

Ф. А. Давлетов, доктор сельскохозяйственных наук, заместитель директора по научной работе;

К.П. Гайнуллина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник;

И.И. Ахмадуллина, аспирант,

ФГБНУФ «Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства»

(450059, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, д. 19; тел.: 89899531500, email:

karina28021985@yandex.ru;

davletovfa@mail.ru

ilsiyar0905@mail.ru)

КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА НОВОГО СОРТА ГОРОХА ЮЛДАШ И ЕГО РОДИТЕЛЬСКИХ ФОРМ С ПРИМЕНЕНИЕМ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является одной из самых древних и значимых сельскохозяйственных культур в мире. Это основная высокобелковая зернобобовая культура в Республике Башкортостан. Для повышения урожайности гороха существует острая необходимость в создании новых, более устойчивых к болезням и вредителям, высокопродуктивных сортов. В статье приведены результаты исследований нового высокоурожайного сорта гороха Юлдаш и его родительских форм (сортов Усач и Кормовой 5), проведенных в лаборатории селекции и семеноводства зернобобовых культур и лаборатории молекулярно-генетической экспертизы Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства. Созданный сорт Юлдаш отличается засухоустойчивостью, раннеспелостью, обладает устойчивостью к полеганию, имеет неосыпающиеся семена. Был передан на сортоиспытание в 2015 году. Дана оценка изученных образцов по морфобиологическим и хозяйственно-ценным признакам (длина стебля, тип листа, количество бобов и семян с растения, количество семян в бобе, масса 1000 семян, масса семян с растения). Проведен молекулярно-генетический анализ трех микросателлитных локусов AA255, AA200, AB28. Данные SSR-маркеры были использованы для оценки генетического полиморфизма гороха и показали высокую эффективность. Равномерное распределение по всему геному, кодоминантный тип наследования, высокий уровень полиморфизма позволяют использовать их в качестве идеальной системы для создания генетических маркеров. Данные, полученные в результате наших исследований, показали возможность применения микросателлитных

маркеров для анализа происхождения гибридных форм и генетической идентификации исследованных сортообразцов.

Ключевые слова: *горох, селекция, сорт, морфологические признаки, хозяйственно-ценные признаки, микросателлиты, полиморфизм.*

F.A. Davletov, Doctor of Agricultural Sciences, deputy director on Science;
K.P. Gaynullina, Candidate of Biological Sciences, senior research officer of the
laboratory for breeding and seed-growing of grain crops;
I.I. Akhmadullina, post graduate student,
FSBSI “Bashkirsky Research Institute of Agriculture”
(450059, Ufa, R. Zorge Str., 19; tel.: 8(989)9531500, email: karina28021985@yandex.ru
davletovfa@mail.ru, ilsiyar0905@mail.ru)

A COMPLEX ESTIMATION OF THE NEW VARIETY OF PEAS ‘ULDASH’ AND ITS PARENTAL FORMS BY THE MODERN MOLECULAR-GENETIC METHODS

The peas (*Pisum sativum* L.) is one of the most ancient and important plants in the world. It is a main leguminous crop with high content of protein in the Republic of Bashkortostan. It's of urgent importance to develop new, more tolerant to diseases and pests, highly productive varieties to improve productivity of peas. The article gives the study results of the new highly productive variety of peas ‘Uldash’ and its parental forms (the varieties ‘Usach’ and ‘Kormovoy 5’) conducted in the laboratory for breeding and seed-growing of leguminous crops and in the laboratory for molecular-genetic expertise of the Bashkirsky Research Institute of Agriculture. The developed variety ‘Uldash’ is characterized with drought tolerance, early maturity, resistance to lodging and seed fall. The variety was sent to variety testing in 2015. The article presents the estimation of the studied varieties on morpho-biological and economically valuable traits (length of stem, number of beans per plant, number of seeds per bean, 1000-seed weight, seed weight per plant). The molecular-genetic analysis of three microsatellite loci AA255, AA200, AB28 has been conducted. The SSR-markers have been used for estimation of genetic polymorphism of peas and they have shown high efficiency. The uniform distribution along the whole genome, co-dominant inheritance and a high level of polymorphism allow using them as a perfect system for the development of genetic markers. The data, obtained during the study, showed a possibility to apply microsatellite markers for the analysis of hybrid forms and genetic identification of the studied varietal samples.

Keywords: *peas, breeding, variety, morphological traits, economically valuable traits, microsatellites, polymorphism.*

Введение. Горох посевной является ценной высокобелковой культурой, возделываемой во многих странах мира [1, 2]. В России посевные площади гороха, по данным Федеральной службы государственной статистики, составляют около 941,7 тыс. га [3]. Однако получаемые в нашей стране урожаи зерна гороха не удовлетворяют растущие потребности населения [4]. Для повышения урожайности наряду с совершенствованием технологий возделывания необходимо создание новых высокопродуктивных сортов гороха [5, 6]. В настоящее время с развитием молекулярной биологии и генетики открылись возможности исследования исходного материала на уровне полиморфизма ДНК для повышения эффективности классических методов селекции [7, 8].

Цель нашего исследования – комплексное изучение исходных родительских форм Усач, Кормовой 5 и созданной на основе их скрещивания линии 29476.

Задачи:

1. Изучить морфобиологические и хозяйственно-ценные признаки сортов Усач, Кормовой 5, линии 29476;
3. Провести ДНК-типирование исследуемых образцов.

Материалы и методы. Материалом для исследования послужили сорта гороха Усач (материнская форма, безлисточковый), Кормовой 5 (отцовская форма, листочковый) и линия 29476 (Усач × Кормовой 5, безлисточковый).

Полевые опыты проводили в Чишминском селекционном центре по растениеводству, а молекулярно-генетический анализ сортообразцов – в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы ФГБНУ Башкирский НИИСХ.

Линия 29476 была выведена методом многократного индивидуально-семейственного отбора из гибридной популяции Усач × Кормовой 5. Скрещивание сортов Усач и Кормовой 5 проводили в полевых условиях методом ручной кастрации.

Фенологические наблюдения, учеты и измерения проводили по методике ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР, 1985). Отмечали дату всходов, цветения и полной спелости. На основании полученных данных определяли продолжительность вегетационного периода.

Для характеристики и сравнения сортообразцов проводили анализ морфологических и хозяйственно-ценных признаков. Учет урожая семян проводили по методике государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур [9].

Анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортообразцов проводили с помощью метода ПЦР по микросателлитным локусам AA255, AA200 и AB28. Геномную ДНК экстрагировали из навески (50-100 мг молодой слабопигментированной ткани пророщенных растений гороха), измельченной в жидком азоте и ресуспензированной в 200 мкл ТЕ-буфера согласно протоколу коммерческого набора для выделения ДНК «Genomic DNA Purification Kit» («Fermentas»).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе «ДТ-322» фирмы «ДНК-Технология» в общем объеме реакционной смеси 26 мкл, содержащей 2 мкл раствора тотальной геномной ДНК, 10 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix (2x) фирмы «Fermentas», по 2 мкл каждого праймера («Евроген») и 10 мкл стерильной деионизированной воды. Амплификацию проводили по следующей программе: денатурация при 94°C – 1 мин.; 3 цикла: денатурация при 94°C – 30 с., отжиг праймеров при T_m – 20 с, элонгация при 72°C – 5 с.; 33 цикла: денатурация при 94°C – 15 с., отжиг праймеров при T_m – 20 с, элонгация при 72°C – 1 мин.; конечная элонгация при 72°C – 30 мин.

Полученные в результате амплификации фрагменты ДНК в зависимости от размера разделяли методом электрофореза в 3% агарозном геле в горизонтальной камере «SE-1» («Helicon») при напряжении 120 V в течение 3-4 часов или в 6% полиакриламидном геле в вертикальной камере «VE-20» («Helicon») при 300 V в течение 3-3,5 часов.

Для визуализации результатов электрофореза гели, окрашенные в растворе бромистого этидия, помещали в трансиллюминатор «ECX-F15.M». В качестве гель-документирующей системы использовали «Gel Imager» («Helicon»).

Результаты исследований подвергали математической обработке общепринятыми методами по Б.А. Доспехову [10].

Результаты. В наших исследованиях было установлено, что материнский компонент – сорт Усач – характеризуется среднерослым, относительно прочным стеблем с укороченными междоузлиями, высокой массой 1000 семян и их крупностью, быстрым темпом роста в начальные фазы развития, дружным цветением и созреванием. Отцовский компонент – сорт Кормовой 5 – обладает большим количеством бобов и семян с растения (табл. 1).

1. Показатели морфобиологических и хозяйственно-ценных признаков гибрида Усач × Кормовой 5 и родительских форм

Признаки	Гибрид и родительские формы		
	Усач, ♀	Усач × Кормовой 5, F ₁	Кормовой 5, ♂
Длина стебля, см	43,1	50,0	44,8

Количество бобов на растение, шт.	2,3	2,3	2,8
Количество семян с растения, шт.	8,1	9,0	10,2
Количество семян в бобе, шт.	3,5	3,9	3,6
Масса 1000 семян, г	226	273	197
Масса семян с растения, г	1,83	2,46	2,01

Гибрид, полученный в наших опытах от скрещивания сортов Усач × Кормовой 5, обладал несколько большей длиной стебля и превзошел родительские формы по признакам количество семян в бобе, масса 1000 семян, продуктивность (табл. 1).

В 2015 году линия 29476, выделенная из гибридной популяции Усач × Кормовой 5, была передана в Государственное сортоиспытание под названием сорт Юлдаш.

В результате проведения молекулярно-генетического анализа сорта Юлдаш (Л-29476) и его родительских форм – сортов Усач и Кормовой 5 – при использовании трех микросателлитных маркеров были составлены их генетические формулы, в которых размер самого короткого аллеля SSR-локуса указывали в качестве правого нижнего индекса, а номер аллеля – в качестве правого верхнего индекса (табл. 2).

2. Аллельное состояние микросателлитных локусов AA255, AA200 и AB28 у сортов Усач, Кормовой 5 и Юлдаш (Л-29476 Усач × Кормовой 5)

Название образца	Генетическая формула
Усач, ♀	AA255 ² ₂₉₅ AA200 ¹ ₂₀₅ AB28 ³ ₃₇₅
Юлдаш (Л-29476 Усач × Кормовой 5)	AA255 ² ₂₉₅ AA200 ¹ ₂₀₅ AB28 ⁵ ₃₇₅
Кормовой 5, ♂	AA255 ² ₂₉₅ AA200 ³ ₂₀₅ AB28 ⁵ ₃₇₅

Полученные данные подтверждают происхождение гибрида Усач × Кормовой 5 от сортов Усач и Кормовой 5 на уровне ДНК. Так, можно сделать выводы, что новый сорт Юлдаш получил аллель 1 локуса AA200 от материнской формы (Усач), а аллель 5 локуса AB28 – от отцовской формы (Кормовой 5). По локусу AA255 и у гибрида, и у родительских форм проявилась гомозиготность по аллелю 2.

В то же время, если рассматривать генетические формулы сортов Усач, Кормовой 5 и Юлдаш в целом по трем изученным локусам, видно, что они отличаются друг от друга уникальным сочетанием аллелей, что позволяет использовать микросателлитные локусы AA255, AA200 и AB28 для идентификации данных образцов.

Выводы.

В ходе исследований нами была проведена комплексная оценка с применением метода микросателлитного анализа гибрида Усач × Кормовой 5 и его родительских форм – сортов Усач и Кормовой 5. Получены данные по морфобиологическим и хозяйственно-ценным признакам изученных сортообразцов. Показана возможность их идентификации

на основе ДНК-типирования. В 2015 году выделенная из гибридной популяции Усач × Кормовой 5 линия 29476 передана в Госсортоиспытание под названием сорт Юлдаш.

Литература

1. Макашева, Р.Х. Культурная флора СССР. Том 4. Зерновые бобовые культуры. Часть 1. Горох / под ред. О.Н. Коровиной. – Л.: Колос, 1979. – С. 132-133.
2. Давлетов, Ф.А. Селекция неосыпающихся сортов гороха в условиях Южного Урала / Ф.А. Давлетов.– Уфа: Гилем, 2008. – С. 3.
3. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.gsk.ru>.
4. Жуковский, П.М. Культурные растения и их сородичи. Систематика, география, цитогенетика, иммунитет, экология, происхождение, использование. Изд. 3-е, перераб. и доп./ П.М. Жуковский.– Л.: Колос, 1971.– С. 5.
5. Гуляев, Г.В. Селекция и семеноводство полевых культур: учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений. Изд. 3-е, перераб. и доп. / Г.В. Гуляев, Ю.Л. Гужов.– М.: Агропромиздат, 1987. – С. 3.
6. Давлетов, Ф.А. Сравнительное изучение морфобиологических и хозяйственно-ценных признаков гороха стародавних и современных сортов / Ф.А. Давлетов, К.П. Гайнуллина, И.К. Каримов // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. 2016. – № 4 (40). – С. 21.
7. Дрибноходова, О.П. Исследование аллельного полиморфизма микросателлитных локусов у разных линий, сортов и мутантов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) / О.П. Дрибноходова, С.А. Гостимский // Генетика. – 2009.– № 7 (45). – С. 900-906.
8. Давлетов, Ф.А. Изучение полиморфизма микросателлитных локусов гороха посевного (*Pisum sativum* L.) / Ф.А. Давлетов, К.П. Гайнуллина // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. – 2013. – № 2 (26). –С. 10.
9. Федин, М.А. Методика государственного сортоиспытания сельскохозяйственных культур / М.А. Федин.– М., 1985. – 263 с.
10. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта. Изд. 6-е, стер. / Б.А. Доспехов.– М.: Альянс, 2011. – 352 с.

Literature

1. Makasheva, R.Kh. The cultural flora in USSR. Volume 4. Leguminous crops. Part 1. Peas / Edited by O.N. Korovina. – L.: Kolos, 1979. – PP. 132-133.
2. Davletov, F.A. The breeding of non-falling varieties of peas in the Southern Urals / F.A. Davletov.– Ufa: Gilem, 2008. – P. 3.

3. Federal Service of the State Statistics [e-resource]. – regime of access: <http://www.gsk.ru>.
4. Zhukovsky, P.M. The cultural plants and their congeners. System, geography, cytogenetics, immunity, ecology, origin, use. The 3-d issue, appr., add / P.M. Zhukovsky.– L.: Kolos, 1971. – P. 5.
5. Gulyaev, G.V. The breeding and seed-growing of field plants: books and textbooks for the students of higher institutions. The 3-d issue, appr., add / G.V. Gulyaev, Yu.L. Guzhov. – M.: Agropromizdat, 1987.– P. 3.
6. Davletov, F.A. The comparative study of morphobiological and economic-valuable traits of peas of former and present varieties / F.A. Davletov, K.P. Gaynullina, I.K. Karimov // Newsletter of Bashkirsky State Agrarian University. – 2016. – № 4 (40). – P. 21.
7. Dribnikhodova, O.P. The study of allelic polymorphism of micro satellite loci of different varieties, lines and mutants of peas (*Pisumsativum*L.) / O.P. Dribnikhodova, S.A. Gostimsky // Genetics. – 2009. – № 7 (45). – PP. 900-906.
8. Davletov, F.A. The study of polymorphism of micro satellite loci of peas (*Pisumsativum* L.) / F.A.Davletov, K.P. Gaynullina // Newsletter of Bashkirsky State Agrarian University. – 2013. – № 2 (26).– P. 10.
9. Fedin M.A. Methodology of the State Variety Testing of Agricultural crops / M.A. Fedin. – M., 1985. – 263p.
10. Dospekhov, B.A. Methodology of a field trial. The 6-th issue, ster / B.A. Dospekhov.– M.: Aliyans, 2011. – 352p.