

ТЕРНОВСЬКА Т.К.✉, АНТОНЮК М.З., ШТЕФЮК Т.В., МАРТИНЕНКО В.С.

Національний університет «Києво-Могилянська академія» МОН України,

Україна, 04070, м. Київ, вул. Г. Сковороди, 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

✉ tern@ukma.kiev.ua, (095) 933-28-01

НЕКАНОНІЧНЕ УСПАДКУВАННЯ СТІЙКОСТІ ДО БОРОШНИСТОЇ РОСИ У ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЯХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ

Борошниста роса є одним із найбільш шкодочинних захворювань пшениці в країнах з помірним кліматом та опадами, які починаються у вегетаційному сезоні рано [1]. Генетичний захист сортів пшениці від цього захворювання є найбільш ефективним серед заходів боротьби з борошнистою росою. Гени стійкості до неї (*Pm*) належать до NBS-LRR родини *R*-генів підкласу CC-NBS-LRR (CNL) [2]. На сьогоднішній день у геномі м'якої пшениці ідентифіковано та локалізовано 58 генів стійкості до борошнистої роси [3]. Шість із них мають більше одного алеля: *Pm1*, *Pm2* та *Pm5* по 5 алелів, *Pm3* – 17 алелів, *Pm4* – 4 алелі, *Pm24* – 2 алелі стійкості [4–7]. Всі ці гени, окрім *Pm5*, *Pm9*, *Pm26*, *PmLK906* та *Pm2026*, є домінантними. Більшість із них привнесено у геном пшениці від її дикорослих родичів, представників вторинного та третинного генетичних пулів. Зокрема, передано 10 генів від роду *Aegilops* (*Pm12*, *Pm13*, *Pm19*, *Pm29*, *Pm32*, *Pm34*, *Pm35*, *Pm53*, *Pm57*, *Pm58*), 5 генів від роду *Secale* (*Pm7*, *Pm8*, *Pm17*, *Pm20*, *Pm56*), 2 гени від *Dasyphyrum* (*Pm21*, *Pm55*) та 5 генів від роду *Thinopyrum* (*Pm40*, *Pm43*, *Pm51*). Стійкість, що цими генами забезпечується, долається, іноді дуже швидко завдяки природній еволюції збудника, в якого на тлі певного селективного тиску відбираються мутанти зі зміненим геном вірулентності, що вже не упізнається геном стійкості, і рослина стає чутливою до ураження [1, 8]. Для ефективного перенесення чужинних генів стійкості на генетичне тло комерційних сортів пшениці є важливим, по-перше, створення стабільної пшеничної лінії, яку тривалий час можна використовувати у беккросній селекції як джерело стійкості до борошнистої роси, по-друге, за можливістю, вичерпна характеристика чужинного гена щодо його успадкування та функціонування на тлі нового для нього генотипу.

У статті наведено результати дослідження картини успадкування стійкості до борошнистої роси, яка притаманна низці гексаплоїдних ліній м'якої пшениці, що їхнє походження пов'язане з геномно-заміщеними амфідиплоїдами, у геномі яких у наявності геноми S (Авродес), S^{sh} (Аврозис) та U (Авролата) трьох видів егілопсу, *Aegilops speltoides*, *Ae. sharonensis* та *Ae. umbellulata* відповідно.

Матеріали і методи

До схрещувань було залучено лінії – похідні всіх трьох геномно-заміщених амфідиплоїдів, стійкість яких стабільно оцінювалася у 7–9 балів. Лінії схрещувалися одна з одною та з сортами м'якої пшениці (табл. 1). Одна з одною стійкі лінії схрещувалися для того, щоб за фактом розщеплення чи відсутності такого у F₂ отримати уявлення про одноманітність генетичного забезпечення стійкості. Було отримано та вивчено генерації F₂ від 48 комбінацій схрещування та для дев'яти комбінацій беккроси. Оцінку виконували за 9-бальною шкалою, за якою рослини з оцінкою 1–6 вважаються сприйнятливими, з оцінкою 7–9 – стійкими.

Результати та обговорення

Фенотип рослин F₁ збігався з фенотипом компонента схрещування з більш високим балом оцінки, тобто стійкість домінує. Беккрос виконано зі стійким компонентом схрещування. Такий напрямок обраний тому, що попередні спостереження за успадкуванням стійкості показали, що кількість стійких рослин у популяціях, що розщеплюються, набагато менша за ту кількість, яка очікується при розщепленні домінантно-рецесивних алелів. І ми хотіли отримати чітку відповідь на питання: чи будуть нащадки гібрида F₁ та стійкого батька такими, якими мають бути, судячи з фенотипу F₁, – стійкими. Позитивну відповідь було отримано лише для

однієї комбінації з дев'яти: (207 x 142) x 207, де лінія 207 була стійка з високим балом, похідна Авролати, а стійка лінія res142 є похідною Аврозису. Для решти схрещувань середня за вісь-

мома комбінаціями частка стійких рослин була 0,055 замість очікуваної одиниці. І ця частка не перевищувала частку стійких рослин, які спостерігалися у F₂, наведених у таблиці 1.

Таблиця 1. Результати вивчення гібридів від різних комбінацій схрещування за участю інтрогресивних ліній за стійкістю до борошністої роси

Комбінація схрещування ¹⁾	Оцінка батьків та F ₁			Кількість рослин F ₂		Комбінація схрещування	Оцінка батьків та F ₁			Кількість рослин F ₂	
	♀	♂	F ₁	s ³⁾	r		♀	♂	F ₁	s	R
12 x Аврора	7	3	7	0	75	258 x Тіра	7	5	7	0	79
17 x Аврора	7	3	7	0	123	53 x 19	7	7	7	0	123
113 x Аврора	7	3	7	1	108	164 x 254	7	7	7	0	102
164 x Аврора	7	3	7	0	82	165 x 163	7	7	7	8	71
190 x Аврора	7	3	7	1	85	176 x 177	7	7	7	0	117
212 x Аврора	7	3	7	1	92	176 x 121	7	7	7	0	113
216 x Аврора	7	3	7	2	114	177 x 121	7	7	7	6	76
217 x Аврора	7	3	7	0	165	189 x 221	7	7	7	44	67
221 x Аврора	7	3	7	0	90	195 x 143	7	7	7	0	125
222 x Аврора	7	3	7	0	62	195 x 254	7	7	7	1	38
243 x Аврора	7	3	7	19	62	196 x 143	7	7	7	2	122
70 x 7	7	5	8	1	109	206 x 142	7	7	7	9	111
222 x 202	7	5	7	3	73	42 x Аврора	9	3	7	9	71
28 x Одеська ²⁾	7	5	7	2	110	83 x Аврора	8	3	7	11	101
55 x Одеська	7	5	7	0	125	207 x 7	8	5	7	32	67
141 x Одеська	7	5	7	1	116	38 x Одеська	8	5	7	62	77
143 x Одеська	7	5	7	10	71	38 x Тіра	8	5	8	43	60
216 x Одеська	7	5	7	48	50	39 x Одеська	8	5	7	6	106
217 x Одеська	7	5	7	0	105	120 x 143	8	7	7	4	91
221 x Одеська	7	5	7	0	93	207 x 142	8	7	7	19	105
254 x Одеська	7	5	7	0	100	226 x 237	8	7	7	82	10
25 x Тіра	7	5	7	41	56	206 x 211	7	9	7	11	66
28 x Тіра	7	5	7	17	108	211 x 215	9	7	7	0	120
254 x Тіра	7	5	8	32	81	38 x 120	8	8	7	45	28

Примітки: ¹⁾ лінії 7–83 є похідними Авродесу, 113–143 є похідними Аврозису, 166–258 є похідними Авролати; ²⁾ Одеська 267; ³⁾ s – сприйнятливий, r – стійкий.

У всіх комбінаціях спостерігали одне і те саме відхилення від теоретично очікуваної кількості стійких рослин у бік її зменшення. Більше того, від схрещування стійких ліній різного походження одна з одною у F₂ з'являлися сприйнятливі рослини аж до повної відсутності стійких (табл. 1). Навіть якщо припустити, що стійкість є результатом взаємодії кількох генів, при домінуванні у F₁ серед рослин F₂ частка стійких буде падати досить повільно: від 0,56 до 0,32 при кількості комплементарних генів два та чотири відповідно. Як видно з таблиці 1 та ри-

сунка 1 (а), взагалі не було таких комбінацій від схрещування стійкого та сприйнятливого компонентів схрещування, щоб частка стійких рослин сягала хоча б 0,3. Стійких рослин було на порядок менше.

Коли у схрещуваннях беруть участь лінії інтрогресивного походження і у поколінні, що розщеплюється, спостерігається відхилення від теоретично очікуваного співвідношення між фенотипними класами, перше, що видається чинником такого відхилення, – це розташування критичного гена у хромосомі, яка у гібриді F₁,

що продукує гамети для отримання F_2 , не утворює бівалент із гомологом партнера за схрещуванням і частково втрачається через свій унівалентний стан та неупорядковану поведінку у анафазі [9].

Коли в метафазі мейозу утворюються та нерегулярно розходяться два уніваленти, можливе варіювання у складі гамет та зигот, що формуються такими гібридами F_1 . У таблиці 2 наведені результати розрахунку співвідношення стійких та сприйнятливих рослин за всіх гіпотетичних варіантів формування та функціонування гамет та утворення життєздатних зигот, які дійдуть до стадії оцінки на стійкість до борошнистої роси. Фактичні співвідношення характери-

зуються екстремально великою кількістю сприйнятливих рослин. Максимальне очікуване співвідношення 1,5 сприйнятливих : 1 стійких очікується за умов функціонування всіх жіночих та еуплоїдних чоловічих гамет, якщо нулісоміки за пшеничною хромосомою нежиттєздатні (табл. 2). Фактичні співвідношення у F_2 від схрещування стійкого та сприйнятливого компонентів схрещування навіть не наближаються до такого співвідношення (табл. 1, рис. 1 а). Отже, навіть якщо ген стійкості входить до складу хромосоми, яка не утворює бівалент у мейозі гібриду F_1 , цей чинник не може призвести до результатів, які отримано.

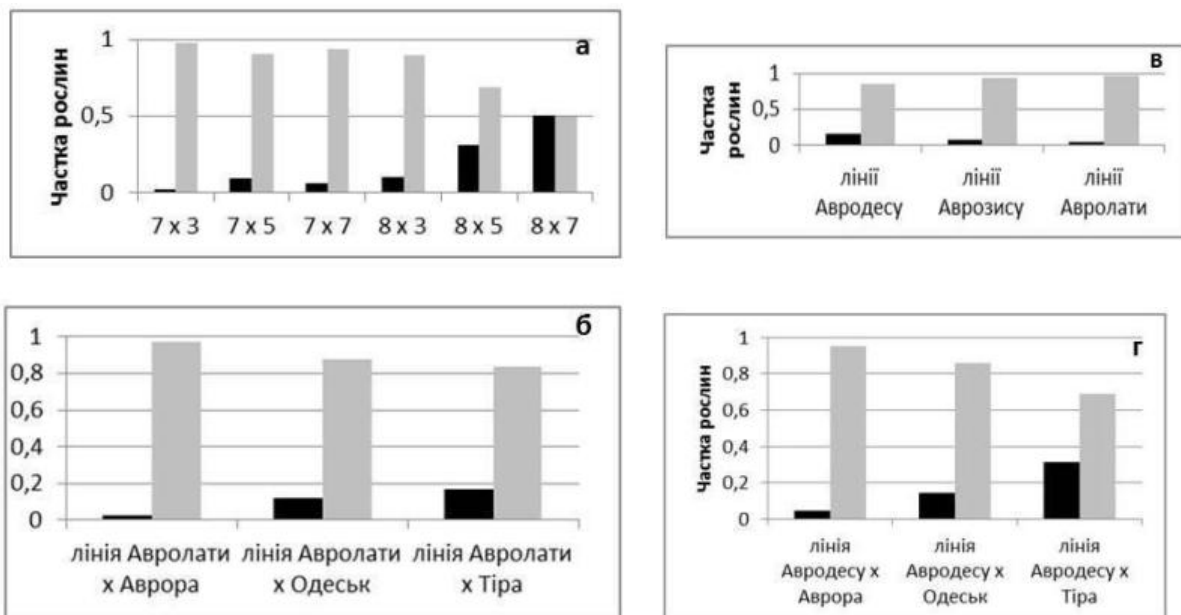


Рис. 1. Гістограми частот стійких (чорні стовпчики) і сприйнятливих (сірі стовпчики) рослин у F_2 : а – комбінації схрещування сортовано відповідно до стійкості компонентів схрещування, у підписі до горизонтальної осі вказано бали; б – сортовано за походженням лінії (від Авродесу, Аврозису, Авролати), які схрещували з сортами м'якої пшениці; в – сортовано за стійкістю сортів м'якої пшениці від найменшої (Аврора) до найбільшої (Тіра), з якими схрещували лінії Авролати; г – сортовано за стійкістю тих самих сортів м'якої пшениці, з якими схрещували лінії Авродесу.

Комбінації у таблиці 1 скомпоновані так, щоб від першої до останньої зростала стійкість компонентів схрещування. У цілому видно, що більше стійких рослин було в комбінаціях за участю ліній з оцінкою 8–9 у порівнянні з такими з оцінкою 7 (рис. 1 а). Кількість стійких рослин була найменшою у комбінаціях, де м'якою пшеницею був сорт Аврора, стійкість якого значно поступається стійкості сортів Одеська

267 та Тіра (рис. 1 б, г). У цілому лінії – похідні Авродесу – більш успішно передавали нащадкам у популяціях, що розщеплюються, стійкість до борошнистої роси у порівнянні з лініями – похідними Аврозису та Авролати (без доведення статистичної значущості різниці). Авродес та Аврозис є резистентними до борошнистої роси, а Авролата вражається в окремі роки з балом 5–4. І все ж серед ліній – похідних Авролати – є

кілька повністю стійких до хвороби, і саме ці лінії при схрещуванні як із сортами м'якої пшениці, так і одна з одною дають найбільшу частку стійких рослин у порівнянні з інтрогресивними лініями іншого походження.

Гистограма 1а формує враження, що стійкість носить кількісний характер. Видно, що кількість стійких рослин збільшується поряд зі збільшенням стійкості другого (нестійкого) компонента схрещування. Хоча сорти з балом 3 (Аврора) та балом 5–6 (Тіра) вважаються сприйнятливими, серед нащадків від схрещування стійких інтрогресивних ліній із сортом Тіра стійких рослин помітно більше, ніж серед нащадків від схрещування з Авророю. І це не можна пояснити просто тим, що гени *Pm*, які забезпечують стійкість ліній, та гени, які підви-

щують оцінку стійкості з трьох (Аврора) до п'яти–шести балів (Тіра), комбінують у нащадках F_2 та дають більш високий рівень оцінки, оскільки оцінка стає вищою у порівнянні з сортами пшениці: стійкими вважаємо рослини з балом 7–9, а не 5–6, як у Тіри. Отже, крім генів *Pm*, які забезпечують вертикальну стійкість до певних рас збудника, і ця стійкість є повною, якісною, у сортів пшениці, не таких сприйнятливих, як Аврора, формується расоспецифічна горизонтальна стійкість, що може забезпечувати стійкість рослин на рівні 7 балів. Отже, для прояву генів стійкості генетичне тло, на якому відповідний ген буде експресуватися до критичної ознаки, не є нейтральним та вносить свої корективи.

Таблиця 2. Співвідношення фенотипних класів «сприйнятливі» – «стійкі» у F_2 за умов формування різних гамет та функціонування різних зигот, коли у метафазі гібридів F_1 у наявності два уніваленти

Функціонують гамети	Частка рослин		Відношення сприйнятливі:стійкі
	стійких	сприятливих	
Функціонують усі зиготи			
1. Усі	0,4375	0,5625	1,29
2. Лише 21 – хромосомні	0,75	0,25	0,33
3. Жіночі всі, чоловічі 21-хромосомні	0,625	0,375	0,6
4. Жіночі 21 – 22-хромосомні, чоловічі 21 – хромосомні	0,7857	0,2143	0,27
Не функціонують зиготи, нулісомні за пшеничною хромосоною			
1. Усі	0,4375	0,5625	1,29
2. Лише 21 – хромосомні	0,6667	0,3334	0,5
3. Жіночі всі, чоловічі 21 – хромосомні	0,4	0,6	1,5
4. Жіночі 21 – 22-хромосомні, чоловічі 21 – хромосомні	0,7273	0,2727	0,375
Не функціонують зиготи, нулісомні за парою гомеологів			
1. Усі	0,64	0,36	0,5625
2. Лише 21-хромосомні	0,75	0,25	0,33
3. Жіночі всі, чоловічі 21 – хромосомні	0,625	0,375	0,6
4. Жіночі 21 – 22-хромосомні, чоловічі 21 – хромосомні	0,7857	0,2143	0,2727

Отже, наведені результати переконливо засвідчують лише одне: ми не можемо побудувати модель успадкування стійкості до борошнистої роси, коли стійким компонентом у комбінаціях схрещування виступає лінія інтрогресивного походження. Можна припустити, що інтрогресивні ділянки хроматину втрачаються, не передаються через гамети у поколіннях. Але вони стабільно передаються у самих лініях, адже до схрещувань були залучені лише ті лінії, які протягом 10-річного спостереження залишалися стабільно стійкими. Насіння F_1 отримується з одного колоса однієї рослини лінії. Насіння F_2 отримується від кожної рослини F_1 окремо, попередньо оціненої на стійкість. Виходить, що стійкість зникає катастрофічно, якщо взяти до уваги кількість стійких рослин у F_2 , саме на стадії формування популяції, що розщеплюється, тобто в популяції, яка складається з генетично різноманітних рослин. На сьогодні відомо багато молекулярних механізмів, які призводять до зміни експресії генів без втручання до їх нуклеотидної основи. Це метилування промотора, гетерохроматизація чужинного хроматину внаслідок ремоделювання, РНК-опосередкована інтерференція експресії гена, активація транспозонів, що супроводжує відповідь рослин на різні стреси, в тому числі гібридизацію [10, 11]. І всі ці зміни експресії спрямовані на замовчування гена, що на фенотипному рівні призводить до зменшення частки стійких рослин проти очікуваної та залишає враження про втрату інтрогресивного матеріалу у рослинах, які мають гібридне походження.

Чи то відбувається втрата чужинного генетичного матеріалу при формуванні гамет та утворенні життєздатних зигот через негативний добір елементів репродукції з поганою пристосованістю, чи то чужинний матеріал нормально передається гібридами своєму насінневому потомству, проте у подальшому припиняється експресія критичного гена, результат маємо

один: у гібридних поколіннях, що розщеплюються, кількість стійких рослин проти очікуваної зменшується на порядок та більше. В нашому випадку виявилось, що беккрос зі стійким компонентом схрещування, тобто повторне схрещування з інтрогресивною лінією, погіршує результати щодо частки стійких рослин навіть у порівнянні з F_2 . Пояснити це, спираючись лише на звичні поняття комбінаторної генетики, не можна. Такі результати оцінки гібридних популяцій показують, що завдання перенесення чужинного гена стійкості на генетичне тло комерційного сорту м'якої пшениці, яке є результатом тривалої консолідації через добір найбільш оптимальних генотипів, без використання внутрішньогенних молекулярних маркерів є не дуже конструктивним. Підтвердження факту передачі такого гена на молекулярному рівні має передувати спробам з'ясувати, чому рослина не демонструє стійкість: чи вона не має чужинного гена стійкості, чи ген у наявності у складі геному, проте не функціонує.

Висновки

Спроба встановити характер успадкування стійкості до борошнистої роси, яка контролюється генами чужинного походження, переданими до м'якої пшениці від трьох видів егілопсів, виявилася невдалою. Модель успадкування не може бути побудована на базі традиційних уявлень про комбінаторику альтернативних алелів, що увійшли до складу гібриду F_1 . Врахування факту можливих наслідків неповної кон'югації хромосом у гібриді F_1 для розрахунку очікуваних співвідношень фенотипних класів покращує ситуацію, але не розв'яже проблему остаточно. При використанні інтрогресивних ліній у беккросній селекції варто беккросити чергувати з поколінням самоzapилення для запобігання втрати чужинного гена у ранніх поколіннях.

Література

1. Conner R.L., Kuzuk A.D., Su H. Impact of powdery mildew on the yield of soft white spring wheat cultivars // *Can J. Plant Sci.* – 2003. – 83. – P. 725–728.
2. Tommasini L., Yahiaoui N., Srichumpa P., Keller B. Development of functional markers specific for seven *Pm3* resistance alleles and their validation in the bread wheat gene pool // *TAG.* – 2006. – V. 114 (1). – P. 165–175.
3. McIntosh R., Dubcovsky J., Rogers W., Morris C., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement, 1–20.
4. Hao Y., Parks R., Cowger C., Chen Z., Wang Y., Bland D., Johnson J. Molecular characterization of a new powdery mildew resistance gene *Pm54* in soft red winter wheat // *TAG.* – 2015. – V. 128 (3). – P. 465–476.
5. Ma P., Xu H., Xu Y., Li L., Qie Y., Luo Q., An D. Molecular mapping of a new powdery mildew resistance gene *Pm2b* in Chinese breeding line KM2939 // *TAG.* – 2015. – V. 128 (4). – P. 613–622.

6. Sun Y., Zou J., Sun H., Song W., Wang X., Li H. PmLX66 and PmW14: New Alleles of Pm2 for Resistance to Powdery Mildew in the Chinese Winter Wheat Cultivars Liangxing 66 and Wennong 14 // *Plant Disease*. – 2015. – V. 99 (8). – P. 1118–1124.
7. Xu H., Yi Y., Ma P., Qie Y., Fu X., Xu Y., An D.. Molecular tagging of a new broad-spectrum powdery mildew resistance allele Pm2c in Chinese wheat landrace Niaomai // *TAG*. – 2015. – V. 128 (10). – P. 2077–2084.
8. Olivera P.D., Millet E., Anikster Y., Steffenson B.J. Genetics of Resistance to Wheat Leaf Rust, Stem Rust, and Powdery Mildew in *Aegilops sharonensis* // *Genetics and Resistance*. – 2008. – V. 98, No. 3. – P. 353–358.
9. Sears E.R. The aneuploids of common wheat // *Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin*. – University Archives of the University of Missouri, Columbia, MO, 1954. – V. 572.
10. Zhao N., Zhu B., Li M., Wang L., Xu L., Zhang H., Zheng Sh. Qi B., Han F., Liu B. Extensive and heritable epigenetic remodeling and genetic stability accompany allohexaploidization of Wheat // *Genetics*. – 2011. – V. 188. – P. 499–509.
11. Madlung A., Wendel J.F. Genetic and epigenetic aspects of polyploid evolution in plants // *Cytogenet Genome Res*. – 2013. – V. 140. – P. 270–285.

TERNOVSKA T.K., ANTONYUK M.Z., SHTEFIUK T.V., MARTYNENKO V.S. *National University of “Kyiv-Mohyla Academy”*,
Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: tern@ukma.kiev.ua

NON-CANONICAL INHERITANCE OF POWDERY MILDEW RESISTANCE IN COMMON WHEAT INTROGRESSIVE LINES

Aim. Determine the nature of inheritance of powdery mildew resistance in common wheat introgressive lines developed with *Aegilops* species. **Methods.** Interline crossing, individual assessment of plants for resistance to powdery mildew, modeling of phenotypic classes ratios. **Results.** Empirical segregation for the trait susceptibility/resistance to powdery mildew in F_2 and backcross plants from the crosses of introgressive lines of common wheat and its cultivars were characterized by ultra high frequency of appearance of susceptible plants. Susceptible plants appeared among progeny of resistant parents, and in backcross populations from crossing of resistant F_1 hybrids with resistant crossing component. Considering influence of gametes formation with different chromosome numbers and zygotes with different viability on segregation ratios did not give the possibility to develop adequate model of inheritance. **Conclusions.** Inheritance of powdery mildew resistance of wheat plants, which is controlled by alien resistance genes could not be modeled on the basis of traditional combinatorics of alternative alleles in hybrids without information about the expression of the gene of interest on molecular level.

Keywords: wheat introgressive lines, powdery mildew, inheritance model, aneuploid gametes.