

УДК 633.16:632.4.

Г.В. Вильданова, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;
В.И. Блохин, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник
зав. лабораторией селекции ячменя;
И.С. Ганиева, научный сотрудник;
М.М. Ланочкина, научный сотрудник;
*ФГБНУ «Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства»
(420059, г. Казань, ул. Оренбургский тракт, 48,
gulya_vildanova@mail.ru)*

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СЕЛЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ЯЧМЕНЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КАМЕННОЙ ГОЛОВНЕ

В последнее время наряду с традиционными методами в селекционной работе применяют и инновационные приемы, в частности, маркер-вспомогательную селекцию (MAS - marker-assisted selection), которая способствует более ускоренному получению новых сортов с нужными качественными характеристиками. MAS включает в себя проведение ПЦР и анализа полученных результатов на предмет наличия аллелей генов интересующей селекционеров направленности, или ДНК-генотипирования. В данной статье приведены результаты ДНК-генотипирования сортообразцов селекции ТатНИИСХ четырьмя маркерами устойчивости к каменной головне (aHor2, UhR450, OPO6₇₈₀ и OPJ10₄₅₀). Объектами исследований служили гибридные популяции F₃-F₅. В процессе исследований проводилась ПЦР с использованием ДНК отобранных сортообразцов. Анализ результатов показал, что в геноме одного сортообразца могут присутствовать несколько аллелей генов устойчивости к каменной головне. При диагностировании образцов ПЦР-методом на наличие локуса aHor2 было выявлено, что менее половины из них были гомозиготны по восприимчивости к каменной головне. Таким образом, в результате анализа были определены хозяйственно-ценные генотипы для дальнейшего использования их в селекционной работе. Проведенные полевые исследования подтвердили полученные данные по генотипированию на устойчивость к каменной головне.

***Ключевые слова:** яровой ячмень, ДНК-генотипирование, ПЦР, праймер, маркер, аллель, ген, селекция, устойчивость, каменная головня.*

G.V. Vildanova, Candidate of Biological Sciences, senior researcher;
V.I. Blokhin, Candidate of Agricultural Sciences, leading researcher, head of the
laboratory of barley breeding;
I.S. Ganieva, researcher;
M.M. Lanochkina, researcher,

MOLECULAR GENETIC ASSESSMENT OF BARLEY SELECTION MATERIAL ON ENDURANCE OF COVERED SMUT (*USTILAGO HORDEI*)

Lately some innovative selection methods like a marker-assisted selection (MAS) are used together with traditional ones that enable to develop new varieties with qualitative traits faster. MAS include conducting of PCR and analysis of received data to determine the presence of genes alleles with definite traits or DNA-genotyping. The article gives the results of DNA-genotyping of variety samples of TatRIA selected with four markers of resistance to covered smut (aHor2, UhR450, OPO6₇₈₀ and OPJ10₄₅₀). The hybrids F₃-F₅ were the subjects of study, which were examined by PCR with the use of DNA of selected variety samples. The analysis showed that a genome of one variety sample could possess several gene alleles of resistance to covered smut. The testing of the sample with PCR-method on locus aHor2 presence showed that less than a half of them turned to be homozygous in susceptibility to covered smut. Thus the analysis helped us to determine economic valuable genotypes for their further use in breeding. Conducted field trials confirmed the received data on genotyping on resistance to covered smut.

Keywords: *spring barley, DNA-genotyping, PCR, primer, marker, allele, gene, selection, resistance, covered smut.*

Введение. Современная селекция имеет целью решение проблем устойчивости к болезням, вредителям, абиотическим стрессам, а также улучшения качества урожая [1,2]. Общеизвестно, что достижения селекции основаны на эффективном отборе нужных генотипов. Основные достижения в селекции основываются на отборе по совокупности морфологических и физиологических признаков. Анализ опубликованных данных показывает, что традиционные методы селекции позволяют выделять только незначительную часть ценных генотипов из гибридных популяций [2,7].

В последние годы большое внимание стали уделять применению новейших методов для получения принципиально новых генотипов сельскохозяйственных растений. Одним из таких методов является маркер-вспомогательная селекция или marker-assisted selection (MAS). Этот метод позволяет в короткие сроки определить наличие экономически значимых генов в геноме исследуемых растений с тем, чтобы использовать эти растения в дальнейшей работе. Он основан на отборе по признакам, контролируемым кластером генов или отдельными генами, которые можно определить с помощью

молекулярно-генетического анализа с использованием молекулярных маркеров [3,4].

Целью наших исследований являлась идентификация сортообразцов, несущих аллели генов устойчивости к каменной головне методом ДНК-генотипирования с применением разработанных маркеров.

Материалы и методы. Объектами исследования служили гибридные популяции F₃-F₅, отобранные в селекционном питомнике ТатНИИСХ. Всего были протестированы 83 образца. Геномную ДНК выделяли из 7-дневных проростков ячменя с применением набора для выделения «ДНК-Сорб-С». С целью определения наиболее воспроизводимых и информативных праймеров для проведения амплификации были проработаны публикации отечественных и зарубежных авторов, в результате чего были отобраны четыре пары праймеров. Последовательности этих праймеров приведены в таблице 1. Амплификацию специфического локуса ядерной ДНК, маркирующего ген *Ruh*, контролирующего устойчивость ячменя к каменной головне, проводили с помощью SCAR-прайма UhR450, STS-прайма aHor2 и двух RAPD-праймеров OPO6₇₈₀ и OPJ10₄₅₀, разработанных T.S. Grewal и G.S. Ardiel с сотрудниками [1,2,5,6].

1. Маркеры, сцепленные с геном устойчивости к каменной головне ячменя

Ген	Маркер (тип)	Праймеры для ПЦР-анализа	ПЦР продукт (п.н.)
<i>Ruh</i>	UhR 450 (SCAR)	ULR1-F: 5'-GATAAGGATGTTCCGCC-3' (17 н.) ULR-R: 5'-CCCGAGGTCCAAAATCAG-3' (18 н.)	442
	aHor2 (STS)	KV1: 5'-CCACCATGAAGACCTTCCTC-3' (20 н.) KV9: 5'-TCGCAGGATCCTGTACAACG-3' (20 н.)	1100/800
	OPO6 ₇₈₀ (RAPD)	OPO6: 5'-CCACGGGAAG-3' (10 н.)	780
	OPJ10 ₄₅₀ (RAPD)	OPJ10: 5'-AAGCCCGAGG-3' (10 н.)	450

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле в буфере TBE (pH 8,0), содержащем этидий бромид, с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансиллюминаторе BioRad ($\lambda=310$ нм).

Данные, полученные в результате ДНК-диагностики гибридных популяций SCAR-, STS- и RAPD-маркерами, сравнивали между собой. Эти же маркеры использовали для генотипирования образцов из коллекции ТатНИИСХ, которые использовали в качестве исходного материала для проведения селекционной работы. В качестве положительных контрольных образцов использованы растения-доноры устойчивости (сорта ячменя с заявленными генами устойчивости к каменной головне Раушан и Беатрис).

Результаты. В полевых условиях довольно сложно определить степень устойчивости ярового ячменя к головневым болезням. Как правило, массового развития головневых болезней на больших площадях и сильного поражения растений ячменя, представляющих угрозу посевам и урожаю, не наблюдалось. Между тем, проведение ДНК-генотипирования позволяет определять генотипы, которые имеют в своем геноме ген устойчивости и которые могли бы служить в дальнейшем источником для проведения селекционной работы.

Исследования заключались в проведении ПЦР с использованием ДНК сортообразцов гибридных популяций F_3 - F_5 , отобранных на опытном участке ТатНИИСХ. На рисунках 1 и 2 представлены электрофореграммы ПЦР-идентификации локуса UhR450 и aHor2.

Сравнительный анализ результатов амплификации ДНК показал, что, по меньшей мере, один из примененных маркеров гена устойчивости к каменной головне присутствует в 97% исследуемых образцов. В 3% случаев был зафиксирован отрицательный результат при тестировании на наличие локусов, связанных с геном устойчивости к этой болезни. Эти образцы было рекомендовано не использовать в дальнейшей селекционной работе по признаку устойчивости к данному виду заболевания ячменя.

В процессе исследований было установлено, что в геноме одного сортообразца могут присутствовать от одного до четырех используемых в исследованиях аллелей, определяемых используемыми маркерами. График на рисунке 3 демонстрирует, что более половины сортообразцов ячменя после проведения амплификации показали наличие локусов, связанных с маркерами OPJ10, UhR450 и OPO6.

Менее половины испытанных образцов (40%) имеют маркер aHor2 в своем геноме. Нужно отметить, что этот маркер отличается тем, что он тесно связан с гордеин-образующим свойством в зерне ячменя и устойчивостью к каменной головне. Маркер aHor2 является кодоминантным STS-маркером, кодирующим В-гордеины (запасные белки ячменя). Он располагается на коротком плече хромосомы 5 (1H). В результате ПЦР-диагностирования было обнаружено, что 21,7% сортообразцов гомозиготны по локусу, связанному с маркером гена устойчивости aHor2. Гетерозиготность по данному маркеру наблюдалась у 15 образцов, что составило 18,1% от общего количества тестируемых гибридов. Гомозиготные генотипы по восприимчивости к каменной головне составляли основную часть исследуемых образцов – 60,2% (рис. 4).

Следует иметь в виду, что ген устойчивости к головневым болезням является доминантным, следовательно, как гомозиготные, так и гетерозиготные по гену устойчивости сортообразцы могут быть рекомендованы для дальнейшего использования в

селекции ячменя на устойчивость к болезням. Из вышеизложенного следует, что только 39,8% образцов могут быть взяты для работы в качестве дальнейшего селекционного материала по этому признаку.

Проверка в полевых условиях выделенных сортообразцов по результатам ДНК-генотипирования маркерами устойчивости к каменной головне (aHor2, UhR450, ORO6₇₈₀ и ORJ10₄₅₀) показала полевую устойчивость к этой болезни, оценку проводили на естественном фоне. Были выделены сортообразцы с высоким уровнем устойчивости (поражено не более 3% растений), по данным вегетационного периода, наибольшим уровнем устойчивости характеризуются сортообразцы К-177-11, К-183-11 и 90-99, на которых не было отмечено симптомов болезни. Результаты наблюдений представлены в таблице 2.

2. Степень распространенности каменной головни ярового ячменя в полевых условиях

№	Сорт/ сортообразец	Распространенность, %
1	Раушан (st)	-
2	Беатрис	-
3	Гелиос	-
4	Вакула	-
5	К-177-11	-
6	К-183-11	-
7	К-306-11	0,6
8	К-312-11	0,3
9	К-411-11	0,1
10	К-465-11	0,8
11	4893	0,2
12	54-99	0,2
13	72-99	0,2
14	90-99	-
15	144-99	0,3
16	32-00	0,3
17	204-08	0,2
18	2409-01	0,2

В итоге, из изученных сортообразцов каменной головней были поражены 12, это составило 22% к общему числу изученных номеров. Необходимо отметить, ни один из изученных сортообразцов не превысил экологический порог вредоносности (ЭПВ) по каменной головне (ЭПВ 0,2 – 0,3%), за исключением двух образцов - К-465-11 и К-465-11.

Выводы

Проведенные полевые исследования по оценке сортов и сортообразцов ячменя на предмет устойчивости к каменной головне позволяют сделать вывод о перспективности подобных исследований для селекционной работы.

Полученные данные демонстрируют эффективность использования

молекулярно-генетических исследований с применением отобранных ДНК-маркеров для определения доноров хозяйственно ценных признаков таких, как устойчивость к каменной головне ячменя. Выделенные и используемые в дальнейшей селекционной работе перспективные генотипы, несущие ценные для селекции ячменя в условиях Среднего Поволжья аллели генов устойчивости к головневым болезням и контролирующие содержание белка в зерне, обеспечат повышение результативности и сокращение времени селекционного процесса по созданию ценных сортов и гибридов.

Литература

1. *Ardiel, G.S.* Inheritance of resistance to covered smut in barley and development of a tightly linked SCAR marker / G.S. Ardiel, T.S. Grewal, P. Deberdt, B.G. Rosnagel, G.J. Scoles // *TheorAppl Genet* – 2002. – V. 104 – P. 457–464.
2. *Grewal, T.S.* Mapping of a covered smut resistance gene in barley (*Hordeumvulgare*) / T.S. Grewal, B.G. Rosnagel, G.J. Scoles // *Can. J. Plant Pathol.* – 2004. – V. 26. – P. 156–166.
3. *Леонова И.Н.* Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов / И.Н. Леонова // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2013. – Том 17. – № 2. – С. 314-325.
4. *Ellis, P.R.* Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century / P.R. Ellis, F.P. Forster, D. Robinson, L.L. Handley, D.C. Gordon, J.R. Russel, W. Powell // *J. of Experimental Biology.* – 2000. – V. 51. – №. 342. – P. 9-17.
5. *Grewal, T.S.* Identification of resistance genes to barley covered smut and mapping of the *Ruh1* gene using *Ustilago* strains with defined avirulence genes / T.S. Grewal, B.G. Rosnagel, G. Bakkeren, G.J. Scoles // *Can. J. Plant Pathol.* – 2008. – V. 30 – P. 277-284.
6. *Grewal, T.S.* Validation of molecular markers for covered smut resistance and marker-assisted introgression of loose and covered smut resistance into hulless barley / T. S. Grewal, B.G. Rosnagel, G.J. Scoles // *Mol Breeding.* – 2008. – V. 21 – P.37–48.
7. *Thomas PL, Menzies JG* (1997) Cereal smuts in Manitoba and Saskatchewan, 1989–95. *Can J Plant Pathol* 19:161–165

Literature

1. *Ardiel, G.S.* Inheritance of resistance to covered smut in barley and development of a tightly linked SCAR marker / G.S. Ardiel, T.S. Grewal, P. Deberdt, B.G. Rosnagel, G.J. Scoles // *TheorAppl Genet* – 2002. – V. 104 – P. 457–464.
2. *Grewal, T.S.* Mapping of a covered smut resistance gene in barley (*Hordeumvulgare*) / T.S. Grewal, B.G. Rosnagel, G.J. Scoles // *Can. J. Plant Pathol.* – 2004. – V. 26 – P. 156–166.
3. *Leonova I.N.* Molecular markers: their use for identification, introgression and gene pyramiding in crop breeding / *Vavilov journal of genetics and breeding.* – 2013. – V.17. – № 2. – PP. 314-325.

4. *Ellis, P.R.* Wild barley: a source of genes for crop improvement in the 21st century / P.R. Ellis, F.P. Forster, D. Robinson, L.L. Handley, D.C. Gordon, J.R. Russel, W. Powell // *J. of Experimental Biology* – 2000. – V. 51. – №. 342 – P. 9-17.
5. *Grewal, T.S.* Identification of resistance genes to barley covered smut and mapping of the *Ruh1* gene using *Ustilago hordei* strains with defined avirulence genes / T.S. Grewal, B.G. Rossmann, G. Bakkeren, G.J. Scoles // *Can. J. Plant Pathol.* – 2008. – V. 30 – P. 277–284.
6. *Grewal, T.S.* Validation of molecular markers for covered smut resistance and marker-assisted introgression of loose and covered smut resistance into hulless barley / T. S. Grewal, B.G. Rossmann, G.J. Scoles // *Mol Breeding*. – 2008. – V. 21 – P.37–48.
7. *Thomas PL, Menzies JG* (1997) Cereal smuts in Manitoba and Saskatchewan, 1989–95. *Can J Plant Pathol* 19:161–165