053 было достоверным с вероятностью  $0,75 > p > 0,50$ .

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  $F_2$  с помощью вычисления значения  $\chi^2$ , результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Соотношение устойчивых и восприимчивых гибридов  $F_2$  в комбинациях 4909/4915, 4909/5053 и 4915/5053

Комбинация скрещивания	Всего растений	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		$\chi^2$	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  $F_2$  в комбинации 4909/4915 были устойчивыми к бурой ржавчине. Такой результат опыта свидетельствует, что в линиях 4909 и 4915 устойчивость к болезни контролируется идентичными генами. Фактическое отношение устойчивых растений к восприимчивым в комбинациях 4909/5053 и 4915/5053 составило 187:11 ( $\chi^2=0,16$ ) и 192:11 ( $\chi^2=0,23$ ) соответственно, что достоверно теоретически ожидаемому расщеплению 15:1. Таким образом, гены устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909 и 4915 являются идентичными друг другу. 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  $F_2$  от комбинаций 4909/*Lr28*, 4909/*Lr35*, 5053/*Lr28* и 5053/*Lr35*. Соотношение устойчивых и восприимчивых растений представлено в таблице 8.

Таблица 8 – Соотношение устойчивых и восприимчивых гибридов  $F_2$  в комбинациях 4909/*Lr28*, 4909/*Lr35*, 5053/*Lr28* и 5053/*Lr35*

Комбинация скрещивания	Всего растений	Соотношение устойчивых и восприимчивых растений		$\chi^2$	P
		Эмпирическое	Теоретическое		
4909/ <i>Lr28</i>	197	186:11	184,69:12,31	0,15	0,75-0,50
4909/ <i>Lr35</i>	174	165:9	163,1:10,9	0,34	0,75-0,50
5053/ <i>Lr28</i>	184	174:10	172,5:11,5	0,21	0,75-0,50
5053/ <i>Lr35</i>	168	156:12	157,5:10,5	0,23	0,75-0,50

Перед вычислением значения  $\chi^2$  было выдвинуто предположение, что гены устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909 и 5053 отличаются от *Lr28* и *Lr35*. В этом случае число устойчивых и восприимчивых растений будет соотноситься в пропорции 15:1. Максимальное значение  $\chi^2$  составило 0,34 в

комбинации 4909/*Lr35*, минимальное – 0,15 в комбинации 4909/*Lr35*. Таким образом, подтверждена достоверность различия генов, контролирующих устойчивость к болезни, в линиях 4909 и 5053 от *Lr28* и *L35*. Так как ранее была установлена идентичность генетической природы устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909 и 4915, то последняя также является носителем гена устойчивости, отличного от *Lr28* и *Lr35*.

Метод гибридологического анализа позволяет проводить поиск определенных генов, но для этого он требует соблюдение важного условия – наличия тестерной линии, в которой уже был установлен анализируемый ген. В коллекции отдела биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко присутствовали такие образцы с генами *Lr28* и *Lr35*, в то время как известно, что вид *Ae. speltoides* является донором и других генов: *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*. Определить наличие этих генов в интрогрессивных линиях с помощью гибридологического анализа не представилось возможным в виду отсутствия тестерных линий.

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

Идентификация генов, детерминирующих ценные хозяйственные признаки, является важным этапом селекционно-генетических исследований. Использование ДНК-маркеров уже зарекомендовало себя как быстрый и эффективный способ идентификации генов, детерминирующих различные признаки. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с классическими селекционными подходами. При использовании ДНК-маркеров не требуется проводить скрещивания родительских форм и получать гибридные популяции вторых или третьих поколений, что существенно уменьшает время проведения работ. Также молекулярные методы обладают высокой точностью своих результатов.

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.

#### **3.3.1 Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr28*, *Lr35*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66***

На первом этапе работ проводился анализ материала на наличие генов, источником которых является *Ae. speltoides*.

Эффективный на территории России ген *Lr28* передан мягкой пшенице от *Aegilops speltoides* и локализован в длинном плече хромосомы 4А (McIntosh et al., 2012). А. А. Kumar и Р. Raghavaiah показали, что ген *Lr28*, в отличие от большинства чужеродных генов, обуславливает повышение урожайности. Для его идентификации во многих странах используют маркеры различных типов:

STS (*Lr28-01/02*), TPSCAR (SCS421<sub>570</sub>), SSR (Xgwm160, wmc313, bars327, bars343), поэтому первоначальной задачей стояло выявить наиболее эффективный маркер для идентификации гена *Lr28*. Эта работа в отделе биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко проводилась уже на протяжении нескольких лет, было апробировано 6 маркеров на основании данных различных литературных источников, и все они оказались не специфическими, так как искомые фрагменты амплифицировались как в положительных, так и в отрицательных контролях. В итоге удалось определить, что маркер SCS421<sub>570</sub> является эффективным и специфичным на нашем материале, несмотря на то, что А. Serfling с соавторами (2011) описал его при скрининге *Lr*-линий как неэффективный.

Первоначально на основе нуклеотидной последовательности фрагмента, амплифицированного с помощью RAPD-праймера S421<sub>640</sub> у линий с геном *Lr28*, создан SCAR-маркер SCS421<sub>640</sub>. При использовании праймеров SCS421<sub>640</sub> у линий с геном *Lr28* выявлялось два фрагмента: специфичный для гена *Lr28* с молекулярным весом 640 п.о. и неспецифичный, незначительно отличающийся по размеру и затрудняющий оценку параметров. Проведенная оптимизация условий ПЦР и состава реакционной смеси не позволила устранить амплификацию неспецифического продукта, в результате был подобран новый TPSCAR-маркер (truncated polymorphic sequence characterized amplified region marker) SCS421<sub>570</sub>. При использовании праймеров SCS421<sub>570</sub> у образцов с геном *Lr28* наблюдается продукт амплификации с молекулярным весом 570 п.н. (Cherukuri D.P. et al., 2005).

Наличие маркера SCS421<sub>570</sub>, сцепленного с эффективным геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr28*, установлено в 10 образцах *Ae. speltoides* и в синтетической форме Авродес. Однако по итогам анализа интрогрессивных линий мягкой пшеницы, полученных на основе Авродес, присутствие гена *Lr28* не установлено (рисунок 5).

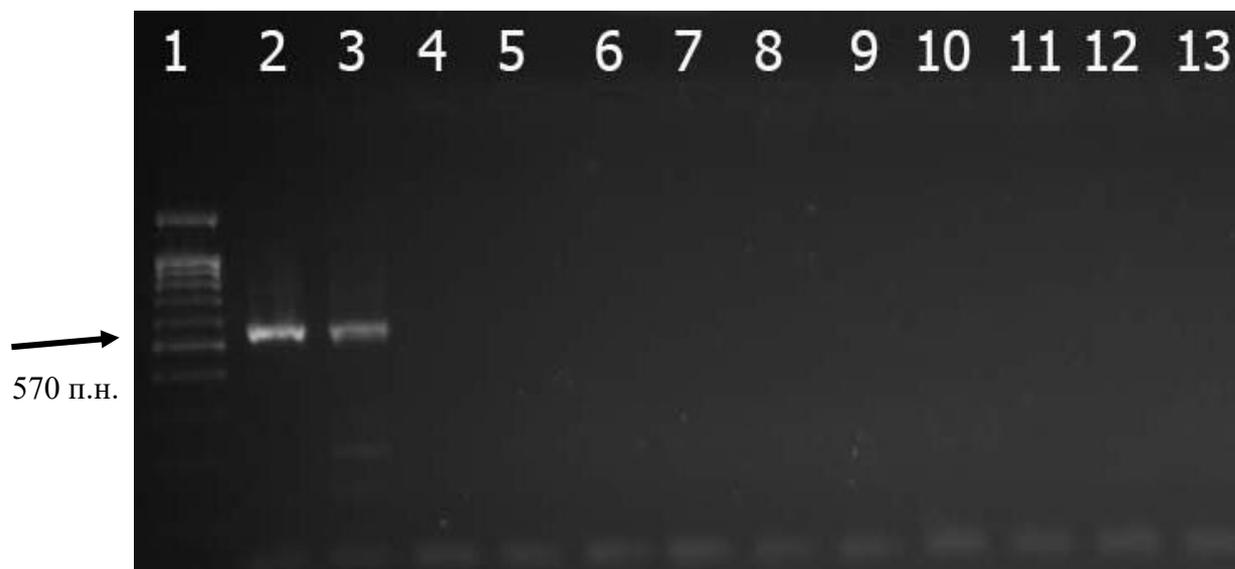


Рисунок 5 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr28* в 2% агарозном геле: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – образец *Ae. speltooides* C4; 3 – Авродес; 4-13 – линии с генетическим материалом *Ae. speltooides*.

Вид *Ae. speltooides* является источником гена *Lr35*. Он был передан в мягкую пшеницу в форме транслокации на длинном плече хромосомы 2В. Ген устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr39* также находится в составе этой транслокации (Kerber E.R., Dyck P.L., 1990).

В Западной Европе и Северной Америке ген *Lr35* проявляет высокую эффективность (Mesterhazy A. et al., 2000). Поражаемость линий ThatcherLr35 варьировала от 0 до 50% в полевых условиях Пушкинских лабораторий ВИР в 2002-2010 гг. (Гультяева Е.И., Баранова О.А., 2010).

Наличие генов *Lr35* и *Sr39* является гарантией устойчивости растений к бурой и стеблевой ржавчинам, в том числе к расе *Ug99* (Singh et al., 2006). Но помимо них в транслокации присутствуют гены, влияющие на снижение урожайности, поэтому такая транслокация не используется в коммерческих сортах мягкой пшеницы (McIntosh J., Wellings C.R., Park R.F., 1995). Возможность уменьшения чужеродного сегмента была описана R. Mago с соавторами (2009). Группе ученых удалось создать линию, несущую гены *Lr35* и *Sr39* без участка хромосомы, в котором локализованы гены, детерминирующие снижение продуктивности (Mago R. et al., 2009).

В мировой литературе описано пять маркеров генов *Lr35/Sr39*. В ходе работ были опробованы несколько маркеров как непосредственно к гену *Lr35*, так и к гену *Sr39*. По итогам апробации маркер BCD260F1/35R2 был выбран как оптимальный для скрининга исследуемых в работе образцов.

Маркер BCD260F1/35R2 был разработан R. Seyfarth с соавторами в 1999 году. В ходе работ группы под руководством R. Seyfarth был протестирован набор RFLP-маркеров, которые были локализованы в 2В хромосоме. Среди них маркер BCD260 был идентифицирован как сцепленный с геном *Lr35*. В последствии он был конвертирован в STS и CAPS-макеры. При использовании STS-маркера BCD260F1/35R2 у образцов-носителей гена *Lr35* амплифицируется фрагмент с молекулярным весом 931 п.н.

Десять образцов *Ae. speltoides* и синтетическая форма Авродес были идентифицированы как образцы, содержащие ген *Lr35* по итогам анализа с помощью ПЦР, однако искомый ген все же не был выявлен в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы (рисунок 6).



Рисунок 6 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr35*: 1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – образец *Ae. speltoides* C5; 4 – Авродес; 5–13 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Ген *Lr47* локализован в хромосоме 7S вида *Ae. speltoides*. В мягкую

пшеницу он был передан в форме транслокации в коротком плече хромосомы 7A (Dubcovsky J. et al., 1998). Во многих странах, в том числе и в России, ген *Lr47* является высокоэффективным (Zhemchuzhina A.I., Kurkova N.N., 2010; Shabnam N. et al., 2011). Сорт Pavon является донором этого гена для использования в программах MAS (Gupta P. K., Langridge P., Mir R. R., 2010).

На основе RFLP-маркера *Xabc465* был получен маркер PS10. При разделении продуктов амплификации с использованием пары праймеров PS10R и PS10L фрагмент размером 282 п.н. является индикатором наличия участка хромосомы 7S *Ae. speltoides*, в которой локализован ген *Lr47* (Helguera M., Khan I.A., Dubcovsky J., 2000).

В ходе анализа с помощью ПЦР, проведённого нами в лаборатории биотехнологии НЦЗ, искомый ген был идентифицирован лишь в образце *Ae. speltoides* №3256, но не был обнаружен в синтетической форме Авродес и в исследуемых линиях (рисунок 7).

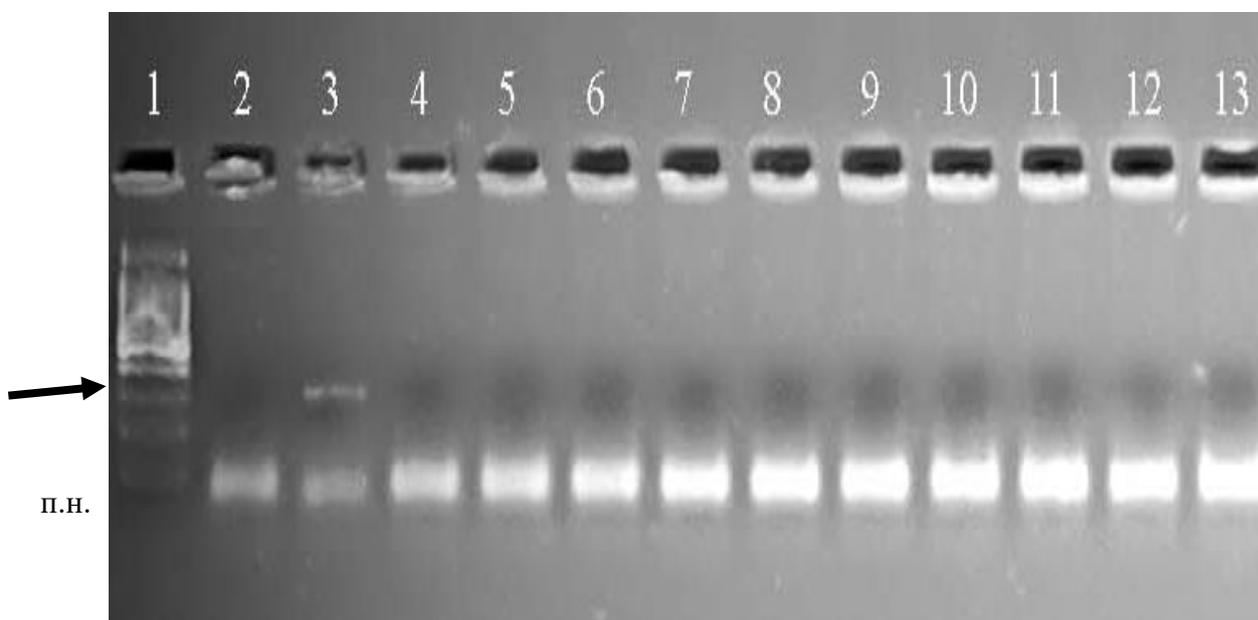


Рисунок 7 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr47*: 1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – образец *Ae. speltoides* 3256; 4 – Авродес; 5–13 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Гену устойчивости к бурой ржавчине *Lr51* первоначально было дано название *LrF7* (Dvorak J., 1977). Он передан в мягкую пшеницу в составе транслокации на хромосоме 1В. Растения, гомозиготные по *Lr51*, проявляют высокий уровень устойчивости, в то время как у гетерозигот этот уровень является достаточно низким (Dvorak J., 1977).

Helguera с соавторами (2005) разработали CAPS-маркер для гена AGA7, локализованного в транслокации *Ae. speltoides*, содержащей *Lr51*. Праймеры S30-13L и AGA7-759R были предназначены для амплификации аллелей гена AGA7 только в геномах S и В. Поскольку сегмент *Ae. speltoides* не рекомбинирует с хромосомами пшеницы, достаточно только одного маркера для идентификации гена *Lr51* для его использования в селекционных программах.

Наличие гена *Lr51* было выявлено и в образцах *Ae. speltoides*, и в синтетической форме Авродес. Однако во всех анализируемых интрогрессивных линиях присутствовал фрагмент амплификации 783 п.н., который указывает на отсутствие гена *Lr51* (рисунок 8).

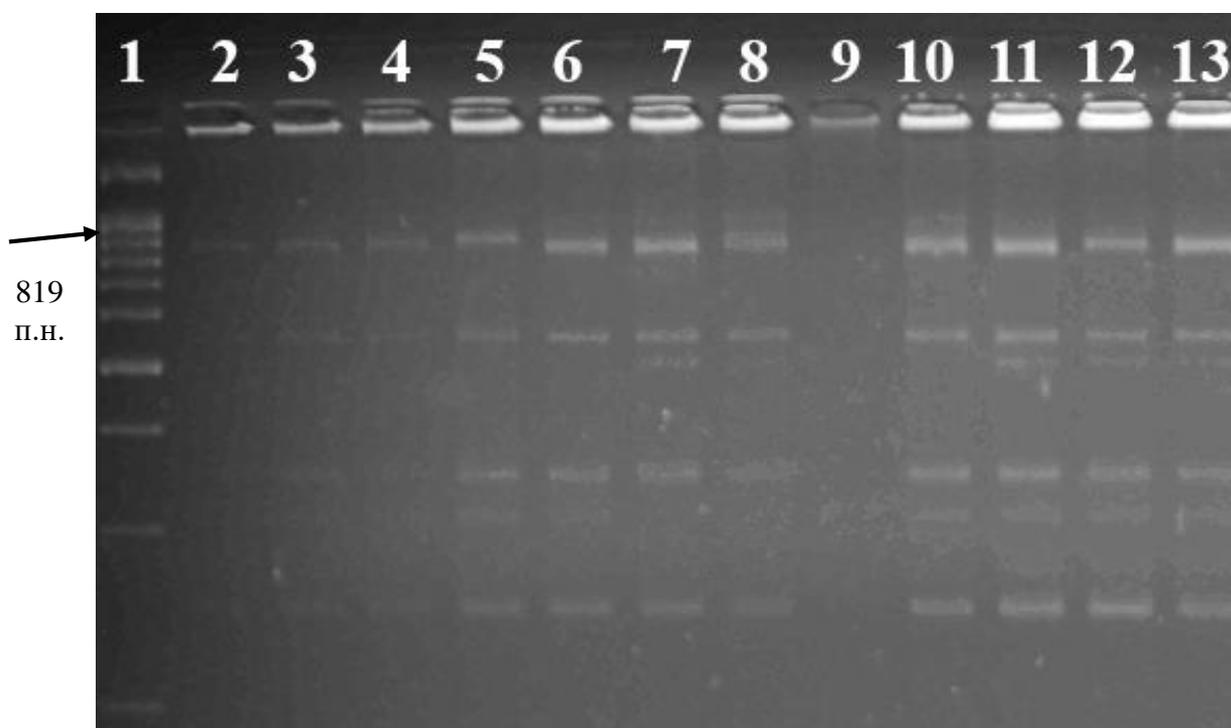


Рисунок 8 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации, к диагностическому маркеру гена *Lr51*. 1 – маркер длины; 2-4 – сорта Аврора, Краснодарская 99, Гром; 5 – Авродес; 6-13 – линии с генетическим материалом *Ae. speltoides*

Комплекс генов *Gc* был впервые передан в мягкую пшеницу совместно с геном устойчивости к стеблевой ржавчине со временным обозначением *SrS24* от образца *Ae. speltoides ligustica* accession 150 (Marais G.F., Pretorius Z.A. 1996). В полученных линиях фертильность не превышала 50% у гетерозигот, а у гомозигот варьировала от 0 до 100%, по данным Marais, 1996. Несмотря на попытки разбить этот комплекс с помощью облучения и мутагенеза, сегрегаты без системы *Gc* не были восстановлены. В 2003 году Marais использовал образец *Ae. speltoides ssp ligustica* 691 (полученный из Израиля) для передачи устойчивости бурой ржавчины (*LrS13*), стеблевой ржавчины (*SrS13*) и жёлтой ржавчины (*YrS13*) в мягкую пшеницу. Как и в предыдущих работах, устойчивость передалась в сцепке с комплексом генов *Gc*, которые оказывали серьезное влияние на фенотип и развитие растений, продуктивность и качество семян.

В 2010 году Marais удалось разбить этот комплекс при помощи супрессоров *Ph*-генов, переданных от *Ae. speltoides*. Благодаря этому был разработан маркер к гену *LrS13*, который позже был описан как *Lr66* в каталоге McIntosh (2012).

С использованием пары праймеров 16-S13F/R на первом этапе был проведен анализ 10 образцов *Ae. speltoides* коллекции отдела биотехнологии НЦЗ им. П.П. Лукьяненко и синтетической формы Авродес. Данный маркер был идентифицирован в 6 образцах *Ae. speltoides*, но не был выявлен в синтетической форме Авродес и, соответственно, в интрогрессивных линиях (рисунок 9).

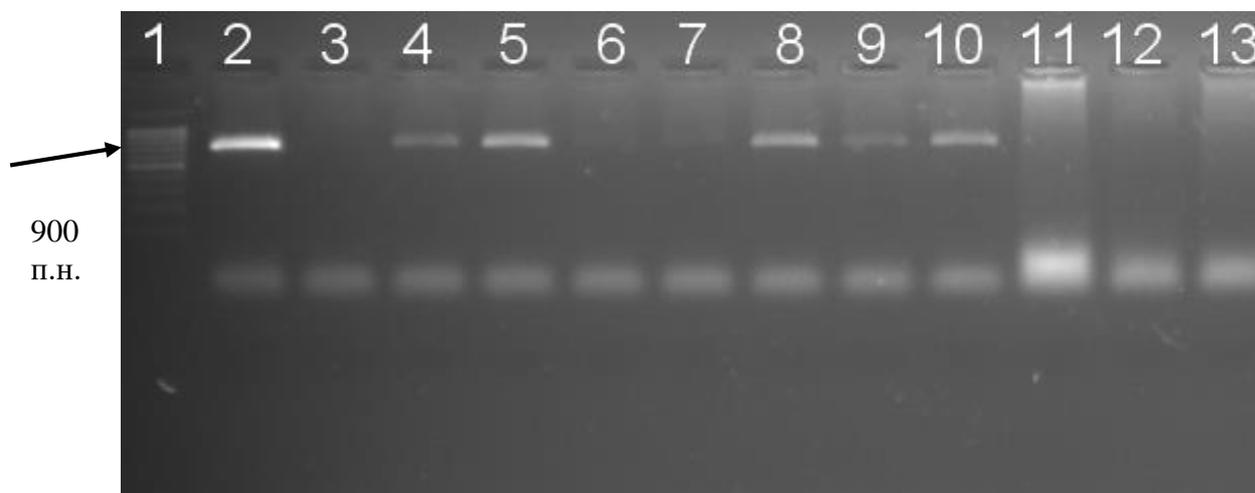


Рисунок 9 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гену *Lr66* в 1,8% агарозном геле: 1 – маркер длины; 2-10 – образцы *Ae. speltoides*; 11 – Авродес; 12 – сорт Аврора; 13 – сорт Краснодарская 99.

Таким образом, линии, полученные на основе синтетической формы Авродес не являются носителями генов, которые были ранее переданы от *Ae. speltoides*. Однако в исследуемых линиях могут находиться гены устойчивости к бурой ржавчине, источником происхождения которых является *Triticum aestivum*, среди которых гены *Lr10* и *Lr34*. Также линии анализировались на наличие генов *Lr25* и *Lr26*, источником которых является *S. sereale*, при участии которой был получен сорт мягкой пшеницы Аврора.

### 3.3.2 Идентификация генов устойчивости *Lr10*, *Lr34*, *Lr25*, *Lr26*.

Ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr10* локализован в 1AS хромосоме, его донорами являются сорта мягкой пшеницы Lee и Timstein. Массовое возделывание сортов с этим геном в разных частях земного шара стало причиной потери его эффективности (McIntosh et al., 1995). Ген *Lr10* является одним из самых часто встречающихся в российских сортах. Так по данным Гультьяевой (2012) около 34% сортов отечественной селекции являются его носителями. По данным Абловой (2014) на территории Краснодарского края ген *Lr10* может быть эффективным в сочетании с генами *Lr26* и *Lr34*.

Для идентификации гена *Lr10* использовался STS-маркер *Lrk10-D* (Schachermayr et al., 1997), при использовании которого в образцах с наличием гена амплифицируется фрагмент весом 282 п.н.

В ходе анализа с помощью ПЦР искомый фрагмент амплифицировался только с ДНК положительного контроля – сорта Краснодарская 99. В интрогрессивных линиях амплификация отсутствовала, следовательно, ген *Lr10* не был идентифицирован ни в одной из линий (рисунок 10).

Донором гена *Lr34* является сорт мягкой пшеницы Frontana. Данный ген локализован на хромосоме 7DS и тесно сцеплен генами устойчивости к мучнисто росе (*Pm38*), желтой ржавчине (*Yr18*) и геном некроза верхушек листьев (*Ltn1*) (Dyck P.L., 1977; 1987).

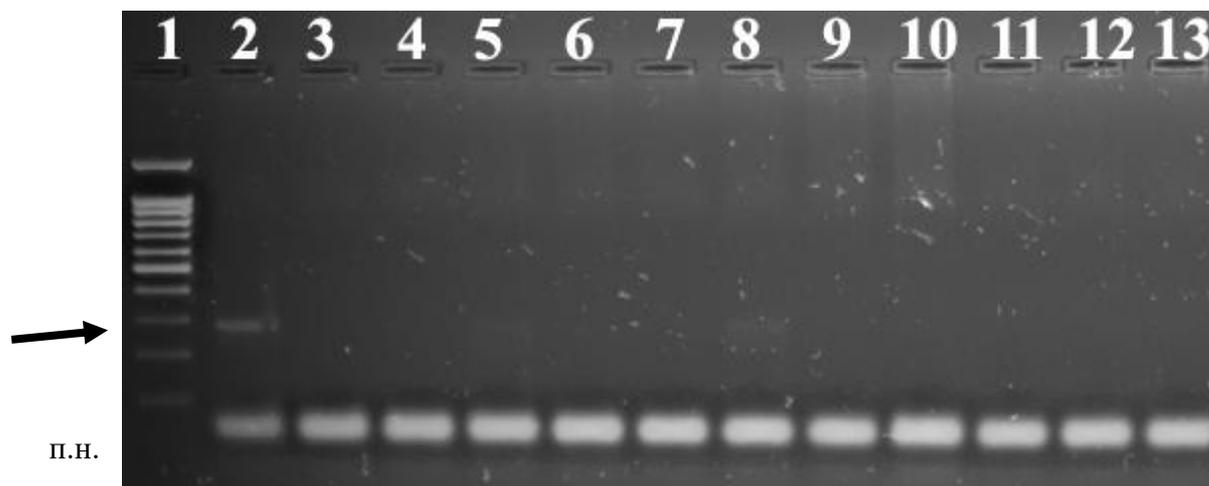


Рисунок 10 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr10* в 1,8% агарозном геле: 1 – маркер длины; 2 – сорт Краснодарская 99; 3 – Авродес; 4-13 – интрогрессивные линии.

Ген *Lr34* может обеспечить устойчивость качественного и количественного типа. Особенности такого типа устойчивости является длительный латентный период, уменьшение числа пустул на единицу площади поверхности листа, их размера и количества спор в самой пустуле. Несмотря на потерю эффективности, ген *Lr34* широко используется в селекционных программах разных стран, потому что его комбинация с другими генами возрастной и ювенильной устойчивости дает аддитивный эффект и является основой длительной устойчивости сортов к бурой ржавчине (Singh R.P., Trethowan R., 2007).

В литературе описаны несколько маркеров различных типов к гену *Lr34*. Для скрининга материала в рамках данной работы использовался кодоминантный STS-маркер scLV34, так как он наиболее часто применяется во всем мире. При использовании пары праймеров scLV34F/R может амплифицироваться два фрагмента: первый, размером 150 п.о., показывает наличие функциональной аллели гена, а второй, размером 229 п.о. – нефункциональной. Наличие обоих фрагментов при анализе указывает на гетерозиготное состояние гена (Lagudah E.S. et al., 2006).

В результате анализа с помощью ПЦР в 17 исследуемых линиях был

идентифицирован ген *Lr34*. У линии 4849 наблюдалось два фрагмента амплификации, что указывает на гетерозиготное состояние этого гена (рисунок 11).

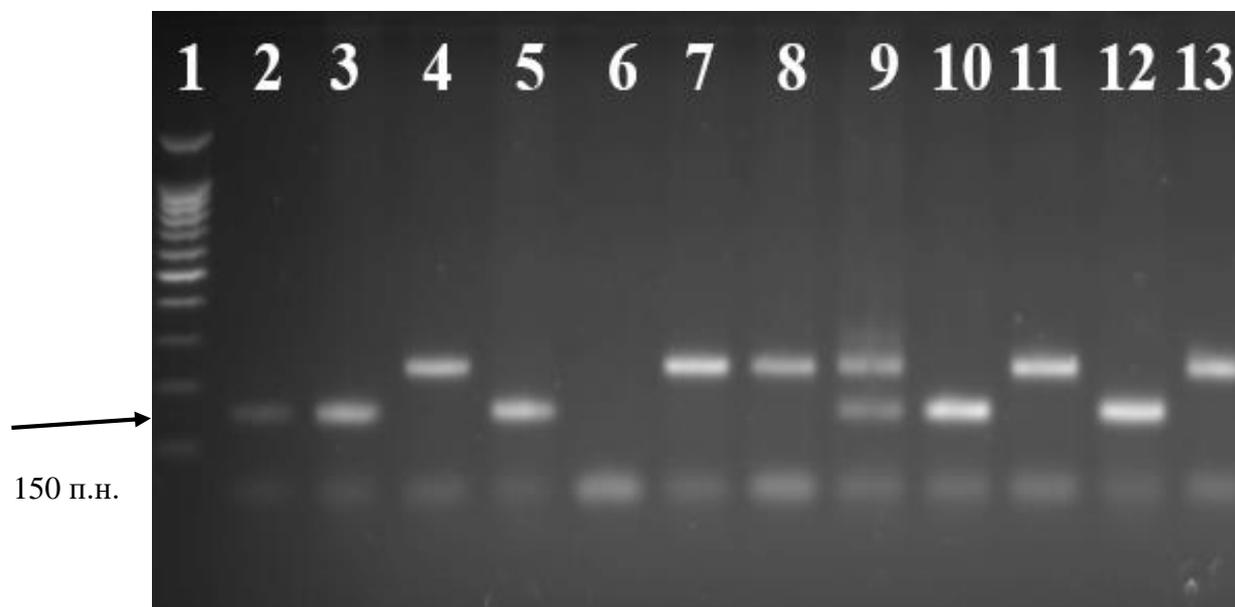


Рисунок 11 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr34* в 1,8% агарозном геле: 1 – Маркер молекулярного веса; 2 – положительный контроль; 3-26 – интрогрессивные линии с генетическим материалом *Ae. speltooides*.

Транслокация 1RS, донором которой является сорт ржи *Petkus*, является одной из самых распространенных в коммерческих сортах мягкой пшеницы. В её составе локализованы сразу несколько генов устойчивости к различным заболеваниям: к бурой (*Lr26*), стеблевой (*Sr31*) и желтой (*Yr9*) ржавчине, а также к мучнистой росе (*Pm8*) (McIntosh R.A. et al., 1995). Для образцов, имеющих транслокацию 1RS, характерно увеличение корневой массы, что обеспечивает засухоустойчивость (Kim W. et al., 2004).

Ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr26* начал массово использоваться в селекционных программах в конце 1960-х годов. Передача этого гена в коммерческие сорта мягкой пшеницы и последующее их возделывание на обширных посевных площадях привело к образованию вирулентных рас гриба-возбудителя бурой ржавчины. По данным Е.И. Гультовой (2012) этот ген не является эффективным во всех регионах России. Однако использование

*Lr26* в комбинации с другими генами способно давать положительный эффект в борьбе с бурой ржавчиной.

В литературе описано несколько ДНК-маркеров к гену *Lr26*. В ходе работы использовался маркер SCM9, который является универсальным и позволяет выявить не только наличие ржаной транслокации 1RS, но и её локализацию. Так ампликон размером 207 п.н. идентифицирует 1BL.1RS транслокацию, а 228 п.н. – 1AL.1RS транслокацию (Saal B., Wricke G., 1999; Weng Y. et al., 2007).

В качестве положительного контроля для транслокации 1RS.1BL служил сорт мягкой пшеницы Аврора. Всего при помощи этого маркера было обнаружено 20 интрогрессивных линий с генетическим материалом от *Ae. speltoides*, несущих транслокацию 1BL.1RS. Транслокация 1AL.1RS не была идентифицирована в анализируемых линиях (рисунок 12).

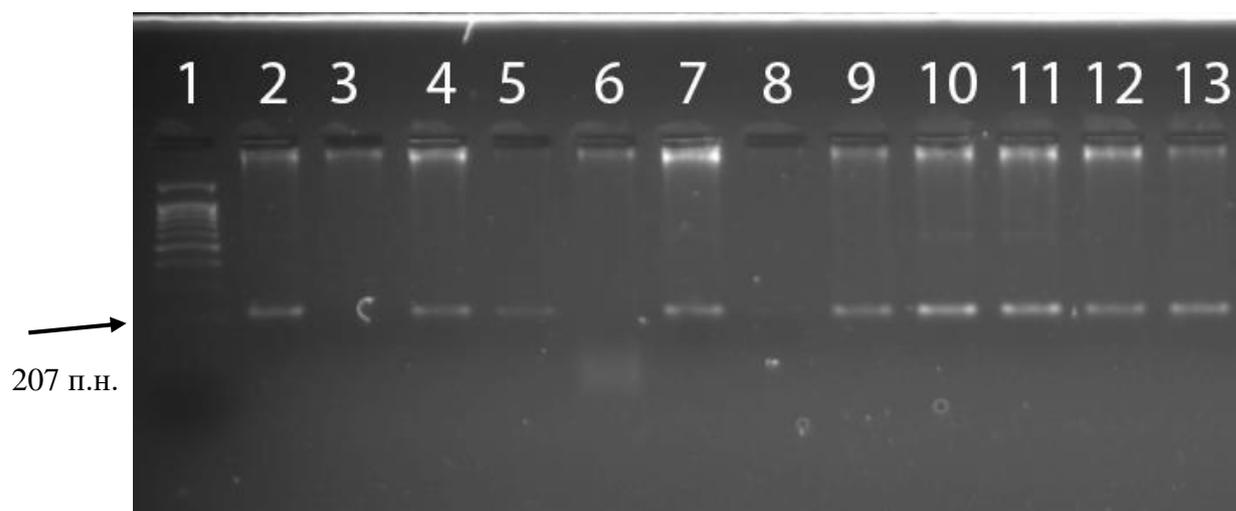


Рисунок 12 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr26* 1,8% агарозном геле: 1 – маркер молекулярного веса; 2 – сорт Аврора; 3-13 интрогрессивные линии с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Ген устойчивости *Lr25*, локализованный на хромосоме 2R, был перенесен в хромосому 4BS мягкой пшеницы от сорта ржи Rosen (McIntosh R.A. et. al., 1995). Однако данная транслокация не получила широкого использования в коммерческих сортах из-за негативных эффектов на

агронимические признаки (McIntosh R.A. et al., 1995).

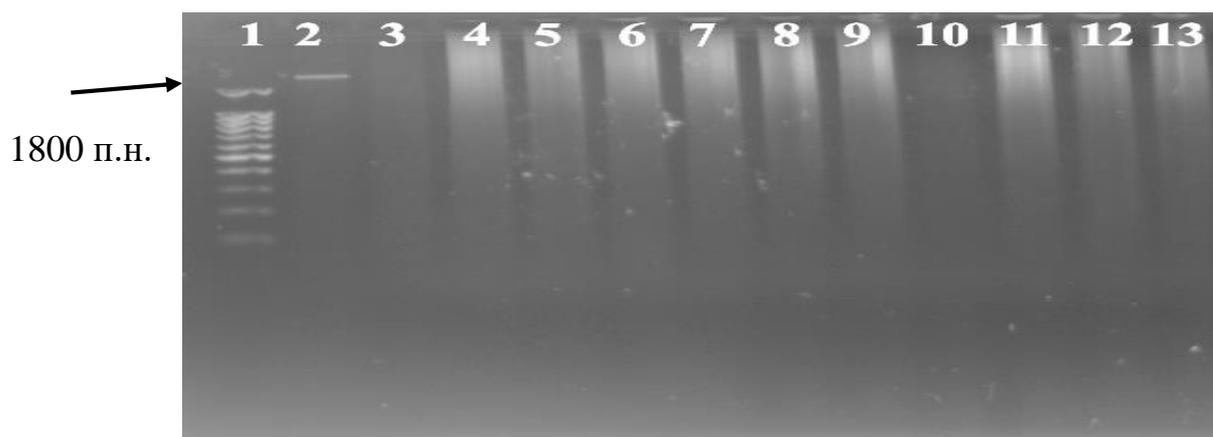


Рисунок 13 – Электрофоретическое разделение продуктов амплификации к диагностическому маркеру гена *Lr25* в 1,8% агарозном геле. 1 – Маркер молекулярного веса; 2 – Линия TcLr25; 3 – Аврора; 4-13 – интрогрессивные линии с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Для идентификации гена *Lr25* был разработан SCAR-маркер Lr25F20/Lr25R19 (Procunier J.D. et al., 1995). После амплификации у образцов-носителей этого гена образуется фрагмент массой 1800 п.н.

Искомый фрагмент не был идентифицирован в исследуемых интрогрессивных линиях с генетическим материалом *Ae. speltoides* (рисунок 13).

По итогам анализа ни в одной линии не было идентифицировано известных генов устойчивости, которые могли быть переданы от *Ae. speltoides*. Многие линии являются носителями генов *Lr34* и *Lr26*, которые не являются эффективными в Российской Федерации (Гультяева Е.И., 2012). Также стоит отметить несколько линий, которые имеют комбинацию из двух генов: *Lr34* + *Lr26* (таблица 9). Однако данная комбинация не является гарантией устойчивости на территории Краснодарского края (Аблова И.Б. и др., 2014), что и было подтверждено результатами полевой оценки устойчивости к бурой ржавчине. Так линии 4894 и 4895 являются носителями одновременно двух генов, но поражаются болезнью.

Таблица 9 – 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

Таким образом, полученные результаты могут свидетельствовать о том, что в изученных интрогрессивных линиях мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* устойчивость к бурой ржавчине может контролироваться ранее неизвестными генами. Установление генетического контроля устойчивости к бурой ржавчине в этих линиях требует дальнейших исследований.

## ГЛАВА 4. ХОЗЯЙСТВЕННО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ.

### 4.1 Оценка интрогрессивных линий мягкой пшеницы по компонентам продуктивности

В селекционно-генетических исследованиях изучение генотипической (межлинейной или межсортовой) изменчивости по количественным признакам традиционно начинается с проведения дисперсионного анализа. При этом, открывается возможность ответа на два вопроса: существуют ли различия между сравниваемыми группами и если существуют, то какова их доля в общей изменчивости признаков. Оценка признаков в селекционном материале проводилась в течении двух лет (2017 и 2018 года). Такая схема эксперимента соответствовала модели двухфакторного перекрестного дисперсионного анализа, позволяющего оценить как эффекты самих факторов, так и их взаимодействие. Результаты анализа структуры изменчивости признаков представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты двухфакторного перекрестного анализа признаков-компонент продуктивности в линиях и сортах пшеницы, 2017-2018 г.

Изменчивость	SS	df	mS	F	F <sub>0,05</sub>	p <sup>in</sup> , %
Высота растения						
Генотипическая	4567,81	10	456,78	630,34	1,98	94,57
Между годами	219,51	1	219,51	302,91	3,99	4,54
Взаимодействие	21,12	10	2,11	2,91	1,98	0,29
Остаточная	45,65	63	0,72			0,60
Длина колоса						
Генотипическая	33,27	10	3,33	41,65	1,98	91,04
Между годами	0,002	1	0,002	0,03	3,99	0,0
Взаимодействие	0,03	10	0,003	0,03	1,98	0,0
Остаточная	5,03	63	0,08			8,96
Количество колосков в колосе						
Генотипическая	73,09	10	7,31	9,08	1,98	58,59
Между годами	0,18	1	0,18	0,22	3,99	0,0
Взаимодействие	21,82	10	2,18	2,71	1,98	12,40
Остаточная	50,73	63	0,81			29,01

Продолжение таблицы 10

Изменчивость	SS	df	mS	F	F <sub>0,05</sub>	p <sup>in</sup> , %
Число зёрен в колосе						
Генотипическая	2258,81	10	225,88	5,73	1,98	53,81
Между годами	63,91	1	63,91	1,62	3,99	0,71
Взаимодействие	227,96	10	22,80	0,58	1,98	0,0
Остаточная	2482,72	63	39,41			45,49
Масса зерна с колоса						
Генотипическая	10,89	10	1,09	8,73	1,98	65,90
Между годами	0,09	1	0,09	0,72	3,99	0,0
Взаимодействие	0,12	10	0,01	0,10	1,98	0,0
Остаточная	7,86	63	0,12			34,10
Масса 1000 зёрен						
Генотипическая	1773,75	10	177,38	29,39	1,98	87,05
Между годами	19,45	1	19,45	3,22	3,99	0,68
Взаимодействие	45,07	10	4,51	0,75	1,98	0,0
Остаточная	380,22	63	6,04			12,27
Масса зерна с 1 м <sup>2</sup>						
Генотипическая	2489670,00	10	248967,00	1293,15	1,98	99,34
Между годами	7714,91	1	7714,91	40,07	3,99	0,30
Взаимодействие	3209,09	10	320,91	1,67	1,98	0,05
Остаточная	12129,27	63	192,53			0,31
Число продуктивных колосьев с 1 м <sup>2</sup>						
Генотипическая	481951,00	10	48195,10	26,58	1,98	86,01
Между годами	2716,45	1	2716,45	1,50	3,99	0,17
Взаимодействие	20120,54	10	2012,05	1,11	1,98	0,37
Остаточная	114215,63	63	1812,95			13,45

Как следует из результатов дисперсионного анализа, генотипические различия были установлены для всех признаков, причем доля этих различий была весьма высока и для пяти признаков из восьми учтенных она превышала 75%. Только у признаков количество зерен в колосе, масса зерна с одного колоса и количество колосков в колосе различия между генотипами варьировали от 53% до 66%. Таким образом, была показана возможность для проведения дальнейшей селекции по продуктивности в рамках индивидуального отбора.

Различия между сезонами выращивания растений были незначительны и установлены в только двух случаях: для высоты растений (4,5%) и массы

зерна с 1 м<sup>2</sup> (0,3%). Также для двух признаков – высота растения и количество колосков в колосе был выявлен слабый эффект взаимодействия факторов (0,3% и 12,4%, соответственно).

Сравнение двух сезонов выращивания линий пшеницы было выполнено с использованием однофакторного дисперсионного анализа, где в качестве контролируемого фактора выступала межсезонная изменчивость (таблица 11).

Таблица 11 – Результаты однофакторного дисперсионного анализа основных климатических факторов за два периода выращивания (2016-2017 и 2017-2018 гг.)

Изменчивость	SS	df	mS	F	p-level
Количество осадков (мм)					
Межсезонная	272,70	1	272,70	0,25	0,62
Остаточная	24090,51	22	1095,02		
Температура (°C)					
Межсезонная	6,62	1	6,62	0,08	0,78
Остаточная	1842,82	22	83,76		
Примечание: p-level – вероятность ноль-гипотезы об отсутствии различий.					

Характер генотипических различий можно установить путем сравнения средних значений признаков с вычислением наименьшей существенной разности (НСР<sub>05</sub>).

На первом этапе линии оценивались по двум группам признаков: морфо-биологические и входящих в структуру урожая. В таблице 11 представлена характеристика линий по таким морфо-биологическим признакам, как высота растений, форма колоса, длина колоса, число колосков в колосе и число зёрен в колосе.

Таблица 11 – Характеристика интрогрессивных линий по некоторым морфо-биологическим признакам, 2017-2018 гг

Генотип	Высота растения, см	Форма колоса	Длина колоса, см	Число колосков в колосе, шт	Число зёрен в колосе, шт
4849	100,75	цилиндрический	10,88	21,50	45,50
4867	93,50	цилиндрический	9,13	21,50	39,00
4879	108,25	цилиндрический	9,25	22,50	47,50
4897	94,38	цилиндрический	9,25	21,00	51,63
4909	95,50	булавовидный	10,63	20,00	50,63
4915	94,38	булавовидный	9,13	22,00	53,25
5041	93,00	булавовидный	9,00	22,00	56,38
5047	102,75	булавовидный	9,94	23,00	52,50
5053	102,88	цилиндрический	9,75	23,00	50,50
Аврора (ст)	114,63	цилиндрический	10,25	20,50	42,75
Кр99 (ст)	89,63	цилиндрический	9,63	21,50	43,00
НСР <sub>05</sub>	1,20	-	0,4	1,26	8,84

Все линии отличаются от стандартных сортов по высоте растения. Наименьшим значением (93 см) этого признака обладает линия 5041, в то время как линия 4879 (108,25 см) является самой высокой, но не превышает показатель сорта Аврора (114,63 см). По форме колоса линии разделены на две группы: с цилиндрической (линии 4849, 4867, 4879, 4897 и 5053) и булавовидной (линии 4909, 4915, 5041 и 5047). Для длины колоса наименьшими оказались значения для линий 4867, 5041 и 4915, которые отличаются от значения стандарта. Линия 4849 обладает наибольшим значением признака (10,88 см). По средним значениям числа колосков в колосе линии 5047 и 5053 превышают значение стандартных сортов, в то время как остальные линии достоверно не отличаются от них по этому признаку. В ходе анализа средних значений количества зерен в колосе выделяются линии 4915, 5041 и 5047, которые обладают наибольшими

значениями признака и достоверно превышают таковые значения стандартных сортов Краснодарская 99 и Аврора.

Наибольший интерес для практического использования полученных линий представляет их продуктивность. В Таблице 12 представлены значения таких признаков, как масса зерна с колоса, масса 1000 зёрен, масса зерна с 1 м<sup>2</sup> и число продуктивных колосьев с 1 м<sup>2</sup>, которые являются основными компонентами урожайности.

Таблица 12 – характеристика интрогрессивных линий мягкой пшеницы по показателям продуктивности, 2017-2018 гг

Генотип	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зёрен, г	Масса зерна с 1 м <sup>2</sup> , г	Число продуктивных колосьев с 1 м <sup>2</sup> , 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 <sub>05</sub>	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, однако только линии 4897 и 5041 превысили показатель стандарта Краснодарская 99. В ходе анализа средних значений признака массы тысячи зёрен выделяется линия 4849, превысившая показатель стандарта. Линии 4897, 4909, 4915, 5041, 5047 вместе с сортом Краснодарская 99 входят в одну группу по средним значениям признака.

Масса зерна с 1 м<sup>2</sup> оказалась наименьшей у линии 4867 и сорта Аврора – 339,38 и 333,13 грамм соответственно. Наивысшим показателем этого признака обладает линия 4915, который соответствует стандартному сорту Краснодарская 99. Остальные линии статистически различаются друг от друга, при этом превышая показатель сорта Аврора.

Сравнивая средние значения такого важного показателя урожайности как количество продуктивных колосьев на 1 м<sup>2</sup>, выделяются линии 4879, 4909, 4915, 5041, 5047, 5053, значения которых превышают стандартное сорта Аврора. Наивысшим показателем признака обладает стандартный сорт Краснодарская 99 со значением 455,81, и ни одна из проанализированных линий не входит в одну группу с ним.

Обращает на себя внимание отличие линий по показателям разных признаков. Так, линия 4849, имеющая максимальное значение длины колоса, оказывается в числе линий с низкими значениями количества колосков в колосе и количеству зерен в колосе. Линия 4909 имеет минимальное значение количества колосков в колосе, но обладает максимальным значением количества зерна в колосе.

Рассмотренные выше результаты дисперсионного анализа позволяют сделать два важных заключения:

- влияние групповых генотипов установлено для всех анализируемых признаков;
- выбрать лучшую линию или группу линий по отдельным признакам не представляется возможным вследствие неоднозначности полученных результатов.

В данной ситуации единственным возможным подходом является системный анализ изменчивости признаков продуктивности, основанный на учете значений признаков и системе их связей. В этом случае открывается возможность перехода от отдельных признаков учтенного комплекса к новым показателям, которые называются интегральными. Эта процедура осуществляется в рамках многомерного статистического анализа.

Главным условием возможности построения интегральных показателей заключается в скоррелированности признаков. Для проверки этого условия

была построена матрица парных коэффициентов корреляции (таблица 13).

Таблица 13 – Матрица парных коэффициентов корреляций

Признак	Длина колоса, см	Кол-во колосков в колосе	Число зерен в колосе	Масса зерна с колоса, г	Масса 1000 зерен, г	Масса зерна с 1 м <sup>2</sup> , г	Число продуктивных колосьев
Высота, см	0,31*	0,02	-0,17	-0,29	-0,49*	-0,54*	-0,41*
Длина колоса, см	1,00	-0,31*	-0,06	0,09	0,18	-0,19	-0,32*
Кол-во. колосков		1,00	0,46*	0,21	-0,06	0,37*	0,36*
Число зерен в колосе			1,00	0,56*	0,15	0,43*	0,25
Масса зерна с колоса, г				1,00	0,64*	0,37*	0,02
Масса 1000 зерен, г					1,00	0,24	-0,10
Масса зерна с 1 м <sup>2</sup> , г						1,00	0,82*
Примечание. Знак * справа от значения коэффициента корреляции свидетельствует о его достоверности на 5-% уровне значимости.							

Анализ таблицы позволяет сделать вывод о достаточной корреляции комплекса учетных признаков. Достоверные корреляции наблюдались в половине случаев (14 из 28). Так, высота растения положительно коррелирует с длиной колоса. Сила связи средняя, коэффициент корреляции равен 0,31. В то же время наблюдается значительная отрицательная корреляция высоты растения с такими важнейшими компонентами продуктивности, как масса 1000 зёрен, масса зерна с 1 м<sup>2</sup> и количеством продуктивных колосьев. Данный результат оправданно укладывается в концепцию модели выращивания полукарликовых сортов пшеницы, ставшей итогом «зелёной революции», которая была начата в 1930-х годах с работы итальянского селекционера Nazareta Strampelli, получившего короткостебельные сорта пшеницы Ardito и San Pastore. Подтверждением этой концепции и «второй зеленой революцией» стало создание академиком П.П. Лукьяненко в 1954 году сортов Безостая 4 и,

затем, Безостая 1, причем последний стал «классическим» сортом, который дал возможность удвоить урожайность пшеницы не только в странах, входивших на тот момент в состав СССР, но и других странах в разных уголках Европы и Азии (Беспалова Л.А., 2001).

Длина колоса обнаруживает отрицательную корреляцию с количеством колосков в колосе и числом продуктивных колосьев. Сила связи средняя и составляет минус 0,31 и минус 0,32 соответственно. Количество колосков же положительно влияет на такие показатели, как число зерен в колосе, масса зерна с  $1\text{м}^2$  и количество продуктивных колосьев.

Установлена положительная корреляция массы зерна с колоса с массой 1000 зёрен и массой зерна с  $1\text{м}^2$  с коэффициентами 0,64 и 0,37 соответственно. Также стоит отметить сильное взаимное влияние массы зерна с  $1\text{м}^2$  и количества продуктивных колосьев, где значение корреляции составило 0,82.

Когда условие для проведения многомерного статистического анализа является выполненным – корреляция признаков доказана, остается выбрать метод, позволяющий провести объективное сравнение линий.

В качестве такого метода следует выбрать дискриминантный анализ. Его главное предназначение – анализ межгрупповых различий. При этом, вычисляются значения интегральных показателей, которые в рамках метода называются дискриминантными функциями. Существенно, что значения искомых функций вычисляются по принципу минимизации внутригрупповой изменчивости, что обеспечивает объективное сравнение групп (Айвазян С.А. и др., 1989; Аренс Х., Лейтер Ю., 1985).

В результате проведения дискриминантного анализа было выделено десять дискриминантных функций, разделяющих сравниваемые группы, что соответствует условию дискриминантного анализа: число выделяемых функций на единицу меньше числа сравниваемых групп. Однако информативность функций различна. Это отражено в проценте учета дисперсии комплекса признаков каждой конкретной функцией и значении статистики  $\lambda$ -Уилкса (таблица 14). Если первые дискриминантные функции

учли более 80% исходной изменчивости, то именно их следует считать минимально необходимыми – информативными и остальными функциями можно пренебречь (Тюрин В.В., Щеглов С.Н., 2015).

Видно, что первая и вторая дискриминантные функции учли подавляющую долю исходной изменчивости – 95%. Значения  $\lambda$ -Уилкса этих функций малы, что и является аргументом рассматривать распределение сравниваемых групп по значениям первой и второй функций. Об успешном разделении групп свидетельствует нулевая вероятность гипотезы об отсутствии межгрупповых различий.

Таблица 14 – Основные статистики дискриминантного анализа интрогрессивных линий пшеницы

Дискриминантная функция	Процент учета дисперсии	Лямбда Уилкса	Хи-квадрат	Степени свободы	Уровень значимости
1	73,0	0,0000002	525,1333	80	0,000000
2	22,0	0,000038	340,8166	63	0,000000

Характер выявленных различий отражает рисунок 14, на котором представлены центроиды сравниваемых линий и сортов.

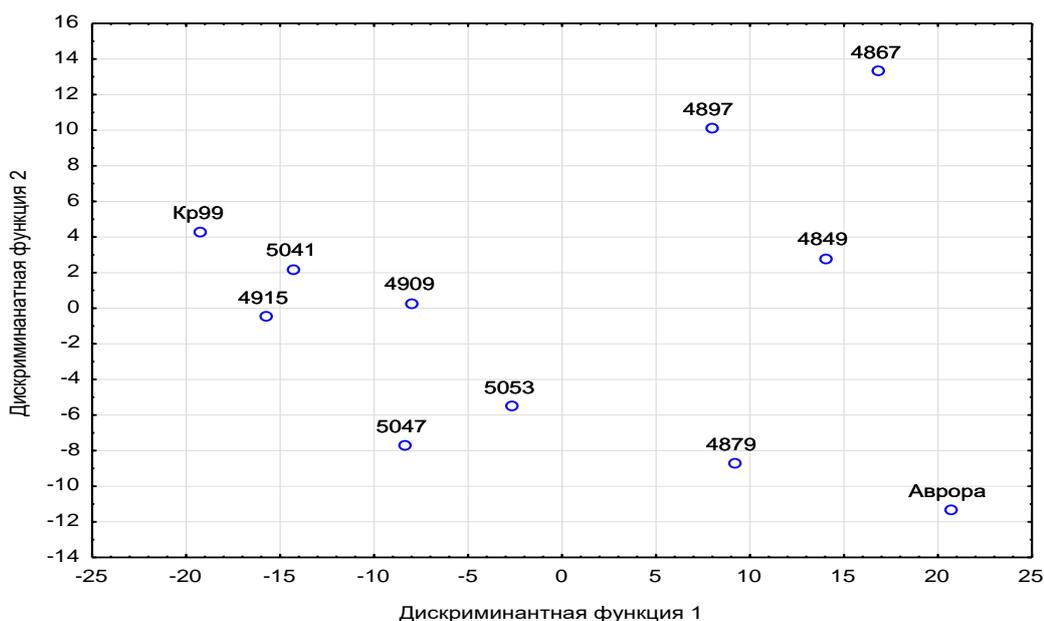


Рисунок 14 – Распределение центроидов линий и сортов пшеницы в пространстве первой и второй дискриминантных функций

Дополнительным доказательством успешности разделения групп является вычисление специальной метрики, называемой расстоянием Махаланобиса, которое оценивает достоверность межгрупповых различий (таблица 15).

Действительно, все межгрупповые расстояния являются статистически достоверными, о чем свидетельствует вероятность нулевой гипотезы меньше любого из принятых уровней значимости. Степень различия групп разная. Так, наиболее похожими являются линии 4915 и 5041. Для них искомое расстояние минимально из всех полученных и составляет 14,3 усл. ед. Также стоит отметить схожесть линий 5047 и 5053 с расстоянием 51,44 усл. ед. Наиболее близки сорту Кр99 являются линии 4915 и 5041, с расстояниями 55,30 63,26 усл. ед. соответственно.

Разделение линий еще не решает задачу выбора лучших из них. Поскольку пространство дискриминантных функций безразмерно, критерий отбора лучших групп еще следует определить.

Решение задачи может быть основано на подходе, разработанном для оценки признаков продуктивности семей растительноядных рыб (Тюрин В.В., 2008). Суть метода следующая: в пространство дискриминантных вводится новый объект с заранее заданными свойствами. В определенном смысле его можно назвать селекционной моделью, близость к которой и будет являться критерием выбора лучших групп.

Таблица 15 – Расстояния Махаланобиса между линиями и сортами пшеницы

Группа	Аврора	Кр99	4849	4867	4879	4897	4909	4915	5041	5047	5053
Аврора		1846,62	287,78	638,38	163,35	630,60	969,76	1449,77	1410,32	863,85	588,79
Кр99	0,00		1143,25	1406,32	1004,35	804,55	163,21	55,30	63,26	287,65	383,48
4849	0,00	0,00		214,46	269,84	143,88	523,82	954,66	881,21	645,42	390,72
4867	0,00	0,00	0,00		549,58	122,25	834,12	1262,06	1103,34	1109,35	748,43
4879	0,00	0,00	0,00	0,00		390,73	429,00	705,16	681,21	353,96	174,17
4897	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		381,71	681,22	561,95	589,26	379,41
4909	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		99,74	83,53	91,49	97,27
4915	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		14,31	114,61	202,96
5041	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		146,16	213,52
5047	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		51,44
5053	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Примечание. Выше главной диагонали приведены значения расстояний; ниже – вероятности ноль-гипотезы об отсутствии различий.

В нашем случае в качестве параметров модели были выбраны следующие значения учтенных признаков (таблица 16).

Таблица 16 – Основные статистические значения признаков – компонент продуктивности и параметры селекционной модели

Признак	Статистические показатели			Параметры модели
	Среднее	Minimum	Maximum	
Высота растения, см	100,64	89,00	117,00	89,00
Длина колоса, см	9,70	9,00	11,00	9,00
Количество колосков в колосе	21,64	20,00	24,00	24,00
Число зерен в колосе	47,57	30,00	61,00	61,00
Масса зерна с колоса, г	1,87	0,68	2,81	2,81
Масса 1000 зерен, г	39,59	27,67	49,07	49,07
Масса зерна с 1 м <sup>2</sup>	562,59	300,00	800,00	800,00
Число продуктивных колосьев	320,43	182,00	488,00	488,00

В модель были включены минимальные значения высоты растения и длины колоса. Основание для данного выбора – наличие отрицательных корреляций этих показателей с основными признаками, определяющими продуктивность растений. Остальные признаки (количество колосков, число зерен в колосе, масса зерна с колоса, масса 1000 зерен, масса зерна с 1 м<sup>2</sup>, число продуктивных колосьев) вошли в модель с максимальными значениями.

Процедура внедрения селекционной модели в пространство дискриминантных функций основана на решении уравнений, соответствующих каждой из двух информативных функций. Вид уравнений и координаты модели представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты вычисления координат модели в пространстве дискриминантных функций

Признак	Коэффициенты		Параметры модели	Уравнения	
	Функция 1	Функция 2		Функция 1	Функция 2
Высота растений, см	0,18	-1,14	89,00	16,37	-101,77
Длина колоса, см	0,19	-0,88	9,00	1,72	-7,88
Количество колосков	-0,12	-0,17	24,00	-2,88	-4,12
Число зерен в колосе	0,00	0,05	61,00	-0,15	3,20
Масса зерна с колоса	0,71	0,22	2,81	1,98	0,62
Масса 1000 зерен, г	-0,05	0,04	49,07	-2,68	2,00
Масса зерна с 1 м <sup>2</sup> , г	-0,07	-0,03	800,00	-58,10	-22,89
Число продуктивных колосьев	0,00	-0,01	488,00	-2,21	-4,21
Constant	25,51	141,64	1,00	25,51	141,64
Результат решения уравнений (координаты модели)				-20,44	6,58

Каждое из искомых уравнений представляет собой результат умножения коэффициентов на значения признаков, включенных в модель с добавлением константы. В результате решения уравнений, соответствующих первой и второй дискриминантных функций, получаются два числа, которые и являются координатами точки модели.

Распределение центроидов линий, сортов и селекционной модели представлено на рисунке 15.

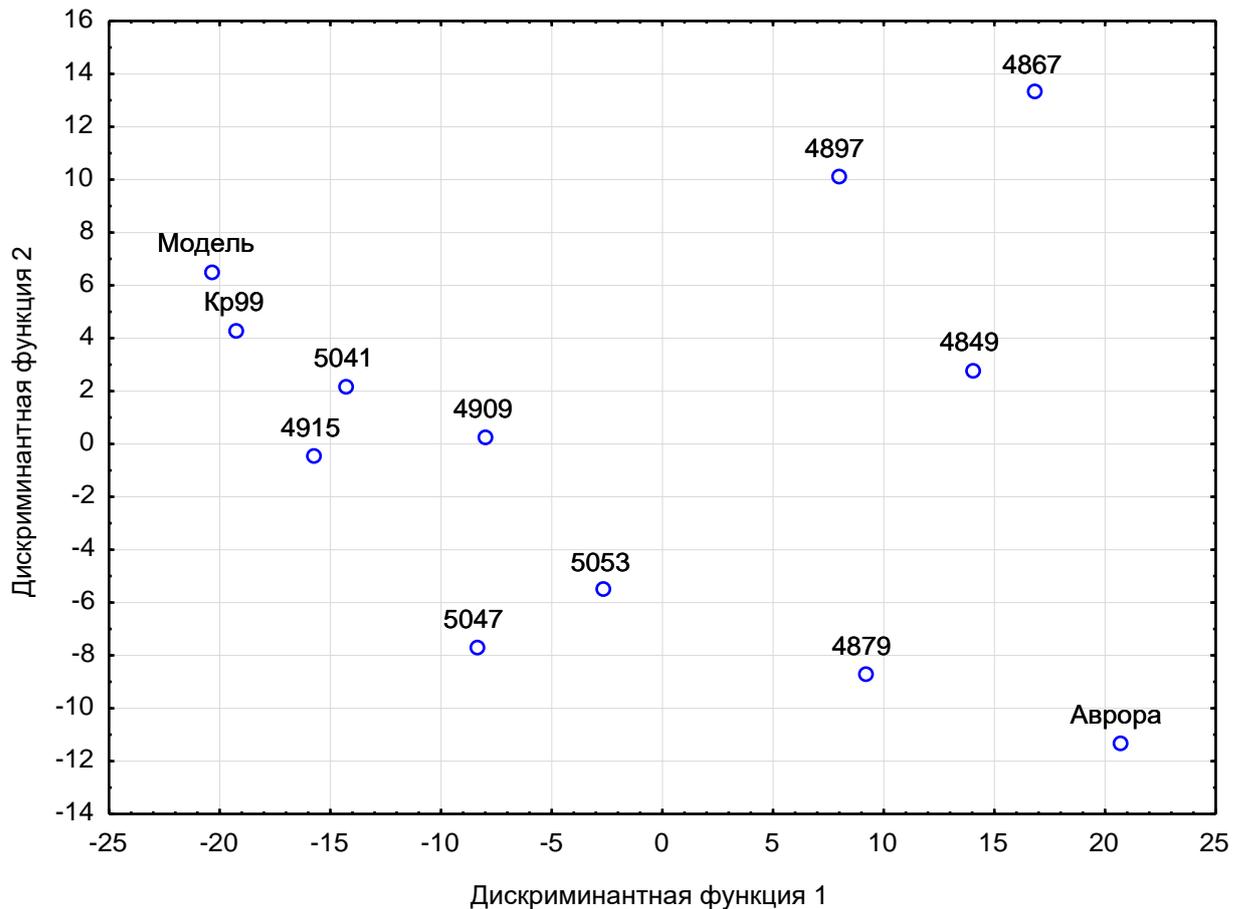


Рисунок 15 – Распределение центроидов групповых генотипов и точки селекционной модели в пространстве дискриминантных функций

Анализ рисунка позволяет сделать некоторые заключения:

- точка модели находится на некотором отдалении от распределения центров линий и сортов, что отвечает понятию «модель» стремление к которой и является целью селекции;

- наблюдается разная приближенность генотипов к модели, что, очевидно, и будет являться основанием для отбора лучших из них по комплексу признаков продуктивности.

Оценить степень близости генотипов к модели можно путем вычисления евклидовых дистанций, представляющих собой расстояния между точками на плоскости. С этой целью был выполнен кластерный анализ. Его результат представлен на рисунке 16.

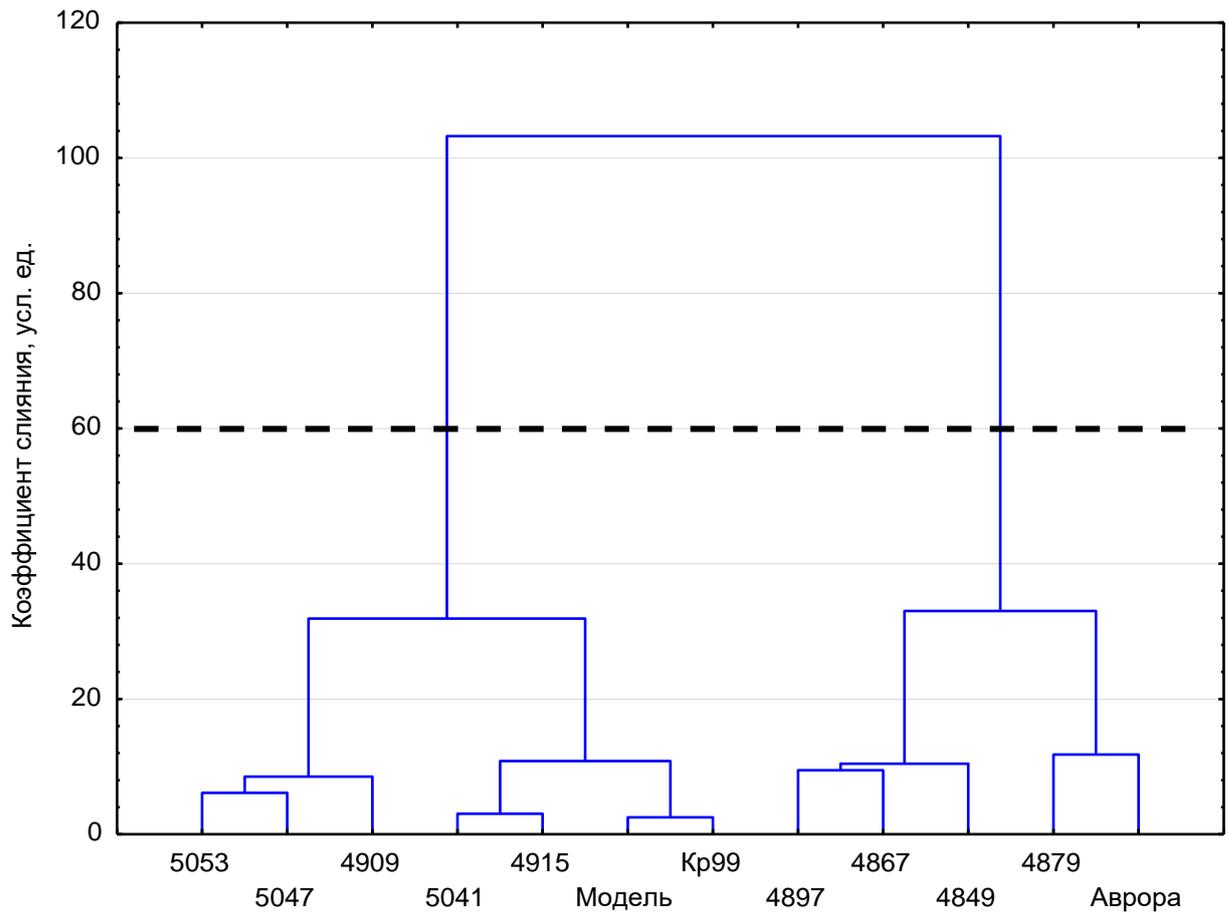


Рисунок 16 – Дендрограмма кластерного анализа групповых генотипов и точки селекционной модели в пространстве дискриминантных функций

Основным результатом кластерного анализа является рисунок – иерархический дендрит, на котором степень сходства между объектами обозначена линиями разного уровня. Разрезание дендрита по большим расстояниям высокого уровня позволяет разделить множество объектов на группы сходных между собой, именуемых кластерами.

В нашем случае выбран уровень разрезания в 60 усл. ед. При этом 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 линиям следует отнести: 5053, 5047, 4909, 5041 и 4915.

## 4.2 Оценка линий по содержанию белка, клейковины и хлебопекарным качествам

Изучение технологических свойств зерна является важным этапом работ для определения направления, в котором могут использоваться интрогрессивные линии. Так высокое содержания белка не всегда коррелирует с хорошими хлебопекарными качествами, в том числе в линиях с чужеродным генетическим материалом (Gale M.D., Miller T.E., 1987).

Наибольшим влиянием на хлебопекарные качества муки обладает клейковинный комплекс, в основе которого лежит состав глиадинов и глютеинов. Гены, детерминирующие синтез белков, входящих в этот комплекс, локализован в хромосомах первой и шестой гомеологических групп (Payne P.I. P, Holt L.M., Lawrence G.J., 1982). Стоит отметить, что влияние на технологические свойства зерна способны оказывать и другие гены, располагающиеся в других хромосомах (Пшеничникова Т.М., Ермакова М.Ф., Попова Р.К., 2006; Mansur L.M., Qualset C.O., Kasarda D.D., 1990;).

Качество зерна мягкой пшеницы определяется несколькими показателями, главными из которых являются процентное содержание белка и клейковины в зерне. По данным нескольких авторов, при передаче генетического материала от диких сородичей наблюдается увеличение содержания белка в интрогрессивных линиях мягкой пшеницы (Жиров Е.Г. и др., 1990; Давоян Р.О., 2006).

Пять наиболее перспективных линий с генетическим материалом *Ae. speltoides* урожая 2018 года оценивались по содержанию белка и клейковины (таблица 18).

Таблица 18 – 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. Однако показатель ИДК был хуже у четырех интрогрессивных линий. Только линия 4909 имеет этот показатель на уровне сорта, что позволяет отнести ее в I группу ГОСТ. Четыре другие линии определены во II группу ГОСТ по качеству клейковины.

Однако не всегда высокое содержание белка и клейковины коррелирует с высокой хлебопекарной оценкой. Общая оценка по хлебопекарным качествам складывалась из следующих параметров: объемный выход хлеба, расплывчатость, форма хлеба, эластичность и пористость (таблица 19).

Таблица 19 – Хлебопекарная оценка интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*, 2018 г

Линия	Объемный выход, см <sup>3</sup>	Расплывчатость, 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

Показатель объемного выхода хлеба у всех линий превышал таковой показатель сорта Аврора. Все образцы, в том числе стандарт, получили наивысшую оценку расплывчатости – 5,0 баллов. Линии 4915 и 5041 имели наивысший балл (5,0) по форме хлеба, что было выше соответствующей оценки сорта Аврора (4,3 балла). Линия 5053 с оценкой 4,5 была хуже остальных образцов по оценке цвета мякиша. Линии 5041 и 5053 получили оценку 4,0 балла по эластичности, сорт Аврора наряду с линиями 4909, 4915 и 5047 – 3,5 балла. Для всех линий характерна низкая пористость, которая варьирует от 2,0 до 3,0 баллов, что ниже показателя сорта Аврора (3,5 балла). Наименьшую итоговую хлебопекарную оценку получила линия 5047 (4,0 балла). Чуть лучше показатели были у линий 5053, 4909 и 4915. Наивысшую оценку – 4,5 балла – получил хлеб, полученный из линии 5041, который также превзошел оценку сорта Аврора (4,4 балла).

## ГЛАВА 5. ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЙ

Одним из важнейших этапов работ по изучению интрогрессивных линий мягкой пшеницы является изучение их цитологических особенностей. Важно выяснить, насколько такие линии цитологически стабильны, и в какой именно форме передан чужеродный генетический материал.

Замещение хромосом пшеницы целыми хромосомами другого вида может негативно влиять на некоторые признаки растения. Так, например, может нарушиться хромосомный баланс, что ведет к цитологической нестабильности. Кроме того, в переданных хромосомах, помимо генов, детерминирующих хозяйственно-ценные признаки, могут быть и гены, которые отвечают за проявления признаков, негативных для селекции.

Наилучшим для селекции является перенос в геном мягкой пшеницы отдельного участка чужеродной хромосомы в форме транслокации, так как в этом случае сохраняется наиболее стабильное состояние пшеничного генома.

Существует несколько подходов для получения транслокаций с чужеродным материалом. Одним из них является удаление или подавление активности системы генов *Ph*, локализованных на хромосоме 5В, которые препятствуют гомеологической конъюгации хромосом. Подавить активность *Ph* возможно либо с помощью мутагенеза, либо с помощью генов-супрессоров (*Su-Ph*), донором которых является вид *Ae. speltoides* (Dvorack J., 1972).

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. Цитологические препараты готовились из материнских клеток пыльцы. Общее число просмотренных клеток на каждую линию варьировало от 218 до 235, их характеристика приведена в таблице 20.

Таблица 20 – 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 <sup>II</sup> , %	20 <sup>II</sup> +2 <sup>I</sup> , %	>2 <sup>I</sup>	Мультивалентны, %
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 (21II), 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.

Помимо высокого процента содержания бивалентов стоит обратить внимание на присутствие клеток с мультивалентами. Наличие таких клеток свидетельствует о возможном влиянии генома S в синтетической форме Авродес на способность повышения конъюгации между гомеологичными хромосомами.

Для определения формы передачи генетического материала от *Ae. speltoides* в мягкую пшеницу, отобранные линии были скрещены с сортом Краснодарская 99 селекции НЦЗ им. П.П. Лукьяненко. Выбор сорта обусловлен его цитологической стабильностью и наличием ряда ценных агрономических признаков. Мейоз полученных в результате скрещивания гибридов F<sub>1</sub> был проанализирован на ассоциации хромосом и количество

унивалентов, бивалентов и мультивалентов (таблица 21). При наличии транслокации у более 50% клеток в фазе M1 мейоза формируются биваленты и мультиваленты, а ассоциация хромосом  $20^{II}+2^I$  свидетельствует о замещении целой хромосомы у анализируемой линии. В качестве стандарта использовались гибриды  $F_1$  комбинации Аврора х Краснодарская 99, так как в сорте Аврора присутствует пшенично-ржаная транслокация 1RS/1BL.

Таблица 21 – Цитологическая характеристика гибридов  $F_1$  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  $F_1$  комбинаций линия/Кр99 преобладала ассоциация хромосом  $21^{II}$  (выше 70%), что свидетельствует о передаче генетического материала от *Ae. speltoides* в виде транслокации. Однако у гибрида  $F_1$  от комбинации 5047/Кр99 преобладает ассоциация хромосом  $20^{II}+2^I$ , что свидетельствует о наличии хромосомного замещения.

Для подтверждения этих результатов некоторые линии были проанализированы с помощью метода дифференциального окрашивания хромосом (С-окрашивания) и использования FISH с зондами pAs1 и spelt1. С помощью этих методов возможно визуализировать чужеродные хромосомы

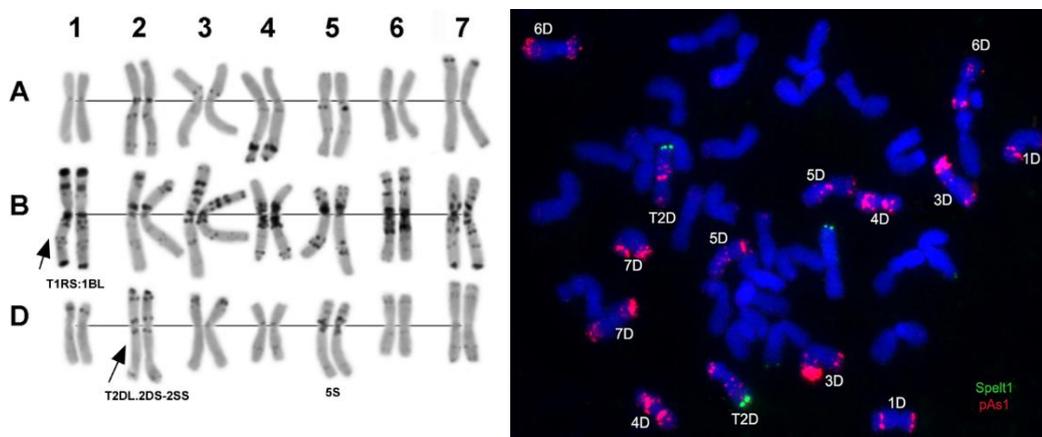
или их участки среди пшеничных хромосом.

Всего для анализа было отобрано 5 линий на основе синтетической формы Авродес: 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053. Выбор линий обусловлен их цитологическими особенностями, а также хорошей хозяйственно-биологической оценкой. По итогам анализа в каждой линии присутствуют одна или две транслокации с чужеродным генетическим материалом (таблица 22).

Таблица 22 – Интродуктивные линии с идентифицированными транслокациями

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

На рисунке 17 представлены результаты дифференциальной окраски хромосом линии 5047, где указаны чужеродные транслокации и хромосомное замещения, и флуоресцентной гибридизации *in situ* линии 5053, на которой видно присутствие генетического материала *Ae. speltoides*.



а)  
Рисунок 17 – а). Дифференциальная окраска хромосом линии 5047.  
б) Окраска хромосом линии 5053 методом FISH

Стоит отметить наличие пшенично-ржаной транслокации 1RS.1BL во всех линиях за исключением 4909. Источником этой транслокации является сорт-реципиент Аврора. В транслокации 1RS находятся гены устойчивости к бурой (*Lr26*), стеблевой (*Sr31*) и желтой (*Yr9*) ржавчинам и мучнистой росе (*Pm8*) (McIntosh et al., 2012). Кроме того, наличие данной транслокации повышает адаптивность мягкой пшеницы к условиям внешней среды, увеличивает биомассу, урожайность и содержание белка в зерне (Белан И.А. и др., 2010; Дружин А.Е. и др., 2011; Ehdaiе В. et al., 2003; Kumlay A.M. et al., 2003a; Kim W. et al., 2004; Ren T.H. et al., 2012). С другой стороны, существует большое количество работ, в которых описано негативное влияние хромосомы 1RS на хлебопекарные качества, упругость теста, SDS-объем и твердозерность (Lee J.H. et al., 1995; Kumlay A.M. et al., 2003; Chumanova E.V. et al., 2014). Так, снижение технологических качеств муки теста связывают с наличием ω-секалинов ржи и отсутствием глютелинов пшеницы, за синтез которых отвечают гены, локализованные в хромосоме 1BS (Burnett C.J. et al., 1995; Li Z. et al., 2016). В связи с этим локализация пшенично-ржаной транслокации играет важную роль для её дальнейшего использования в селекции. Так, транслокация 1AL.1RS, в отличие от таковой в геноме В, повышает засухоустойчивость, содержание белка в зерне и улучшает хлебопекарные качества мягкой пшеницы (McIntosh R.A. et al., 1995; Kim W. et al., 2004; Hoffmann В., 2008). Таким образом, использование транслокации 1RS.1AL является более предпочтительным для селекции (Леонова И.Н., 2018).

Особый интерес представляют транслокации с генетическим материалом *Ae. speltoides*. В линиях 4909, 4915 и 5041 они присутствуют 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. speltoides*. В литературе не встречается описание получения и использования таких транслокаций в селекционном процессе, поэтому они представляют большую теоретическую ценность и требуют дальнейшего их изучения.

## 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. Путем гибридологического анализа линий установлена идентичность генов устойчивости к бурой ржавчине в линиях 4909 и 4915 и различие с геном, контролирующим устойчивость в 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 их 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. Линии с новыми транслокациями от *Ae. speltoides* 4909, 4915, 5041, 5047 и 5053 рекомендуется использовать для передачи устойчивости к комплексу болезней, высокого содержания белка и клейковины и для расширения генетического разнообразия мягкой пшеницы.

**СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ**

1. Аблова, И. Б. Принципы, методы и результаты селекции озимой пшеницы на устойчивость к болезням в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / И. Б. Аблова (и др.) // 100 лет на службе АПК: традиции, достижения, инновации : сб. науч. тр. в честь 100-летия со дня основания Краснодарского НИИСХ им. П. П. Лукьяненко. – Краснодар: ЭДВИ, 2014. - С. 48-67.
2. Айвазян, С. А. Прикладная статистика: Классификация и снижение размерности / С. А. Айвазян, В. М. Бухштабер, И. С. Енюков, Л. Д. Мешалкин. - М.: Финансы и статистика, 1989. – 607 с.
3. Аренс, Х. Многомерный дисперсионный анализ / Аренс Х., Лейтер Ю. – М.: Финансы и статистика, 1985. – 230 с.
4. Аффифи, А. Статистический анализ: Подход с использованием ЭВМ / А. Аффифи, С. Эйзен. – М.: Мир. – 1982. – 488 с.
5. Бадаева, Е. Д. Структура генома и хромосомный анализ растений / Е. Д. Бадаева, Е. А. Салина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1017-1043.
6. Белан, И. А. Особенности хозяйственно ценных признаков линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих пшенично-ржаную транслокацию 1RS.1BL / Белан, И. А. (и др.) // Информационный вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14. – №. 4. – С. 632-640.
7. Беспалова, Л. А. Реализация модели полукарликового сорта академика П. П. Лукьяненко и ее дальнейшее развитие // Пшеница и тритикале : матер. науч.-практ. конф. «Зеленая революция П.П. Лукьяненко» (Краснодар, 28-30 мая 2001 г.). – Краснодар : Советская Кубань, 2001. – С. 60-71
8. Богуславский, Г. Л. Род *Aegilops* L. как генетический ресурс селекции / Г. Л. Богуславский, О. В. Голик. – Харьков, 2004. – 236 с.

9. Большева, Н. П. Сравнение дифференциально окрашенных хромосом у двух родственных форм ржи / Н. П. Большева, Е. Д. Бадаева, А. И. Курочкина, Н. С. Бадаев // Генетика. – 1984. - Т.20. - № 12. - С. 2025-2030.

10. Будашкина, Е. Б. Цитогенетическое и биохимическое изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы, устойчивых к болезням / Е. Б. Будашкина, Л. П. Солоненко, М. Х. Коробейникова // Характеристика генома некоторых видов сельскохозяйственных растений. – Новосибирск: ИЦИГ СО АН СССР. – 1990. – С. 159-169.

11. Вавилов, Н. И. Иммуитет растений к инфекционным заболеваниям / Н. И. Вавилов, Л. Н. Андреев. – М.: Наука. 1986.

12. Васильев, А. В. Использование ДНК-маркеров в селекции озимой пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П. П. Лукьяненко / А. В. Васильев, Л. А. Беспалова (и др.) // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : матер. III всероссийской науч.-пр. конф. молодых ученых (Краснодар, 18-20 ноября 2009 г.). – Краснодар, 2009. – С. 18-20.

13. Галаев, А. В. Детекция интрогрессии элементов генома *Aegilops cylindrica* Host, в геном *Triticum aestivum* L. с помощью ISSR-и SSR-анализа / А. В. Галаев, Л. Т. Бабаянц, Ю. М. Сиволап // Генетика. – 2004. – Т. 40. – №. 12. – С. 1654-1661.

14. Гешеле, Э.Э. 1978. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. – М. – 205 с.

15. Гончаров, Н. П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей / Н. П. Гончаров. – Новосибирск: Гео, 2012. – 523 с.

16. Гончаров Н. П. Сравнительная генетика пшениц и их сородичей / Н. П. Гончаров. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство. – 2002. – 251 с.

17. Гульятеева, Е. И. Методы идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине с использованием ДНК-маркеров и характеристика эффективности *Lr*-генов / Е. И. Гульятеева. – СПб.: Изд-во ГНУ ВНИИЗР Россельхозакадемии, 2012. – 72 с.

18. Гультаева, Е. И. Тенденции изменчивости популяций *Puccinia triticina* под влиянием выращиваемых сортов пшеницы и эффективность Lr-генов в основных зернопроизводящих регионах РФ / Е. И. Гультаева, О. А. Баранова // Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. – СПб., 2010. – С. 26-48.

19. Давоян, Р. О. Использование генофонда дикорастущих сородичей в улучшении мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) : дис. ... д-ра биол. наук : 06.01.05 / Р. О. Давоян. – Краснодар, 2006. – 320 с.

20. 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 (и др.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – Т. 21. – №6. – С. 663-670.

21. 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, Д.С. Миков (и др.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18. – №4-1. – С. 732-738.

22. Давоян, Э.Р. Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *aegilops tauschii* по устойчивости к листовой ржавчине / Давоян Э.Р., Миков Д.С., Зубанова Ю.С., Болдаков Д.М. (и др.) // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – 1. – С. 97-101.

23. Дж., М. К. Род *Triticum* и его систематика / М. К. Дж. // Вавиловское наследие в современной биологии : сб. науч. статей ; под ред. В. К. Шумного. – М.: Наука. – 1989. – С. 170-185.

24. Дорофеев, В. Ф. Культурная флора СССР. Т. 1. Пшеница. – Л.: Колос, Ленингр. отделение, 1979. – 348 с.

25. Дорофеев, В. Ф. Пшеницы мира : видовой состав, достижения селекции, современные проблемы и исходный материал / В. Ф. Дорофеев (и

др.) ; под ред. В. Ф. Дорофеева. – Л.: Агропромиздат, Ленингр. отделение. – 1987. – 560 с.

26. Доспехов, Б. А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): учебник / Б. А. Доспехов. – М.: Альянс, 2011. – 350 с.

27. Дружин, А. Е. Создание сортов яровой мягкой пшеницы с устойчивостью к комплексу патогенов методом интрогрессивной селекции / А. Е. Дружин (и др.) // Достижения науки и техники АПК. – 2011. – №. 1. – С. 22-24.

28. Жиров, Е. Г. Смешивание геномов в трибе *Triticeae*: Геном D мягкой пшеницы и геном пырея / Е. Г. Жиров, Т. К. Терновская, К. С. Бессараб // Цитология и генетика. – 1990. – Т. 24. – № 4. – С. 15-19.

29. Зурабишвили, Т. Г. Линейная дифференцированность хромосом злаков. Полиплоидные пшеницы / Т. Г. Зурабишвили, А. Б. Иорданский, Н. С. Бадаев. – М.: ВИНТИ, 1976. - С. 1-15.

30. Карпеченко, Г. Д. Полиплоидные гибриды *Raphanus sativus* L. × *Brassica oleracea* L. (К проблеме экспериментального видообразования) / Г. Д. Карпеченко // Труды по прикл. ботан. и селекции. – 1927. – Т. 17. – №. 3. – С. 305-410.

31. Кендалл, М. Дж. Многомерный статистический анализ и временные ряды =The Advanced Theory of Statistics: пер. с англ / М. Дж. Кендалл, А. Стьюарт. – М.: Наука: Гл. ред. физ.-мат. лит, 1976. – 736 с.

32. Клекка, У. Р. Дискриминантный анализ / У. Р. Клекка // Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика. – 1989. – С. 78-138.

33. Кобылянский, В. Д. Рожь. Генетические основы селекции / В. Д. Кобылянский. – М.: Колос, 1982. – 271 с.

34. Конарев, В. Г. Молекулярно-биологические аспекты прикладной ботаники, генетики и селекции. Теоретические основы селекции / В. Г. Конарев (и др.). – М.: Колос. – 1993. – Т. 1. – 447 с.

35. Конарев, В. Г. Белки пшеницы / В. Г. Конарев. – М.: Колос, 1980. – 351 с.
36. Короткова, А. М. Текущие достижения в области модификации генов культурных растений с использованием системы CRISPR/Cas / А. М. Короткова, С. В. Герасимова, Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2019. – Т. 23. – №. 1. – С. 29-37.
37. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
38. Лапочкина, И. Ф. Интрогрессия генов-стимуляторов гомеологичной конъюгации *Aegilops speltoides Tausch* ( $2n=14$ ) в геном мягкой пшеницы / И. Ф. Лапочкина, Е. В. Власова, Г. Л. Ячевская // Тезисы докладов II-го съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров. – 2000. – С. 216-216.
39. Лапочкина, И.Ф. Реконструкция генома мягкой пшеницы с использованием вида *Aegilops speltoides Tausch* / И. Ф. Лапочкина, Е. В. Власова, Г. Л. Ячевская // Тезисы 11-ой Конференции Европейского общества по анеуплоидам пшеницы, посвященной памяти О. И. Майстренко (Новосибирск, 2000 г.). – Новосибирск, 2000. – С. 43.
40. Леонова, И. Н. Влияние чужеродного генетического материала на проявление хозяйственно важных признаков мягкой пшеницы (*T. aestivum* L.) / И. Н. Леонова // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2018. – Т. 22. – № 3. – С. 321-328.
41. Мамадюсуфова, М. Г. Содержание крахмала и белка пшеницы и её диких сородичей, произрастающих в разных условиях / М. Г. Мамадюсуфова (и др.) // Доклады Академии наук Республики Таджикистан. – 2013. – Т. 56. – №. 10.
42. Мешкова, Л. В. Вирулентность патотипов возбудителя бурой ржавчины пшеницы к ThLr9 в регионах Сибири и Урала / Л. В. Мешков (и др.) // Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам:

матер. второй всерос. конф. (Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2008 г.). – СПб, 2008. – С. 70-73.

43. Мигушова, Э.Ф. Устойчивость эгилопсов к бурой ржавчине / Э. Ф. Мигушова, О. Г. Григорьева // Труды по прикл. бот. ген. и селекции. – 1973. – Т. 50. – Вып. 1. – С. 227-243.

44. 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.

45. Моррис, Е. Р. Цитогенетика пшеницы и родственных форм / Е. Р. Моррис, Э. Р. Сирс // Пшеница и ее улучшение. – М.: Колос. – 1970. – С. 33-110.

46. Олдендерфер, М. С. Кластерный анализ / М. С. Олдендерфер, Р. К. Блэшфильд // Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. – М.: Финансы и статистика. – 1989. – С. 139-210.

47. Пшеничникова, Т. М. Технологические качества зерна и муки мягкой пшеницы в линиях с межсортовым замещением хромосом 1 и 6 гомеологичных групп / Т. М. Пшеничникова, М. Ф. Ермакова, Р. К. Попова // Сельскохозяйственная биология. - 2006. - № 1. - С. 57-62.

48. Регель, Р. Э. Организация и деятельность Бюро по прикладной ботанике за первое двадцатилетие его существования (27 окт. 1894–27 окт. 1915) / Р. Э. Регель // Тр. Бюро по прикл. ботанике. – 1915. – Т. 8. – №. 4/5. – С. 1465-1637.

49. Семенов, В.И. С-окраска хромосом отдаленных гибридов злаковых. Выявление транслокаций и их изучение / В. И. Семенов, Е. В. Семенова // Цитогенетические и математические подходы к изучению

биосистем : Доклады Московского общества испытателей природы. - М., 1986. - С. 48-50.

50. Сибикеев, С. Н. Эволюция листовой ржавчины и защита от нее пшеницы в Поволжье / С. Н. Сибикеев, В. А. Крупнов // Вестник госагроуниверситета им. Н. И. Вавилова. – 2007. – Спецвыпуск. – С. 92-94.

51. Скурыгина, Н. А. Интрогрессия генов устойчивости к болезням *Triticum timopheevi* Zhuk. в геном мягкой пшеницы при беккроссах / Н. А. Скурыгина // Бюл. ВИР. – 1979. – Вып. 89. – С. 5-10.

52. Тюрин, В. В. Принцип апостериорной минимизации эффекта модификационной изменчивости на примере оценки продуктивности в семейной селекции белого толстолобика (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.) / В. В. Тюрин // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2008. – № 5 (14). – С. 118-121.

53. Тюрин, В. В. Дискриминантный анализ в биологии : монография / В. В. Тюрин, С. Н. Щеглов. – Краснодар, 2015. – 126 с.

54. Фляксбергер, К. А. Культурная флора СССР. Т. I. Хлебные злаки. Пшеница – род *Triticum* L. pr.p. / К. А. Фляксбергер, Р. Ю. Рожевиц ; под ред. Н. И. Вавилова, Е. В. Вульф. – М. – Л.: ГИЗ совхозной и колхозной литературы, 1935. – 434 с.

55. Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17. – № 4/2. – С. 1044-1054.

56. Цвелёв, Н. Н. Злаки СССР / Н. Н. Цвелёв. – Л.: Наука, 1976. – 788 с.

57. Цвелёв, Н. Н. Система злаков (*Poaceae*) и их эволюция / Н. Н. Цвелёв. – Л.: Наука, Ленингр. отделение, 1987. – 75 с.

58. Чикида, Н. Н., Максимов И. В., Давоян Р. О. Перспективы использования разногеномных видов эгилопсов (диких родичей пшеницы) для расширения генетического потенциала продовольственной пшеницы //

Здоровье–основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2011. – Т. 6. – №. 1.

59. Чикида, Н. Н. Состояние генофонда рода *Aegilops* L. и его потенциал для интрогрессии в пшеницу // Генетические ресурсы культурных растений. Проблемы мобилизации, инвентаризации, сохранения и изучения генофонда важнейших сельскохозяйственных культур для решения приоритетных задач селекции: труды Межд. науч.-практ. конф. - СПб., 2001. С. 183-185.

60. Щапова, А. И. Цитогенетика пшенично-ржаных гибридов / А. И. Щапова, Л. А. Кравцова. – Новосибирск: Наука. - 1990. - 163 с.

61. Яхьяуи, А. Региональное сотрудничество с целью повышения устойчивости пшеницы к желтой ржавчине / А. Яхьяуи, М. Тораби, М. Койшибаев и др. // 1-я Центрально-Азиатской конференция по пшенице: научные материалы. - Алматы, 2003. - С. 20-21.

62. Ячевская, Г. Л. Использование метода отдаленной гибридизации в селекции пшеницы / Г. Л. Ячевская, А. А. Наумов. – М.: Атомиздат, 1990. – 68 с.

63. Aggarwal, R. K. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species / R. K. Aggarwal et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – Vol. 114. – No. 2. – P. 359.

64. Andersen, J. R. Functional markers in plants / J.R. Andersen, T. Lübberstedt // Trends in plant science. – 2003. – Т. 8. – №. 11. – С. 554-560.

65. Arnholdt-Schmitt, B. AOX—a functional marker for efficient cell reprogramming under stress? / B. Arnholdt-Schmitt, J. H. Costa, D. F. de Melo // Trends in plant science. – 2006. – Vol. 11. – No. 6. – P. 281-287.

66. Badaeva, E. D. Use of C-Banding and GISH for Genome Analysis in the *Triticeae* / E. D. Badaeva et al. // Proc. 2nd Int. Triticeae Symp. – 1994. – Pp. 17.

67. Badaeva, E. D. Intraspecific karyotype divergence in *Triticum araraticum* (*Poaceae*) / E. D. Badaeva, N. S. Badaev, B. S. Gill // Plant Systems and Evolution. – 1994. - Vol. 192. - P. 117-145.
68. Bailey, K. L. Four interspecific germplasm lines (302–1, 302–3, 302–5, 302–20) of spring wheat with resistance to common root rot (*Cochliobolus sativus*) derived from *Aegilops ovata* / K. L. Bailey, H. Harding, P. Hucl // Canadian journal of plant science. – 1995. – Vol. 75. – No. – P. 693-694.
69. Barkworth, M. E. Taxonomy of the *Triticeae*: a historical perspective / M. E. Barkworth // Hereditas. – 1992. – Vol. 116. – P. 1-14.
70. Bartos, P. Rust resistance of some European wheat cultivars derived from rye / P. Bartos P. et al. // Proc. Inter. Wheat Genet. Symp., 4th, Columbia, MO. – 1973. – P. 6-11.
71. Bedbrook, J. R. A molecular description of telomeric heterochromatin in *Secale* species / J. R. Bedbrook et al. // Cell. – 1980. – Vol. 19. – No. 2. – P. 545-560.
72. Berzonsky, W. A. Biochemical, molecular, and cytogenetic technologies for characterizing 1RS in wheat: A review / W. A. Berzonsky, M. G. Francki // Euphytica. – 1999. – Vol. 108. – No. 1. – P. 1-19.
73. Bowden, W. M. The taxonomy and nomenclature of the wheats, barleys, and ryes and their wild relatives / W. M. Bowden // Canadian Journal of Botany. – 1959. – Vol. 37. – No. 4. – P. 657-684.
74. Burnett, C. J. Effects of the 1B/1R translocation in wheat on composition and properties of grain and flour / C. J. Burnett, K. J. Lorenz, B. F. Carver // Euphytica. – 1995. – Vol. 86. – No. 3. – P. 159-166.
75. Causse, M. A. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population / M. A. Causse et al. // Genetics. – 1994. – Vol. 138. – No. 4. – P. 1251-1274.
76. Chennaveeraiah, M. S. Kariomorphologic and cytotaxonomic studies in *Aegilops* / M. S. Chennaveeraiah // Acta Horti Gotoburgen. – 1960. – Vol. 23. – P. 85-178.

77. Cherukuri, D. P. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat / D. P. Cherukuri et al. // *Euphytica*. – 2005. – Vol. 143. – No. 1-2. – P. 19-26.
78. Chumanova, E. V. Chromosome composition of wheat-rye lines and the influence of rye chromosomes on disease resistance and agronomic traits / E. V. Chumanova et al. // *Russian journal of genetics*. – 2014. – Vol. 50. – No. 11. – P. 1169-1178.
79. Dai, S. Analysis of high-molecular-weight glutenin subunits in five amphidiploids and their parental diploid species *Aegilops umbellulata* and *Aegilops uniaristata* / S. Dai et al. // *Plant Genetic Resources*. – 2015. – Vol. 13. – No. 2. – P. 186-189.
80. Dubcovsky, J. Molecular characterization of two *Triticum speltoides* interstitial translocations carrying leaf rust and greenbug resistance genes / J. Dubcovsky et al. // *Crop science*. – 1998. – Vol. 38. – No. 6. – P. 1655-1660.
81. Dvorak, J., Genetic variability in *Aegilops speltoides* affecting homoeologous pairing in wheat / J. Dvorak // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1972. – Vol. 14. – P. 371–380.
82. Dvořák, J. Phylogenetic relationships between chromosomes of wheat and chromosome 2E of *Elytrigia elongata* / J. Dvořák, K. C. Chen // *Canadian journal of genetics and cytology*. – 1984. – Vol. 26. – No. 2. – P. 128-132.
83. Dvořák, J. Discovery and mapping of wheat *Ph1* suppressors / J. Dvořák, K. R. Deal, M. C. Luo // *Genetics*. – 2006. – Vol. 174. – No. 1. – P. 17-27.
84. Dvořák, J. Homoeologous chromatin exchange in a radiation-induced gene transfer / J. Dvořák, D. R. Knott // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1977. – Vol. 19. – No. 1. – P. 125-131.
85. Dyck, P.L. Genetics of leaf rust reaction in three introductions of common wheat / P.L. Dyck // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1977. – Vol. 19. – P. 711-716.
86. Dyck, P.L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat / P.L. Dyck // *Genome*. – 1987. – Vol. 29. – P. 467-469.

87. Ehdaie, B. Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat 'Pavon' / B. Ehdaie, R. W. Whitkus, J. G. Waines // *Crop Science*. – 2003. – Vol. 43. – No. 2. – P. 710-717.

88. Friebe, B. C-banding pattern and polymorphism of *Aegilops caudata* and chromosomal constitutions of the amphiploid *Triticum aestivum* – *Aegilops caudata* and six derived chromosome addition lines / B. Friebe, V. Shubert, W. D. Blutner, K. Hammer // *Theor. Appl. Genet.* - 1992. – Vol. 83. - No. 4. - P. 589-596.

89. Friebe, B. Standard karyotype of *Triticum searsii* and its relationships with other S-genome species / B. Friebe, N. A. Tuleen, B. S. Gill // *Theor. Appl. Genet.* – 1995 b. - Vol. 91. - P. 248-255.

90. Friebe, B. Standard karyotype of *Triticum umbellulatum* and the identification of *Triticum umbellulatum* chromatin in common wheat / B. Friebe, N. A. Tuleen, J. Jiang, B. S. Gill // *Teor. Appl. Genet.* - 1995 a. – Vol. 90. - P. 150-156.

91. Gale, M. D. The introduction of alien genetic variation in wheat / M.D. Gale, T.E. Miller // *Wheat Breeding*. – Springer, Dordrecht. – 1987. – P. 173-210.

92. Gassner G. Die Bestimmung der biologischen Rasses des Weizengelbrostes (*Puccinia glumarum f.sp. tritici* (Schm.) Erikss. and Henn.) / G. Gassner, W. Straib // *Arb. Biol. Reichsanst.* – 1932. – V. 21. – P. 141–164.

93. Gill, B. S. A workshop report on wheat genome sequencing: International Genome Research on Wheat Consortium / B. S. Gill et al. // *Genetics*. – 2004. – Vol. 168. – No. 2. – P. 1087-1096.

94. Gill, B. S. Evaluation of *Aegilops* species for resistance to wheat powdery mildew, wheat leaf rust, Hessian fly, and greenbug / B. S. Gill et al. – 1985. – No. 86-035575. CIMMYT.

95. Gill, B. S. Standard karyotype and nomenclature system for description of chromosome bands and structural aberrations in wheat (*Triticum aestivum*) / B. S. Gill, B. Friebe, T. R. Endo // *Genome*. – 1991. – Vol. 34. – No. 5. – P. 830-839.

96. Gill, B. S. Giemsa C-banding and the evolution of wheat / B. S. Gill, G. Kimber // Proceeding National Academic Sciences USA. - 1974. - Vol. 71. – No. 10. - P. 4086-4090.
97. Golovnina, K. A. Molecular characterization of vernalization loci VRN1 in wild and cultivated wheats / K. A. Golovnina, et al. // BMC plant biology. – 2010. – Vol. 10. – No. 1. – P. 168.
98. Goncharov, N.P. Taxonomy and molecular phylogeny of natural and artificial wheat species / N. P. Goncharov, K. A. Golovina, E. Ya. Kondratenko // Breed. Sci. – 2009. – Vol. 59. – No. 5. – P. 498-498.
99. Graner, A. Construction of an RFLP map of barley / A. Graner et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 1991. – Vol. 83. – No. 2. – P. 250-256.
100. Gupta, P. K. Molecular markers: principles and methodology / P. K. Gupta, R. K. Varshney, M. Prasad // Molecular techniques in crop improvement. – Springer, Dordrecht. – 2002. – P. 9-54.
101. Gupta, P. K. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants / P. K. Gupta, S. Rustgi // Functional & integrative genomics. – 2004. – Vol. 4. – No. 3. – P. 139-162.
102. Gupta, P. K. Marker-assisted wheat breeding: present status and future possibilities / P.K. Gupta, P. Langridge, R. R. Mir //Molecular Breeding. – 2010. – T. 26. – №. 2. – C. 145-161.
103. Helguera, M. PCR markers for *Triticum speltoides* leaf rust resistance gene *Lr51* and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines / M. Helguera et al. // Crop science. – 2005. – Vol. 45. – No. 2. – P. 728-734.
104. Helguera, M. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene Lr47 / M. Helguera, I. A. Khan, J. Dubcovsky // Theoretical and Applied Genetics. – 2000. – Vol. 100. – No. 7. – P. 1137-1143.
105. Hoffmann, B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS / B. Hoffmann // Cereal Research Communications. – 2008. – Vol. 36. – No. 2. – P. 269-278.

106. Hutchinson, J. C-banding at meiosis as a means of assessing chromosome affinities in the *Triticeae* / J. Hutchinson, T. E. Miller, S. M. Reader // Can. J. Genet. Cytol. - 1983. - Vol. 25. – No. 4. - P. 319-323.
107. Jahier, J. Monosomic analysis of resistance to eyespot in the variety 'Roazon' / J. Jahier et al. // Proc. 5th International Wheat Genet. Symposium (S. Ramamujan, ed.). – 1978. – Vol. 2328. – P. 437440.
108. Jiang, J. Recent advances in alien gene transfer in wheat / J. Jiang, B. Friebe, B. S. Gill // Euphytica. – 1994. – P. 199-212.
109. Johnson, R. The substitution of a chromosome of *Agropyron elongatum* for chromosomes of hexaploid wheat / R. Johnson // Canad. J. Genet. Cytol. - 1966. - Vol.8. – No. 2. - P. 279-292.
110. Jørgensen, J. H. Genes for resistance to wheat powdery mildew in derivatives of *Triticum timopheevi* and *T. carthlicum* / J. H. Jørgensen, C. J. Jensen // Euphytica. – 1972. – Vol. 21. – No. 1. – P. 121-128.
111. Kerber, E. R. Wheat: reconstitution of the tetraploid component (AABB) of hexaploids / E.R. Kerber // Science. – 1964. – Vol. 143. – No. 3603. – P. 253-255.
112. Kerber, E. R. Inheritance in hexaploid wheat of leaf rust resistance and other characters derived from *Aegilops squarrosa* / E.R. Kerber, P.L. Dyck // Canadian Journal of Genetics and Cytology. – 1969. – Vol. 11. – No. 3. – P. 639-647.
113. Kerber, E. R. Transfer to hexaploid wheat of linked genes for adult-plant leaf rust and seedling stem rust resistance from an amphiploid of *Aegilops speltoides* × *Triticum monococcum* / E. R. Kerber, P. L. Dyck // Genome. – 1990. – Vol. 33. – No. 4. – P. 530-537.
114. Kerby, K. The phylogeny of the polyploid wheats *Triticum aestivum* (bread wheat) and *Triticum turgidum* (macaroni wheat) / K. Kerby, J. Kuspira // Genome. – 1987. – Vol. 29. – No. 5. – P. 722-737.

115. Kihara, H. Conjugation of homologous chromosomes in the genus hybrids *Triticum* × *Aegilops* and species hybrids of *Aegilops* / H. Kihara // *Cytologia*. – 1929. – Vol. 1. – No. 1. – P. 1-15.
116. Kim, W. Agronomic effect of wheat-rye translocation carrying rye chromatin (1R) from different sources / W. Kim et al. // *Crop Science*. – 2004. – Vol. 44. – No. 4. – P. 1254-1258.
117. Kimber, G. The addition of the chromosomes of *Aegilops umbellulata* to *Triticum aestivum* (var. Chinese Spring) / G. Kimber // *Genetics Research*. – 1967. – Vol. 9. – No. 1. – P. 111-114.
118. Knott, D. R. Translocations involving *Triticum* chromosomes and *Agropyron* chromosomes carrying rust resistance / D. R. Knott // *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. – 1968. – Vol. 10. – No. 3. – P. 695-696.
119. Knott, D. R. The genetic nature of mutations of a gene for yellow pigment linked to *Lr19* in 'Agatha' wheat / D. R. Knott // *Canadian journal of genetics and cytology*. – 1984. – T. 26. – No. 3. – P. 392-393.
120. Knott, D. R. Transferring alien genes to wheat / D. R. Knott // *Wheat and wheat improvement. Second edition*. – 1987. – P. 462-471.
121. Knott, D. R. The effect of transfers of alien genes for leaf rust resistance on the agronomic and quality characteristics of wheat / D. R. Knott // *Euphytica*. – 1989. – Vol. 44. – No. 1-2. – P. 65-72.
122. Koebner, R. M. D. Marker assisted selection in the cereals: the dream and the reality / R. M. D. Koebner // *Cereal genomics*. – Springer, Dordrecht, 2004. – P. 317-329.
123. Korzun, V. Use of molecular markers in cereal breeding / V. Korzun // *Cellular and molecular biology letters*. – 2002. – Vol. 7. – No. 2B. – P. 811-820.
124. Kosina, R. Selected items of wheat variation-from palaeobotany to molecular biology / R. Kosina // *Acta societatis botanicorum Poloniae*. – 1999. – Vol. 68. – No. 2. – P. 129-141.
125. Kumlay, A. M. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat / A. M. Kumlay et al. // *Crop science*. – 2003. – Vol. 43. – No. 5. – P. 1643-

1651.

126. Kumlay, A. M. Understanding the effect of rye chromatin in bread wheat / A. M. Kumlay et al. // *Crop science*. – 2003. – Vol. 43. – No. 5. – P. 1643-1651.

127. Lacadena, J. K. Evidence for wheat-rye nucleolar competition (amphiplasty) in triticale by silver-staining procedur / J. K. Lacadena, M. C. Cermeno, J. Orellana, J. L. Santos // *Teor. Appl. Genet.* -1984. - Vol. 67. - P. 207-213.

128. Lagudah, E. S. et al. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat / E. S. Lagudah et al. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2006. – Vol. 114. – No. 1. – P. 21-30.

129. Lee, J. H. Quality and biochemical effects of a IBL/IRS wheat-rye translocation in wheat / J. H. Lee, R. A. Graybosch, C. J. Peterson // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1995. – Vol. 90. – No. 1. – P. 105-112.

130. Li, Z. S. Study of blue grained monosomic wheat / Z. S. Li, S. M. Mu, H. P. Chou, B. Li // *Proceedings of 9th Internat. Genet. Sympos.* - 1993 -Vol. 1. - P. 119-124.

131. Li, Z. et al. A mutant with expression deletion of gene *Sec-1* in a 1RS. 1BL line and its effect on production quality of wheat / Z. Li et al. // *PloS one*. – 2016. – Vol. 11. – No. 1. – P. 43.

132. MacKey, J. Wheat: Its concept, evolution and taxonomy / J. MacKey // *Durum Wheat breeding. Current Approaches and Future Strategies* / C. Royo et. al. (Eds.). – 2005. – Vol. 1. – P. 3-61.

133. Mago, R. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection / R. Mago et al. // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2009. – Vol. 119. – No. 8. – P. 1441-1450.

134. Mansur, L. M. Effects of ‘Cheyenne’ chromosomes on milling and baking quality in ‘Chinese Spring’ wheat in relation to glutenin and gliadin storage proteins / L. M. Mansur et al. // *Crop Science*. – 1990. – Vol. 30. – No. 3. – P. 593-

602.

135. Marais, G. F. Attempts to remove gametocidal genes co-transferred to common wheat with rust resistance from *Aegilops speltoides* / G. F. Marais et al. // *Euphytica*. – 2010. – Vol. 171. – No. 1. – P. 71-85.

136. Marais, G. F. Gametocidal effects and resistance to wheat leaf rust and stem rust in derivatives of a *Triticum turgidum* ssp. *durum*/*Aegilops speltoides* hybrid / G. F. Marais, Z. A. Pretorius // *Euphytica*. – 1996. – Vol. 88. – No. 2. – P. 117-124.

137. Martini, G. Partial inactivation of wheat nucleus organizers by the nucleus organizer chromosomes from *Aegilops umbellulata* / G. Martini, M. O'Dell, R. B. Flavell // *Chromosoma*. - 1982. - Vol. 84. - P. 687-700.

138. McGuire, P. E. High Salt-Tolerance Potential in Wheatgrasses 1 / P. E. McGuire, J. Dvorak // *Crop science*. – 1981. – Vol. 21. – No. 5. – P. 702-705.

139. McIntosh, R. A. Nature of induced mutations affecting disease reaction in wheat / R. A. McIntosh // *Induced mutations against plant diseases*. – 1977.

140. McIntosh, R. A. Wheat rusts: an atlas of resistance genes / R. A. McIntosh, C. R. Wellings, R. F. Park. – Csiro Publishing, 1995.

141. McIntosh, R. A. et al. Catalogue of gene symbols for wheat: 2012 / R.A. McIntosh et al. // *Eps*. – Vol. 1. – No. 111903.

142. McIntosh, R. A. Catalogue of gene symbols for wheat: 2015–2016 supplement / R. A. McIntosh et al. // *Komugi Wheat Genet. Resour. Database*. – 2016.

143. McLauchlan, A. Development of robust PCR-based DNA markers for each homoeo-allele of granule-bound starch synthase and their application in wheat breeding programs / A. McLauchlan et al. // *Australian Journal of Agricultural Research*. – 2001. – Vol. 52. – No. 12. – P. 1409-1416.

144. Mesterhazy, A. European virulence survey for leaf rust in wheat / A. Mesterhazy et al. // *Agronomie*. – 2000. – Vol. 20. – P. 793-804.

145. Michalek, W. Sequence analysis and gene identification in a set of mapped RFLP markers in barley (*Hordeum vulgare*) / W. Michalek, G. Künzel, A. Graner // *Genome*. – 1999. – Vol. 42. – No. 5. – P. 849-853.
146. Miller, R. T. A comprehensive approach to clustering of expressed human gene sequence: the sequence tag alignment and consensus knowledge base / R.T. Miller et al. // *Genome Research*. – 1999. – Vol. 9. – No. 11. – P. 1143-1155.
147. Miller, T. E. Systematics and evolution / T. E. Miller // *Wheat breeding*. – Springer, Dordrecht, 1987. – P. 1-30.
148. Miller, T. E. Chromosome 3N of *Aegilops uniaristata* a source of tolerance to high levels of aluminium for wheat / T. E. Miller, S. M. Reader, A. Mahmood, K. A. Purdie, I. P. King // *Proceeding of the 9th Internat. Wheat Genetics Sympos.* - 1993. - Vol. 2. - P. 1037-1042.
149. Miller, T. E. The homoeologous relationship between the chromosomes of rye and wheat / T. E. Miller // *Canad. J. Genet. Cytol.* – 1984. – Vol. 27. – No. 4. – P. 421-425.
150. Moose, S. P. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement / S.P. Moose, R.H. Mumm // *Plant physiology*. – 2008. – Vol. 147. – No. 3. – P. 969-977.
151. Mujeeb-Kasi, A. The production, cytology, and practicality of wide hybrids in the *Triticeae* / A. Mujeeb-Kasi, G. Kimber // *Cereal Research Communication*. - 1985. - Vol. 13. – No. 2-3. - P. 111-124.
152. Nevo, E. Genetic resources of wild *Triticum diccoides* for wheat improvement: news and views / E. Nevo // *Proceedings of the 9th Internat. Wheat Genetics Sympos.* - 1993. - Vol. 1. - P. 79-88.
153. Payne, P. I. The genetics of gliadin and glutenin, the major storage proteins of the wheat endosperm / P. I. Payne et al. // *Plant Foods for Human Nutrition*. – 1982. – Vol. 31. – No. 3. – P. 229-241.
154. Phillips, R. L. DNA-based markers in plants / R. L. Phillips, I. K. Vasil (ed.). – Springer Science & Business Media, 2013. – Vol. 6.

155. Procnier, J. D. PCR-based RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. D. Procnier et al. // Journal of Genetics & Breeding. – 1995. – Vol. 49. – No. 1. – P. 87-91.
156. Qi, L. L. Development of translocation lines of *Triticum aestivum* with powdery mildew resistance introduced from *Haynaldia villosa* / L. L. Qi // Proceedings of the 8th International Wheat Genetic Symposium, 1993. – China Agricultural Sciencetech Press, 1993. – P. 333-337.
157. Rayburn, A. L. Isolation of a D-genome specific repeated DNA sequence from *Aegilops squarrosa* / A. L. Rayburn, B. S. Gill // Plant Molecular Biology Reporter. – 1986. – Vol. 4. – No. 2. – P. 102-109.
158. Ren, T. H. Genetic diversity of wheat-rye 1BL. 1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources / T. H. Ren et al. // Euphytica. – 2012. – Vol. 183. – No. 2. – P. 133-146.
159. Riley, R. The diploidisation of polyploid wheat / R. Riley et al. // Heredity. – 1960. – Vol. 15. – P. 407-29.
160. Riley, R. The production and phenotypes of wheat-rye chromosome addition lines / R. Riley, V. Chapman // Heredity. – 1958. – Vol. 12. – No. 3. – P. 301-315.
161. Riley, R. The transfer of alien genetic variation to wheat / R. Riley, G. Kimber // Annual Rep. Plant. Breed. Inst. (Cambridge). – 1966. – P. 6-36.
162. Riley, R. The effect of dosage of *Bg-* gene in wheat / R. Riley, C. N. Law // Annual Reports. - Inst. Plant Science Research. John Innes Centre - Norwich. - 1971. - P. 8-9.
163. Rogowsky, P. M. Characterisation of wheat-rye recombinants with RFLP and PCR probes / P. M. Rogowsky et al. // Theoretical and Applied Genetics. – 1993. – Vol. 85. – No. 8. – P. 1023-1028.
164. Rudd, S. Sputnik: a database platform for comparative plant genomics / S. Rudd, H. W. Mewes, K. F. X. Mayer // Nucleic acids research. – 2003. – Vol. 31. – No. 1. – P. 128-132.
165. Saal, B. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale*

- cereale L.) / B. Saal, G. Wricke // *Genome*. – 1999. – Vol. 42. – No. 5. – P. 964-972.
166. Salina, E. A. Phylogenetic reconstruction of *Aegilops* section *Sitopsis* and the evolution of tandem repeats in the diploids and derived wheat polyploids / E. A. Salina et al. // *Genome*. – 2006. – Vol. 49. – No. 8. – P. 1023-1035.
167. Schachermayr, G. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds / G. Schachermayr, C. Feuillet, B. Keller // *Molecular Breeding*. – 1997. – Vol. 3. – No. 1. – P. 65-74.
168. Schneider, A. Fluorescence in situ hybridization polymorphism using two repetitive DNA clones in different cultivars of wheat / A. Schneider et al. // *Plant Breeding*. – 2003. – Vol. 122. – No. 5. – P. 396-400.
169. Sears, E. R. Identification of the wheat chromosome carrying leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* / E. R. Sears // *Wheat Inf Serv.* – 1961. – Vol. 12. – P. 12-13.
170. Sears, E. R. Genetic and structural relationships of non-homologous chromosomes in wheat / E. R. Sears, M. Okamoto. – 1957. – No. REP-758. CIMMYT.
171. Serfling, A. Diagnostic value of molecular markers for Lr genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance / A. Serfling et al. // *European Journal of Plant Pathology*. – 2011. – Vol. 130. – No. 4. – P. 559-575.
172. Seyfarth, R. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat / R. Seyfarth et al. // *Theoretical and applied genetics*. – 1999. – Vol. 99. – No. 3-4. – P. 554-560.
173. Shabnam, N. Development of molecular markers for leaf rust resistance genes incorporated from alien species into common wheat / N. Shabnam et al. // *Asian Journal of Agricultural Sciences*. – 2011. – Vol. 3. – No. 1. – P. 55-57.
174. Shan, X. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat / X. Shan, T. K. Blake, L. E. Talbert // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1999. – Vol. 98. – No. 6-7. – P. 1072-1078.

175. Sheperd, K.W., Islam A. Fourth compendium of wheat-alien chromosome lines / K. W. Sheperd, A. Islam // Proc. 7th Int. Wheat Genet. Symp. – 1988. – P. 1373-1381.
176. Singh, R. P. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen /R.P. Singh et al. // CAB reviews: perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources. – 2006. – Vol. 1. – No. 54. – P. 1-13.
177. Singh, R. P. Breeding spring bread wheat for irrigated and rainfed production systems of the developing world / R. P. Singh, R. Trethowan // Breeding major food staples. – 2007. – P. 109-140.
178. Sreenivasulu, N. Identification of genes specifically expressed in maternal and filial tissues of barley caryopses: a cDNA array analysis / N. Sreenivasulu et al. // Molecular Genetics and Genomics. – 2002. – Vol. 266. – No. 5. – P. 758-767.
179. Valkoun, J. Disease resistance in the genus *Aegilops* L.—Stem rust, leaf rust, stripe rust, and powdery mildew / J. Valkoun et al. // Die Kulturpflanze. – 1985. – Vol. 33. – No. 2. – P. 133-153.
180. Varshney, R. K. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species / R. K. Varshney et al. // Cellular and Molecular Biology Letters. – 2002. – Vol. 7. – No. 2A. – P. 537-546.
181. Varshney, R. K. Molecular maps in cereals: methodology and progress / R. K. Varshney, V. Korzun, A. Börner // Cereal genomics. – Springer, Dordrecht, 2004. – P. 35-82.
182. Varshney, R. K. Genic microsatellite markers in plants: features and applications / R. K. Varshney, A. Graner, M. E. Sorrells // TRENDS in Biotechnology. – 2005. – Vol. 23. – No. 1. – P. 48-55.
183. Waninge, J. A. A modified of counting chromosomes on root tip cels of wheat / J. A. Waninge // Euphitica. - 1965. - Vol. 14. – No. 3. - P. 249-256.

184. Weng, Y. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background / Y. Weng et al. // *Plant Breeding*. – 2007. – Vol. 126. – No. 5. – P. 482-486.
185. Witcombe, J. R. A guide to the species of *Aegilops L.*: their taxonomy, morphology and distribution. – 1983.
186. Worland, A. J. Location of a gene for resistance to eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) on chromosome 7D of bread wheat / A. J. Worland et al. // *Plant Breeding*. – 1988. – Vol. 101. – No. 1. – P. 43-51.
187. Zeller, F. J. Cytologie und Krankheitsresistenz einer 1A/1R und mehrerer 1B/1R-Weizen-Roggen-Translokationssorten / F. J. Zeller, E. Fuchs // *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung = Journal of plant breeding*. – 1983.
188. Zeller, F. J. Broadening in the genetic variability of cultivated wheat by utilizing rye chromatin / F. J. Zeller, L. Hsam // *Proc. 6th int. Wheat. Genet. Sump. Kyoto, Japan. 1983*. – P. 161-173.
189. Zeven, A. C. The degree of similarity of backcross lines of *Triticum aestivum* cultivars Manitou and Neepawa with *Aegilops speltoides* accessions as donors / A. C. Zeven, J. Waninge // *Euphytica*. – 1986. – Vol. 35. – No. 3. – P. 677-685.
190. Zhemchuzhina, A. I. Structure of populations of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006-2008 / A. I. Zhemchuzhina, N. N. Kurkova // *8th International wheat conference*. – 2010. – P. 279-279.
191. Ziyaev, Z. M. Improving wheat stripe rust resistance in Central Asia and the caucasus: Present status and future outlook. International Wheat Conference, 8; Abstracts of oral and poster presentations. 1-4 Jun 2010 / Z. M. Ziyaev et al. // *The international Wheat Conference; Abstracts of oral and poster presentations. 1-4 Jun 2010 ASt. Petersburg, Russia BVavilov Research Institute of Plant Industry*. – 2010. – No. CIS-5919. CIMMYT.