

На правах рукописи



БАРАНОВА
Ольга Александровна

**АНАЛИЗ НАСЛЕДОВАНИЯ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ
УСТОЙЧИВОСТИ РЖИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ**

Специальность: 06.01.11 – защита растений
03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2004

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений.

Научный руководитель: доктор биологических наук
Андрей Петрович Дмитриев
Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ольга Сильвестровна Афанасенко
кандидат биологических наук
Николай Александрович Проворов
Ведущее учреждение: ГНЦ РФ
Всероссийский научно-исследовательский
институт растениеводства
имени Н.И. Вавилова

Защита состоится " 8 " июля 2004 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург, Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3.

Факс: 470-51-10. E-mail: vizrspb@mail333com

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений.

Автореферат разослан " 9 " ИЮЛЯ 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.А. Наседкина

2006-4
20995

2205253

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Рожь является одной из основных продовольственных культур России. Различные, заболевания, вызываемые грибными патогенами, в том числе и бурая ржавчина значительно снижают урожай зерна ржи. Так, вредоносность бурой ржавчины (возбудитель - *Puccinia dispersa* Eriks et E. Henn.) в годы эпифитотии на посевах длинностебельной ржи может достигать 30-40%, а на посевах короткостебельной - до 80%.

В свете этого, изучение иммунитета ржи является одной из главных задач, входящих в стратегию селекции устойчивых сортов, успешное создание которых возможно только на основе знания закономерностей генетического контроля устойчивости, идентификации и картирования генов, контролирующих признак.

Однако изучению генетики устойчивости ржи к грибным заболеваниям, в том числе к бурой ржавчине, посвящено незначительное количество работ. Известно, что культурная рожь (*Secale cereale* L.) обладает собственным генетическим потенциалом устойчивости, выявлено небольшое количество эффективных генов устойчивости к бурой ржавчине, которые наследуются олигогенно и доминантно. Только несколько генов устойчивости локализованы на 1R и 6R хромосомах ржи.

Изучение генетики ржи в целом и генетики устойчивости к грибным заболеваниям в частности, сдерживается перекрестным характером опыления ржи и существующей у этого вида строгой системой гаметофитной самонесовместимости. Эти трудности можно преодолеть, используя в генетическом анализе автофертильные инбредные линии ржи, несущие мутации автофертильности (sf - мутации). Большая коллекция таких линий создана и поддерживается в лаборатории генетики растений Биологического НИИ Санкт-Петербургского Государственного Университета (БиНИИ СПбГУ). Известны морфологические, биохимические и молекулярные маркеры всех семи хромосом гаплоидного набора ржи, определены группы сцепления, что позволяет вести работу по локализации генов устойчивости.

Таким образом, малочисленность сведений по генетике устойчивости ржи к бурой ржавчине и необходимость этих знаний для селекции устойчивых сортов позволяют считать подробное изучение генетической природы устойчивости, локализацию и картирование генов устойчивости актуальными.

Цель и задачи исследований. Цель работы - определение генетической детерминации наследования специфической устойчивости ржи к бурой ржавчине и картирование генов устойчивости на хромосомах ржи.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Выявить естественный генетический потенциал устойчивости ржи к бурой ржавчине на основе изучения коллекции автофертильных линий.
2. Определить закономерности наследования устойчивости

3. Провести локализацию генов устойчивости к бурой ржавчине на хромосомах ржи.
4. Составить карты участков хромосом ржи, несущих гены устойчивости.

Научная новизна. Впервые в России проведена локализация генов устойчивости. Ряд генов локализован на 1R и впервые на 5R хромосомах ржи. Выявленные гены картированы с использованием изозимных маркеров и мутаций автофертильности. Рассчитаны теоретически ожидаемые расщепления по устойчивости с учетом частоты рекомбинации между локусом несовместимости и геном (генами) устойчивости для случаев как однолокусного, так и многолокусного контроля устойчивости.

Практическая значимость работы. Картирование генов устойчивости на конкретных хромосомах ржи позволяет целенаправленно вовлекать их в селекцию обычных и, особенно, гибридных сортов ржи, а также использовать полученные данные для переноса генов в пшеницу и тритикале. Теоретически рассчитанные расщепления могут быть использованы при изучении генетики болезнестойчивости ржи для правильной интерпретации получаемых результатов и как первичный показатель для локализации выявленных генов устойчивости. Лабораторная методика отбора наиболее устойчивых растений может быть рекомендована как быстрый способ повышения устойчивости уже существующих сортов ржи.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на международных конференциях: "Sustainable Systems of Cereal Crop Protection against Fungal Diseases as the Way of Reduction of Toxin Occurrence in Food Webs" (Чехия, 2001 год), "Первая Всероссийская конференция по иммунитету растений к болезням и вредителям" (Санкт-Петербург, 2002) и "Disease Resistance in Plant Pathology" (Чехия, 2002).

Публикация результатов исследования. Материалы исследований опубликованы в 8 печатных работах.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, заключения, выводов, списка литературы, включающего 176 работ, в том числе 102 на иностранных языках и приложения. Работа изложена на 206 страницах машинописного текста, содержит 45 таблиц и 35 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Введение

Обоснована актуальность темы.

Глава 1. УСТОЙЧИВОСТЬ РЖИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ ГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ (обзор литературы)

Приведены сведения по истории возделывания и биологии ржи, по биологии и вредоносности патогена. Рассмотрены современные направления селекции ржи на болезнестойчивость и основные данные по генетике устойчивости ржи к бурой ржавчине. Описана проблема картирования генов

ржи, в том числе генов устойчивости, с использованием разнообразных маркеров. Сформулированы цель и задачи исследования

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исходным материалом служили автофертильные инбредные линии ржи (304 линии) из коллекции лаборатории генетики растений БиНИИ СПбГУ, предоставленные А.В. Войлоковым.

В работе использовались полученные автором межлинейные гибриды (18 гибридов) и гибриды F_1 (41 гибрид), полученные О. В. Солодухиной методом многократных беккроссов гетерозиготного, устойчивого растения на восприимчивый сорт Ильмень, и в последнем скрещивании на автофертильные линии 5 и 8.

Для оценки на устойчивость инбредные линии ржи из коллекции БиНИИ СПбГУ и гибриды, выращивались в лабораторных и тепличных условиях. Изученные гибриды F_1 после яровизации высаживали в поле и посредством самоопыления получали F_2 .

Монопустульные изоляты выделяли из популяций возбудителя бурой ржавчины, полученных из разных регионов России, а так же Германии, и размножали на отрезках листьев ржи сорта Волхова. Размножение клонов и оценку устойчивости линий и гибридов к возбудителю ржавчины (*P. dispersa*) проводили по лабораторной методике культивирования возбудителя (Михайлова, Квитко, 1970) в фазу от проростков до кушения. Учет поражения проводили на 7 - 9 день после заражения по пятибалльной шкале (0 - 4) Е. В. Mains и Н. S. Jackson (1926).

Изозимы экстрагировали из листьев растений в фазе кушения в 0,1 М Трис-НС1 буфере (рН=8,0), содержащем 0,5М сахарозы, 0,1% аскорбиновой кислоты и 0,1% гидрохлорида цистеина (Sako, Stachmann, 1972). Полученные гомогенаты центрифугировали в течение 15 мин. при 10000 x g и T = 0°C. Супернатант использовали для нанесения на стартовые позиции при электрофорезе или изоэлектрическом фокусировании.

Разделение изоферментов (кроме эстеразы и пероксидазы) проводили в аппаратах для электрофореза с вертикальными пластинками геля. Для малатдегидрогеназы (МДН) использовали 5% полиакриламидный гель, для эндопептидазы (EP), лейцинаминопептидазы (LAP), бета-глюкозидазы (β -GLU), диафоразы (DIA) и фосфоглюкозоизомеразы (PC1) - 6%, а для аспартатами노트рансферазы (AAT) и супероксиддисмутазы (SOD) -7,5% гель. Гелевые пластины готовили при использовании Трис-НС1 (рН=8,9) как гелевого буфера и Трис-глицина (рН=8,3) как электродного буфера (Маурер, 1971).

Пероксидазы (PRX) и эстеразы (EST) разделяли с помощью изоэлектрического фокусирования в тонкослойной полиакриламидной пластинке с интервалом рН 3,6-10 по методике, описанной П. Велингом (1986). Изоферменты выявляли по стандартным методам с некоторыми модификациями (Beauchamp, Fridovich, 1971; Brown et al., 1978; Wehling, 1986).

Использовали также морфологические маркеры - отсутствие воскового налета на растении (w) и короткостебельность (dw).

Соответствие фактических расщеплений по генам, вовлеченным в анализ, теоретически ожидаемым соотношениям проверяли на основе значения χ^2 (для признаков с доминантным проявлением). Анализ сегрегационного поведения изозимных маркеров с кодоминантным проявлением и тест на наличие-отсутствие сцепления проводили методом разложения общего χ^2 , оценивая значения соответствующих компонентов (Wehling, 1986). Расчет частоты рекомбинации и ее статистической ошибки ($r \pm s, \%$) выполнялся на основе метода максимального правдоподобия (Allard, 1956). Вычисления осуществляли с помощью программы RECOMB (автор – М.И. Рахман). Сцепление кодоминантных и доминантных маркеров с *sf* – мутациями устанавливали на основе критериев гаметической селекции (Weber, Wricke, 1994). В случае однотипных расщеплений в разных семьях F_2 данные объединялись после проверки их на однородность с помощью критерия χ^2 при $P > 0,05$. Также использовали *t* - критерий Стьюдента (Плохинский, 1961).

Глава 3. ГЕНЕТИКА УСТОЙЧИВОСТИ РЖИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ

3.1. Выявление генофонда устойчивости ржи

Осуществлена оценка 304 инбредных линий ржи из коллекции БиНИИ к 27 клонам бурой ржавчины, выделенным из петергофской популяции. Выявлено, (рис 1), что 59,19% линий обладает устойчивостью к большинству использованных клонов *P dispersa* (от 40 до 100%).



Рис. 1. Устойчивость автофертильных линий ржи к бурой ржавчине

Для получения межлинейных гибридов F_1 и изучения генетики устойчивости, на основе результатов анализа коллекции, отобраны линии, различающиеся по реакции на заражение.

При оценке коллекции на устойчивость обнаружена неоднородность некоторых линий ржи по признаку устойчивости к клонам гриба. В связи с выявленной гетерогенностью продолжен инцухт этих линий для получения

гомозиготных по устойчивости к бурой ржавчине форм, что значительно облегчит дальнейшее изучение генетики устойчивости ржи.

Проведенная работа подтвердила наличие у культурной ржи генетического потенциала устойчивости, который можно использовать в селекции. Насыщение сорта растениями с повышенной устойчивостью может существенно снизить степень его поражения. Проведен модельный опыт по повышению устойчивости к бурой ржавчине сорта Волхова. В лабораторных условиях осуществлен отбор растений, устойчивых к нескольким, наиболее распространенным клонам гриба и, после переопыления отобранных растений, создана новая сортовая популяция, в 2 раза менее поражаемая паразитом, чем исходный сорт (рис. 2).

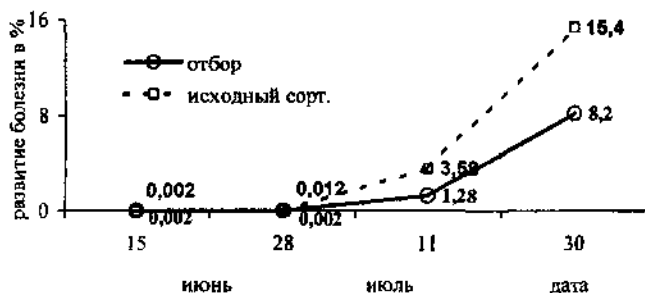


Рис. 2 Среднее развитие болезни на делянках исходной сортовой популяции сорта Волхова и в популяции отобранных по устойчивости растений того же сорта

3.2. Анализ гибридов F_1 на устойчивость к клонам *Puccinia dispersa*

В результате проведенного анализа 59 гибридов F_1 была получена их характеристика по устойчивости. Также, были отобраны устойчивые растения гибридов F_1 , полученных как серия беккроссов, которые, исходя из схемы скрещивания, должны быть гетерозиготами по устойчивости.

3.3. Изоферментный анализ гибридов F_1

Изоферментный анализ гибридов F_1 проведен в лаборатории генетики растений БиНИИ СПбГУ. Все 59 гибридов F_1 проанализированы на 8 ферментных систем, гены, контролируемые которые, локализованы в 1,2,3,4 и 6 хромосомах ржи. Определены генотипы гибридов F_1 по аллельным вариантам изозимов с кодоминантным появлением. Произведен отбор гетерозигот F_1 для дальнейшего анализа гибридов F_2 .

3.4. Анализ расщеплений гибридов F_2 по устойчивости к клонам *Puccinia dispersa*

Всего изучено 10 гибридов – гибриды, полученные от скрещивания автостерильных растений на автофертильную линию 5 (№№ 6, 14, 29) и меж-

линейные гибриды (№№ 44p2, 43p5, 46, 53, 54, 59 и 61). Некоторые клоны гриба, использованные для первичного анализа родительских растений, сохранить в течение нескольких лет, требуемых для генетического анализа, не удалось в связи с отсутствием соответствующего оборудования. Поэтому растения F₂ оценивали как исходными клонами (7, 12, 21, 23, 25, 81), так и клонами, вновь выделенными из петергофской, дербентской и немецкой (61, D1, D2, 108, 137 и 152) популяций бурой ржавчины. Вместе с растениями гибридов F₂ на устойчивость оценивали и их родительские линии (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика родительских линий ржи

Линия	sf- мутация	Восприимчивость к клонам <i>Puccinia dispersa</i>											
		23	D1	7	21	81	152	108	25	12	137	61	D2
л5	S ^I (1R)*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
л6	S ^I (1R)	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
44/96	Z ^I (2R)	-	-	-	-	+	+	+	h	+	+	-	+
116/95	T ^I (5R)	h	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
536/92	T ^I (5R)	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+
8/96		+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-
445/92	Z ^I ? (2R)	h	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+
45/94	T ^I (5R)	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+
450/92	T ^I (5R)	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
532/92	T ^I (5R)	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
21/96	T ^I (5R)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
510/92	Z ^I (2R)	h	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+

Примечание: "+" – восприимчивость; "-" – устойчивость, h – гетерогенность; * – хромосомная локализация мутации автофертильности.

Критерием неаллельности генов устойчивости при анализе расщеплений в F₂ считали несовпадение реакций одного и того же растения к двум разным клонам гриба. Количество таких несовпадений достаточно велико и составляло от 20 до 78%.

Поскольку проведенные скрещивания независимы от генетических исследований проведенных ранее другими авторами, а тест на аллелизм с уже выявленными генами не проводили, для обозначения выявленных нами генов мы используем букву R (от – resistance) сопровождаемую номером использованного клона гриба. Так, ген R7 – означает ген, обуславливающий устойчивость к клону №7 возбудителя бурой ржавчины ржи.

Выявлен моногенный, дигенный и тригенный доминантный и рецессивный контроль устойчивости к клонам гриба. Полученные данные согласуются с результатами, полученными другими авторами, изучавшими расщеплительную устойчивость ржи (Musa et al., 1984; Musa, 1985; Scholz, Wehling, 1996; Солодухина, 2003).

Моногибридные расщепления представлены в таблице 2. Дигибридные и тригибридные расщепления, выявленные при анализе на устойчивость гибридов F_2 , представлены в таблице 3.

Таблица 2

Моногибридные расщепления по устойчивости к клонам *Puccinia dispersa* в инбредных семьях F_2 межлинейных гибридов и гибридов между автостерильными растениями и автофертильными линиями

Гибрид	Клон	Фактическое расщепление		Теоретическое расщепление		χ^2	P >
		у	в	у	в		
29 (35 × л. 5)	12	76	19	3	1	1,267	0,500
14 (14/2 × л. 5(S ¹))	D1	30	47	1	1*	3,753	0,100
6 (7/1 × л. 5(S ¹))	7	52	62	1	1*	0,877	0,500
29 (35 × л. 5(S ¹))		55	40	1	1*	2,368	0,200
46 (536/92 × 8/96)	23	26	53	1	3	2,637	0,200
43p5 (116/95 × 21/96)		62	30	3	1	2,841	0,100
6 (7/1 × л. 5)		32	72	1	3	1,846	0,200
59 (450/92 × 532/92)		21	40	1	3	2,891	0,100
43p5 (116/95 × 21/96)		21	66	1	3	0,034	0,850
53p10p3 (л. 6 × 450/92)	21	62	21	3	1	0,004	0,850
61 (510/92 × 445/92)		79	22	3	1	0,558	0,500
29 (35 × л. 5)	81	73	21	3	1	0,355	0,750
43p5 (116/95 × 21/96)		14	64	1	3	2,068	0,200
29 (35 × л. 5)		78	17	3	1	2,558	0,200
43p5 (116/95 × 21/96)		17	71	1	3	1,515	0,250
29 (35 × л. 5)	108	70	24	3	1	0,014	0,850
14 (14/2 × л. 5)	25	37	40	1	1	0,117	0,750
29 (35 × л. 5)		73	21	3	1	0,355	0,750
6 (7/1 × л. 5)	137	85	30	3	1	0,072	0,850
59 (450/92 × 532/92)		11	50	1	3	1,579	0,200
6 (7/1 × л. 5)	61	90	25	3	1	0,652	0,500
53p10p3 (л. 6 × 450/92)		13	65	1	3	2,889	0,100
54 (44/96 × 116/95)		26	81	1	3	0,028	0,850
6 (7/1 × л. 5)	D2	73	20	3	1	0,606	0,500
46 (536/92 × 8/96)		19	58	1	3	0,004	0,850

*Отклонение в расщеплении предположительно связано со сцеплением гена устойчивости с sf-мутацией.

Расщепления 15 : 1 или 63 : 1 свидетельствуют о наличии у изучаемых родителей 2-3 независимых доминантных генов, обеспечивающих устойчивость соответственно к 2 - 3 имеющимся у клона ржавчины комплементарным генам авирулентности. Расщепления типа 7 : 9 и 37 : 27 свидетельствуют о том, что устойчивость родителей детерминирована рецессивными аллелями

соответственно 2 или 3 генов. В двух случаях выявлен комплементарный характер взаимодействия генов (табл. 3). Гипотезу наследования выбирали на основании проявления признака в F_1 гибридов, что описано в диссертационной работе.

Таблица 3

Дигибридные и тригибридные расщепления по устойчивости к клонам *Puccinia dispersa*

Гибрид	Клон	Фактическое расщепление		Теоретическое расщепление		χ^2	P >
		у	в	у	в		
29 (35 × л. 5)	23	86	9	15	1	1,685	0,200
61 (510/92 × 445/92)		58	49	9	7	0,182	0,750
44p2 (45/94 × 116/95)		64	44	9	7	0,397	0,750
54 (44/96 × 116/95)		105	2	63	1	0,065	0,850
61 (510/92 × 445/92)	7	51	55	7	9	0,820	0,500
46 (536/92 × 8/96)	21	39	40	7	9	1,013	0,500
61 (510/92 × 445/92)	152	49	58	7	9	0,192	0,750
59 (450/92 × 532/92)		32	32	7	9	1,015	0,500
46 (536/92 × 8/96)		78	1	63	1	0,045	0,850
61 (510/92 × 445/92)	108	43	65	7	9	0,680	0,500
43p5 (116/95 × 21/96)		47	53	7	9	0,429	0,750
61 (510/92 × 445/92)	25	44	64	7	9	0,397	0,750
59 (450/92 × 532/92)		21	39	7	9	1,867	0,200
43p5 (116/95 × 21/96)		64	36	37	27	1,570	0,200
6 (7/1 × л. 5)	12	42	62	7	9	0,479	0,500
44p2 (45/94 × 116/95)		98	9	15	1	0,853	0,500
54 (44/96 × 116/95)		101	7	15	1	0,010	0,850
44p2 (45/94 × 116/95)	D1	61	46	37	27	0,028	0,850
43p5 (116/95 × 21/96)		56	38	37	27	0,120	0,750
61 (510/92 × 445/92)		48	59	7	9	0,054	0,850

При анализе расщепления гибридов F_2 обнаружены отклонения от стандартных соотношений, предположительно связанные со сцеплением изучаемого гена устойчивости и мутантного локуса несовместимости. В работе выявлены нестандартные соотношения по устойчивости 1 : 1, 5 : 7 и 9 : 15.

Автостерильность у ржи контролируется комплементарно взаимодействующими гаметофитными генами S, Z и T, с серией множественных аллелей по каждому гену, локализованными в 1R (S), 2R (Z) и 5R (T) хромосомах, соответственно. Автофертильные формы ржи несут мутантные неактивные аллели генов несовместимости. При скрещивании автофертильной линии с автостерильной формой, либо автофертильных линий, несущих sf-мутации в разных локусах, образуются гетерозиготы типа $S^f S^n$ (или $S^f S^n Z^f Z^m$), где n, m - любая активная аллель гена S, a f - мутация автофер-

тельности. При самоопылении таких гибридов оплодотворение получается только за счет 50% (или 75%) пыльцевых зерен, несущих S^f аллель (аллели) Это приводит к отклонениям от менделевского расщепления по маркерам, сцепленным с локусом несовместимости.

Эти случаи (1 : 1, 2 : 1, 5 : 1) хорошо изучены (Смирнов, Соснихина, 1984; Войлоков и др., 1994; Weber, Wricke, 1994) для ряда моногенно наследуемых изоферментных и морфологических маркеров.

При анализе генетики устойчивости обычна ситуация, когда родительские растения содержат несколько доминантных генов устойчивости, а используемые для оценки клоны паразита несколько генов авирулентности. Это приводит к расщеплениям по типу полимерии, хотя обусловлено лишь тем, что каждый ген устойчивости по отдельности защищает от любого клона с комплементарным геном авирулентности.

Исходя из этого, в сочетании с закономерностями генетики самонесовместимости ржи, в расщеплениях по устойчивости возможны различные отклонения от простых моногенных формул. Поэтому в работе рассмотрены возможные теоретические расщепления по устойчивости для случаев сцепления генов устойчивости с мутантным локусом несовместимости (табл. 4)

Видно, что при анализе генов, сцепленных с локусами самонесовместимости, такие соотношения как 3 : 1 и 1 : 1 могут возникать не только при моногенном, но и при дигенном наследовании устойчивости. В ряде случаев невозможно сделать вывод о доминировании гена устойчивости, поскольку сочетание одного доминантного и одного рецессивного гена дает такое же расщепление (5 : 3), как и сочетание двух рецессивных генов. Следует иметь в виду, что величина сцепления генов устойчивости с локусом самонесовместимости может быть различной, а это еще более отклоняет расщепление как от менделевского, так и от теоретического.

У гибридов №№ 29 и 6, полученных от скрещивания устойчивого автостерильного растения на автофертильную инбредную линию 5, расщепление по гену, контролирующему устойчивость к клону бурой ржавчины № 7 - 1 : 1 (табл. 2). Исходя из того, что линия 5 несет мутацию автофертильности S^f в 1R хромосоме ржи (Войлоков и др., 1994), можно предположить, что преобладание генотипа автофертильной линии связано со сцеплением рецессивной аллели гена устойчивости с мутацией автофертильности.

Подтверждением сцепления генов устойчивости с мутациями автофертильности, явилось выявление их сцепления с изозимными маркерами локусов несовместимости. Выдвинутое на основе полученных расщеплений предположение о сцеплении генов R7, R25 и RD1 с S^f локусом подтверждается анализом совместного наследования генов устойчивости к клону 7 и Prx7 - изозимного маркера локуса несовместимости S. Это относится и к предполагаемому сцеплению генов устойчивости к клонам 25 и D1 с S локусом у гибрида № 14 (табл.2).

Возможные расщепления по устойчивости к бурой ржавчине ржи в инбредных семьях F_2 с учетом влияния мутаций автофертильности

Тип скрещивания	Гены устойчивости родителя	Сцепление с локусом самонесовместимости	Теоретически ожидаемое расщепление в F_2 У : В	
			При полном сцеплении	При неполном сцеплении
Автостерильное растение × Автофертильная линия	R_1 (или r_1)	$R_1(r_1)S_1^n$	1 : 1	1 + p : 1 - p
	R_1R_2	$R_1S_1^n$	7 : 1	7 + p : 1 - p
	R_1r_2	$R_1S_1^n$	5 : 3	5 - 3p : 3 + 3p
	r_1r_2	$r_1S_1^f$	5 : 3	5 - 3p : 3 + 3p
	r_1R_2	$r_1S_1^f$	7 : 1	7 - p : 1 + p
Автофертильная линия × автофертильная линия (мутации автофертильности в разных локусах)	R_1	$R_1S_1^f$	5 : 1	5 - p : 1 + p
	R_1	$R_1S_1^n$	2 : 1	2 + p : 1 - p
	R_1R_2	$R_1S_1^f, R_2S_2^n$	11 : 1	11 + p ₂ : 1 - p ₂
	R_1R_2	$R_1S_1^n, R_2S_2^f$	11 : 1	11 + p ₁ : 1 - p ₁
	R_1r_2	$R_1S_1^f, r_2S_2^f$	11 : 1	11 - 2p ₁ : 1 + 2p ₁ * 11 - p ₂ : 1 + p ₂ 11 - 2p ₁ p ₂ : 1 + 2p ₁ p ₂
	r_1r_2	$r_1S_1^n, r_2S_2^f$	5 : 7	5 + 2p ₁ : 7 - 2p ₁ * 5 - p ₂ : 7 + p ₂ 5 : 7
	r_1R_2	$r_1S_1^n, R_2S_2^n$	3 : 1	3 : 1* 3 + p ₂ : 1 - p ₂ 3 + 2p ₁ p ₂ : 1 - 2p ₁ p ₂
	R_1R_2	$R_1S_1^{f**}$	23 : 1	23 - p ₁ : 1 + p ₁
	R_1R_2	$R_1S_1^n$	11 : 1	11 + p ₁ : 1 - p ₁
	R_1r_2	$R_1S_1^f$	21 : 3	21 - 3p ₁ : 3 + 3p ₁
	R_1r_2	$R_1S_1^n$	3 : 1	3 + p ₁ : 1 - p ₁
	r_1R_2	$r_1S_1^n$	19 : 5	19 + p ₁ : 5 - p ₁
	r_1R_2	$r_1S_1^f$	5 : 1	5 - p ₁ : 1 + p ₁
	r_1r_2	$r_1S_1^n$	9 : 15	9 + 3p ₁ : 15 - 3p ₁
	r_1r_2	$r_1S_1^f$	1 : 1	2 - p ₁ : 2 + p ₁

Примечание. R - доминантная устойчивость, r - рецессивная устойчивость, S_1 и S_2 - разные локусы самонесовместимости; p₁ - величина сцепления с мутацией автофертильности первого гена устойчивости, p₂ - второго; S_1^n - активный аллель локуса самонесовместимости, S_1^f - мутантный аллель локуса самонесовместимости. *Первая строка - при p₂ = 0, вторая - при p₁ = 0, третья - при p₁ и p₂ ≠ 0. **Здесь и ниже R₂ и S₂ наследуются независимо.

Проведенное изучение отклонений от менделевских расщеплений необходимо не только для правильной интерпретации получаемых данных по генетике устойчивости, но и для адекватного расчета величины сцепления изучаемых генов устойчивости с маркерными генами, их локализации и картирования. Дальнейшее изучение немоногенных расщеплений по устойчивости требует подбора клонов гриба, несущих по одному гену (а)вирулентности, что является предметом будущих исследований.

Глава 4. ЛОКАЛИЗАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ НА ХРОМОСОМАХ РЖИ

Для анализа совместного наследования генов устойчивости, морфологических и изозимных маркеров использовали те гибридные комбинации, которые давали моногенное расщепление по анализируемым признакам

4.1. Анализ расщеплений гибридов F_2 по аллельным вариантам изозимов и морфологическим маркерам

Расщепления по изоферментным и морфологическим маркерам в инбредных семьях межлинейных гибридов F_2 , представлены в таблице 5.

В связи с возможными вышеописанными отклонениями от стандартного расщепления $1 : 2 : 1$ по маркерным генам из-за явления селективного оплодотворения для каждого гибрида и для объединенных данных рассчитывалось значение χ^2 для проверки соответствия моногибридному расщеплению. Для маркеров с кодоминантным появлением в таблице представлен χ^2_{121} , разложенный на компоненты χ^2_1 и χ^2_2 (табл. 5). Компонентом разложения χ^2_1 проверяется равенство частоты гетерозиготного класса 0,5. Компонентом χ^2_2 оценивается равенство частот гомозиготных классов.

Отклонения от моногибридного соотношения $3 : 1$ также оценивали методом χ^2 с точки зрения возможного сцепления этих локусов с мутациями автофертильности в S, Z и T локусах.

Проведенный анализ показал у гибридов №№ 46, 53p10p3, 59 соответствие расщепления по анализируемым маркерам соотношениям $3 : 1$ для маркеров с доминантно – рецессивным проявлением и $1 : 2 : 1$ для маркеров с кодоминантным проявлением. Отклонения в расщеплении, возможно связанные с гаметической селекцией наблюдали у гибрида 61 по морфологическому маркеру w (табл. 5).

Полученные в ходе анализа расщепления по изоферментным и морфологическим маркерам в инбредных семьях F_2 гибридов между автостерильными растениями и автофертильными линиями представлены в таблице 6.

Таблица 5

Расщепления по изоферментным и морфологическим маркерам
в инбредных семьях F₂ гибридов между автофертильными линиями

Гибрид	Локус	Число растений F ₂ с генотипом (фенотипом)			χ^2 1:2:1	χ^2 (1)	χ^2 (2)	χ^2 3:1 v=1 (2:1)	χ^2 5:1 v=1
		A1A1*	A1A2	A2A2	v=2	v=1	v=1		
		A-		aa					
536/92 (T ⁴) × 8/96									
46	Pgi2	19	46	11	5,05	3,37	1,68		
	Est7/8	61		18				0,21	
	Est2	52		25				2,29	
	w	57		22				0,34	
л.6 (S ¹) × 450/92 (T ⁴)									
53p10p3 (объединенные данные)	Sod2	18	40	26	1,71	0,19	1,52		
	Aat2	18	41	22	0,41	0,01	0,40		
	Aat3	21	29	13	3,35	0,78	2,57		
	Est10	16	48	17	2,80	2,78	0,02		
	β-Glu	14		70				3,11	
	Est2	55		22				0,52	
510/92(Z ¹) × 445/92(Z ⁶ ?)									
61	w	71		36				4,26** (0,00)	22,2 **
450/92(T ⁴) × 532/92(T ⁴)									
59	D	48		13				0,44	

*A1 – аллель гена, свойственная первому родителю, A2 – аллель гена, свойственная второму родителю; **значение $\chi^2 >$ критического значения 3,84 при $v = 1$.

Ожидаемые резкие отклонения от соотношения 1 : 2 : 1 по маркеру Prx7, связанные с тесным сцеплением последнего с S локусом (0-2 cM) (Wricke, Wehling, 1985), наблюдали у гибридов №№ 14, 6, 29 (табл. 6), полученных от скрещивания устойчивых автостерильных растений на автофертильную линию 5, несущую мутацию автофертильности в S локусе.

4.2. Анализ совместного наследования изоферментных локусов, морфологических маркеров и генов, контролирующих устойчивость к клонам возбудителя бурой ржавчины

Анализ показал как независимое, так и сцепленное наследование генов устойчивости к разным клонам гриба.

Три гена, детерминирующих доминантную устойчивость - R21, R23 и RD2, а также гены, детерминирующие рецессивную устойчивость – r61, r7, r81, r152, r137, r23 и rD2 наследовались независимо от других генов, взятых в

анализ. Например, у гибрида 53p10p3 при анализе совместного наследования генов R21 и t61 не выявлено их сцепление с маркерами из 2R, 3R, 5R и 6R хромосом ржи. Гены устойчивости и морфологические маркеры, использованные в работе, наследуются также независимо.

Таблица 6
Расщепления по изоферментным и морфологическим маркерам в F₂ гибридов между автостерильными растениями и автофертильными линиями

Гибрид	Локус	Число растений F ₂ с генотипом (фенотипом)			χ^2 1:2:1 $\nu=2$	χ^2 (1) $\nu=1$	χ^2 (2) $\nu=1$	χ^2 3:1 $\nu=1$
		A1A1*	A1A2	A2A2				
		A-		aa				
14/2 × л.5 (S ¹)								
14	Prx7	35	34	2	30,8***	0,13	30,7**	
	Est6/9	49		23				1,85
7/1 × л.5 (S ¹)								
6	Est4	30	41	17	4,25	0,41	3,84	
	Prx7	50	46	0	52,3***	0,17	52,1**	
	Est6/9	29		73				0,64
	Est10	69		25				0,13
35 × л.5 (S ¹)								
29	Prx7	50	42	2	50,1***	1,06	49,0**	
	Est6/9	64		31				2,95

*A1 – аллель гена, свойственная автофертильной линии 5, A2 – аллель гена, свойственная автостерильному растению; **значение $\chi^2 >$ критического значения 3,84 при $\nu = 1$; ***значение $\chi^2 >$ критического значения 6,0 при $\nu = 2$.

При анализе совместного наследования генов устойчивости и изоцимических маркеров у гибрида № 14 гены устойчивости локализованы на 1R хромосоме, а у гибридов №№ 29 и 6 – на 1R и 5R хромосомах ржи.

Выявлено сцепленное наследование генов устойчивости, принадлежащих к одной группе сцепления, при этом частота рекомбинации варьировала в зависимости от гибрида и изучаемых генов от 13,46 до 37,77%.

В результате проведенной работы удалось подтвердить существование в хромосоме 1RS участка, несущего гены устойчивости к бурой ржавчине, расположенного на расстоянии около 30 сМ от локуса Prx7. Кроме того, на том же плече выявлен еще один ген (R7), расположенный на расстоянии около 10 сМ от локуса Prx7. Это подтверждает высказанное ранее предположение о кластеризации генов устойчивости к клонам ржавчины в геноме ржи (Солодухина, 2003).

При анализе гибридов № 6 и № 29 выявлено сцепление генов устойчивости с локусами эстеразы, локализованными в хромосоме 5R, а именно с Est6/9 и Est4 у гибрида № 6 и с Est6/9 - у гибрида № 29

У гибрида № 29 с локусом Est6/9 сцеплен ген R152, у гибрида № 6 с локусом Est6/9 сцеплен ген R137, а с локусом Est4 – ген устойчивости R61. Таким образом, гены устойчивости к бурой ржавчине (R152, R137, rD1 и R61) впервые локализованы на 5R хромосоме ржи.

4.3. Построение карт участков 1R и 5R хромосом ржи

Получены данные по величине сцепления генов устойчивости с другими, вовлеченными в анализ локусами (табл. 7), что позволяет построить карты изученных участков 1R и 5R хромосом для ряда проанализированных гибридов.

Гибрид № 14

У гибрида № 14, полученного от скрещивания устойчивого автостерильного растения образца ржи "Иммунная 4" и автофертильной линии 5, несущей мутацию автофертильности в S^f локусе, найдено сцепление генов доминантной устойчивости RD1 и R25 друг с другом, а также с мутацией автофертильности S^f и с изозимным маркером Prx7. Локусы S и Prx7, локализованы в прицентромерной районе на коротком плече 1R хромосомы (Voilokov et al, 1994; Senft, Wricke, 1996). Можно заключить, что гены устойчивости RD1 и R25 локализованы на 1R хромосоме ржи и предположить следующий возможный порядок генов: RD1 – Prx7 – S^f – R25.

Гибрид № 29

У гибрида № 29, полученного от скрещивания автостерильного, устойчивого растения образца "Элбон" и автофертильной линии 5, несущей мутацию автофертильности в S локусе, также найдено сцепление пяти генов, детерминирующих доминантную устойчивость к клонам ржавчины - R7, R12, R81, R108 и R25 с изозимным маркером Prx7. Кроме того, выявлено сцепление R7 с S^f мутацией, что подтверждается тесным сцеплением данного гена с Prx7 - изозимным маркером S локуса. Значение частоты рекомбинации между S^f локусом и Prx7, найденное для этой гибридной комбинации соответствует литературным данным. Исходя из полученных частот рекомбинации можно составить карту участка короткого плеча первой хромосомы ржи (рис.3).

	32,4 ± 5				
		28 ± 5			
			15 ± 3,6		
			11,5 ± 3	3,7 ± 2,7	
1RS	R12	R81	R7	Prx7	S
	13,5 ± 3	22 ± 4			
	28 ± 5				

Рис. 3. Карта участка хромосомы 1RS (гибрид № 29)

Таблица 7

Локализация генов устойчивости к клонам *Puccinia dispersa*
на хромосомах ржи

Гибрид	Хромосома	Гены	Частота рекомбинации
29 (35 × л.5)	1R	Prx7 - S ^f	3,7 ± 2,7%
		R7 - S ^f	15,0 ± 3,6%
		Prx7 - R7	11,50 ± 3,4
		Prx7 - R12	32,4 ± 5%
		Prx7 - R81	28,13 ± 5%
		Prx7 - R108	29,39 ± 5%
		Prx7 - R25	32,09 ± 5%
		R12 - R81	13,46 ± 3%
		R81 - R108	26,25 ± 5%
		R81 - R25	28,88 ± 5%
29 (35 × л.5)	1R	R12 - R7	28,20 ± 5%
		R81 - R7	22,14 ± 4%
		R108 - R7	24,92 ± 5%
		R25 - R7	26,85 ± 5%
	5R	Est6/9 - R152	28,63 ± 9%
6 (7/1 × л.5)	1R	Prx7 - S ^f	0%
		R7 - S ^f	8,7 ± 2,6%
		Prx7 - R7	29,4 ± 5%
	5R	Est6/9 - R137	33,71 ± 6%
		Est6/9 - Est4	36,12 ± 6%
		R61 - Est4	33,03 ± 5,9%
		R137 - R61	24,47 ± 4%
14 (14/2 × л.5)	1R	R137 - rD1	30,04 ± 8,8%
		R61 - rD1	18,3 ± 9,4%
		Prx7 - S ^f	5,4 ± 2,6%
		RD1 - S ^f	22,0 ± 4,7%
		Prx7 - RD1	30,5 ± 6,3%
		R25 - S ^f	4 ± 2%
		Prx7 - R25	35 ± 7%

Как видно из таблицы 7 почти все гены устойчивости у гибрида № 29 сцеплены между собой. Сцепление отсутствует только у гена R12 с генами R108 и R25. Можно предположить, что гены R108 и R25 вероятнее всего локализованы на длинном плече хромосомы 1R.

Маркеры Prx7 и S локализованы в прицентромержной области хромосомы 1R (Voilokov et al., 1994; Senft, Wricke, 1996; Borner, Korzun, 1997; Voilokov et

al, 1997) По сравнению с дистальными участками хромосомы в прицентромерной области отмечается пониженная частота рекомбинации, приводящая к своеобразной кластеризации генов. Пониженной частотой рекомбинации в прицентромерной зоне можно объяснить то, что расстояние между генами R108 и R25 ($20,5 \pm 4$ сМ) гораздо больше, чем между ними и генами R12, R81, R7 и Prx7 (табл. 7).

На 5R хромосоме ржи у гибрида № 29 найдено сцепление гена, детерминирующего доминантную устойчивость к клону 152 (R152) и изозимного маркера длинного плеча пятой хромосомы Est6/9. Так как в данном случае ген R152 не сцеплен с другими маркерами из 5R хромосомы, то нельзя определить его положение относительно Est 6/9.

Гибрид № 6

Гибрид получен от скрещивания автостерильного источника устойчивости Новозыбковская 4 на автофертильную линию 5 (S^f). У гибрида найдено сцепление генов устойчивости с маркерами как из 1R, так и из 5R хромосом ржи.

На 1R хромосоме локализован ген, детерминирующий доминантную устойчивость к клону 7 – R7 на основании выявленного сцепления данного гена с мутантным локусом S и изозимным маркером Prx7. Найденное абсолютное сцепление S^f локуса и Prx7 ($r = 0\%$) полностью совпадает с ранее полученными данными (Gertz, Wricke, 1989).

У гибрида № 6 найдено сцепление генов, детерминирующих доминантную устойчивость к клонам 137 и 61 (R137 и R61) с изозимными маркерами Est6/9 и Est4, друг с другом и с геном, детерминирующим рецессивную устойчивость – rD1 (табл. 7). Поскольку изозимные маркеры Est6/9 и Est4, согласно литературным данным, локализованы на длинном плече хромосомы 5R (RS → RL): Est4 – Est6/9 (Wehling, 1986; Priyatkina et al., 1994), то все три гена устойчивости (R137, R61 и rD1), соответственно, были локализованы в хромосоме 5R.

Исходя из частот рекомбинации, можно представить следующий возможный порядок генов (рис. 4).

5RL	Est6/9	R137	R61	Est4
		25,43 ± 4,8		
	33,71 ± 6		33,03 ± 5,9	
	36,12 ± 6			

Рис. 4 Карта участка хромосомы 5RL (гибрид № 6).

Надо отметить, что в данном случае, так как отсутствует аддитивность, возможно, имеет место сильная отрицательная интерференция.

Величина частоты рекомбинации между генами Est6/9 и Est4, полученная в настоящей работе ($36,12 \pm 6\%$), близка к ранее полученному значению ($22,9\%$) для этой пары генов (Priyatkina et al., 1994).

Можно заключить, что порядок генов Prx7 и S на коротком плече первой хромосомы по обобщенным данным анализа гибридов №№ 14, 29 и 6 таков (1RS → 1RL): Prx7 - S, что соответствует ранее полученным данным (Егорова и др., 2000). Расстояние между Prx7 и S с учетом величины ошибки, соответствует для всех трех гибридов №№ 14, 29 и 6 литературным данным (Gertz, Wricke, 1989; Wricke, 1991).

У гибридов №№ 29 и 6 ген R7, детерминирующий доминантную устойчивость к клону 7, локализован на коротком плече первой хромосомы. В обоих случаях можно предположить следующий порядок генов (1RS → 1RL): R7 - Prx7 - S. Частота рекомбинации между геном R7 и S локусом колеблется от $8,7 \pm 2,6\%$ (у гибрида №6) до $15,0 \pm 3,6\%$ (у гибрида №29), однако эти данные вполне сопоставимы. Расстояние же между генами Prx7 и R7 у этих гибридов составляют от $11,5 \pm 3,4$ сМ до $29,4 \pm 5,4$ сМ в зависимости от гибридной комбинации. Из этого можно заключить, что в обоих гибридах устойчивость к клону 7 детерминирует это один и тот же доминантный ген.

У гибридов №№ 14 и 29 ген, детерминирующий доминантную устойчивость к клону 25 – R25 локализован на 1R хромосоме ржи и сцеплен с изоцимным маркером Prx7 с частотой рекомбинации - $35,0 \pm 7\%$ и $32,09 \pm 5\%$, соответственно. С другой стороны, величина рекомбинации между S¹ локусом и R25 варьирует, в зависимости от гибридной комбинации, от сцепленного до независимого наследования.

Однако полученные сопоставимые величины рекомбинации между Prx7 и R25, свидетельствуют, что это один и тот же ген, локализованный на длинном плече хромосомы 1R. Можно представить следующий вероятный порядок генов (1RS → 1RL): Prx7 – S – – – R25.

Выводы

1. У автофертильных линий ржи выявлено 27 генов устойчивости к отдельным клонам возбудителя бурой ржавчины.
2. Показано, что лабораторный отбор растений, устойчивых к наиболее вирулентным клонам возбудителя бурой ржавчины позволяет повысить устойчивость сорта в поле.
3. Установлен монофакторный, двухфакторный и трехфакторный доминантный и рецессивный контроль расоспецифической устойчивости к бурой ржавчине. Выявлены не встречающиеся при обычном анализе устойчивости к ржавчине соотношения в расщеплениях по устойчивости у гибридов F₂ связанные с влиянием мутаций автофертильности.
4. Впервые составлены теоретически ожидаемые расщепления по устойчивости с учетом частоты рекомбинации между локусом несовместимости и геном (генами) устойчивости для случаев как монофакторного, так и двухфакторного контроля устойчивости к клону ржавчины.
5. Шесть генов устойчивости к клонам возбудителя бурой ржавчины локализованы на 1R хромосоме ржи.

6. Впервые на 5R хромосоме ржи, на основании сцепления с изозимными маркерами пятой хромосомы – Est6/9 и Est4, локализованы четыре гена устойчивости.
7. Определено, что пять генов, детерминирующих доминантную устойчивость образца Элбон, сцеплены друг с другом и с изозимным маркером 1R хромосомы - Prg7.
8. Составлены карты участков 1R и 5R хромосом с участием изозимных маркеров, мутаций автофертильности и генов устойчивости к клонам возбудителя бурой ржавчины.

Практические рекомендации

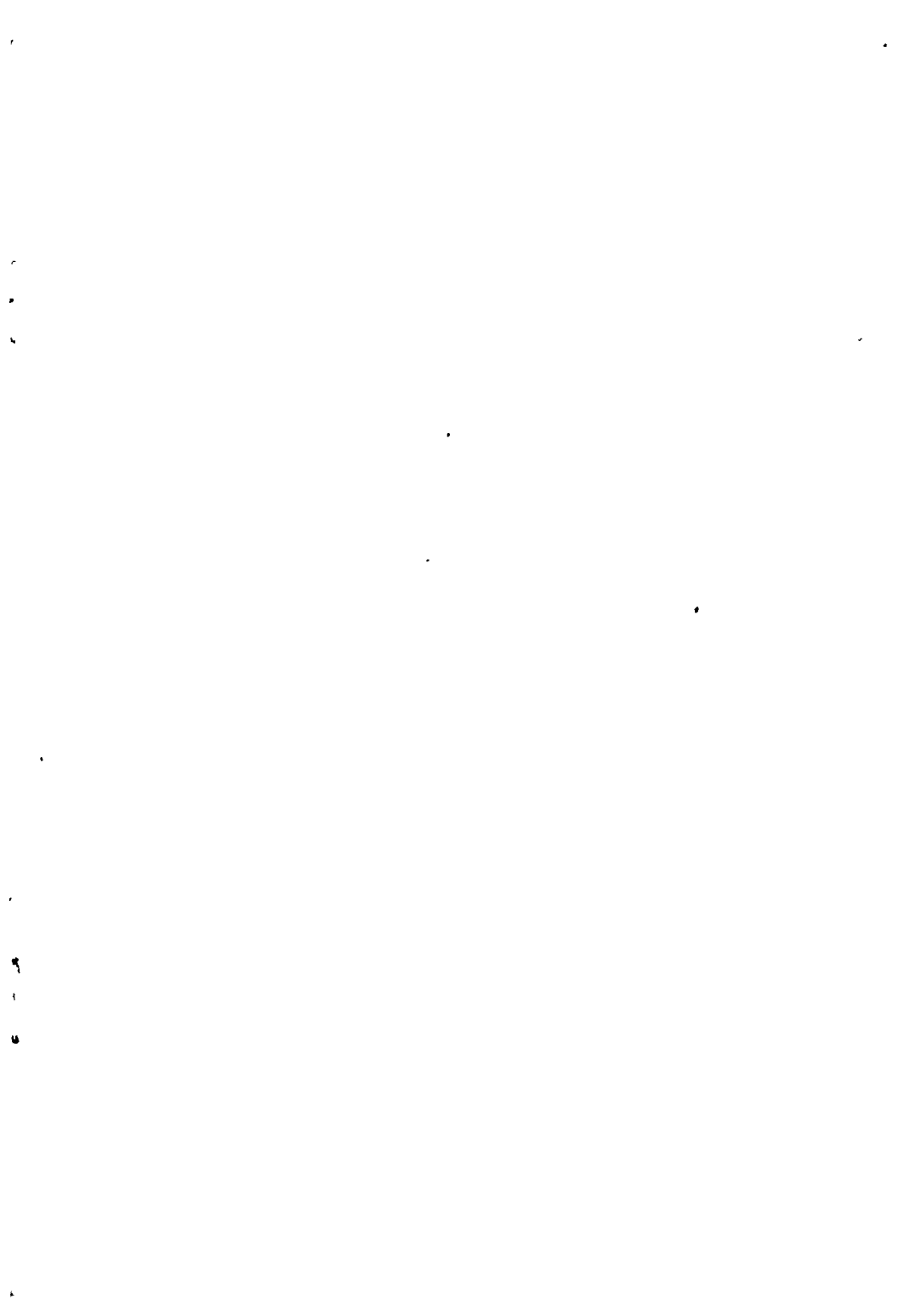
1. Рекомендуется использовать кластер генов устойчивости, картированных на 1R хромосоме образца Элбон, для селекции на устойчивость к бурой ржавчине обычных и гибридных сортов ржи, а также тритикале. Для контроля наличия этого комплекса у производных образца Элбон в качестве маркера устойчивости предлагается использовать изозимный маркер P_{гх}7.

2. Отбор наиболее устойчивых растений в лабораторных условиях рекомендуется как быстрый способ повышения устойчивости уже существующих сортов ржи.

3. Рассчитанные с учетом влияния мутаций автофертильности теоретические расщепления для случаев однолокусного и многолокусного контроля устойчивости следует учитывать при изучении генетики болезнеустойчивости ржи для правильной интерпретации полученных результатов и как первичный показатель для локализации выявленных генов устойчивости.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Дмитриев А П., Баранова О.А. Пути селекции ржи на устойчивость к бурой ржавчине в связи с биологией взаимоотношений хозяина и паразита // Научные проблемы создания новых сортов с.-х. культур, адаптированных к современным условиям производства и переработки. СПб., 1998. С. 67-70.
2. Войлоков А В., Гагкаева Т.Ю., Дмитриев А.П., Баранова О.А. Устойчивость автофертильных линий озимой ржи к бурой ржавчине и фузариозу колоса // Бюлл. ВИЗР СПб., 1998 № 78-79. С. 59 – 63.
3. Baranova O.A., Dmitriev A.P., Voylokov A.V., Solodukhina O.V. Mapping of resistance genes to brown rust in 5R chromosome of rye (*Secale cereale* L.) // Sustainable Systems of Cereal Crop Protection against Fungal Diseases as the Way of Reduction of Toxin Occurrence in Food Webs. Book of Abstracts. Agricultural Research Institute Kromeriz, Ltd. 2001. P. 33
4. Дмитриев А П., Баранова О.А. Повышение устойчивости ржи к бурой ржавчине // Доклады РАСХН. 2001. №5. С 22-24.
5. Баранова О.А., Дмитриев А.П., Войлоков А В., Солодухина О.В. Влияние мутаций автофертильности на расщепление гибридов ржи по устойчивости к бурой ржавчине // Первая Всероссийская Конф по иммунитету растений к болезням и вредителям. СПб. - Пушкин, 2002. С 66 – 67.
6. Baranova O.A., Dmitriev A.P., Voylocov A.V., Solodukhina O.V. Problems of rye resistance to brown rust // Modern Problems of Cereal Resistance to Diseases. 2002. P. 257 – 258.
7. Baranova O.A., Dmitriev A.P., Solodukhina O.V., Voylocov A.V. Mapping of resistance genes to brown rust in 1R chromosome of rye (*Secale cereale* L.) // Disease Resistance in Plant Pathology. Prague, 2002. P. 101.
8. Baranova O.A., Dmitriev A.P., Solodukhina O.V., Voylocov A.V. Mapping of resistance genes to brown rust in 1R chromosome of rye (*Secale cereale* L.) // Proc 6th Conf. EfPP. Prague. Plant Protection Science. V. 38 (Special Issue 2). 2002. P. 588-589.



Ба.

РНБ Русский фонд

2006-4
20995

13 ИЮН 2004