

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ НИЗКОРОСЛОСТИ И СКОРОСПЕЛОСТИ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ С ПОМОЩЬЮ КЛАССИЧЕСКИХ СПОСОБОВ ОЦЕНКИ И ДНК МАРКЕРОВ

Мухордова Мария Евгеньевна, к. с.-х. н., заведующая лабораторией молекулярно-генетических исследований, доцент, ФГБНУ «Омский аграрный научный центр», E-mail: mukhordova@anc55.ru

Аннотация: В статье представлены результаты идентификации генотипов по генам короткостебельности и фотопериода озимой пшеницы, которые применяются при подборе для скрещиваний пар сортов пшеницы при разработке нового сорта.

Ключевые слова: мягкая озимая пшеница, диаллельные гибриды, комбинационная способность, длина стебля, ген короткостебельности *Rht8*, продолжительность периода всходы-колошение, ген фотопериода *Ppd-D1*.

Введение. Эффективный способ увеличения урожайности сельскохозяйственных культур — это создание новых продуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов на основе применения в селекционной практике достижений методов генетики.

Внедрение метода маркер-вспомогательной селекции (MAS, marker-assisted selection) наряду с оценкой сортов на комбинационную способность имеет немаловажное значение для более объективной характеристики показателей сорта и прогноза отбора. Контролировать перенос хозяйственно-ценных генов от одного организма другому, значительно сократить затраты труда, ускорить и удешевить селекционный процесс позволяет использование ДНК-маркеров [1].

Положительный опыт селекционеров в нашей стране и за рубежом показывает актуальность дальнейшего совершенствования сортов путем улучшения ценных признаков и свойств в сочетании с устойчивостью к полеганию и нейтральности к фотопериоду [2].

Цель исследования. Определить систему генетического контроля длины стебля и продолжительности периода всходы-колошение мягкой озимой пшеницы, применяя классические способы оценки и ДНК маркеров.

Материалы и методы. Объектом эксперимента были 3 сорта и 3 линии местной селекции, различающиеся между собой по хозяйственно-ценным признакам. ЛГ2 - (Фантазия х (Донская остистая х Мутант 114)) х Юбилейная180. ЛГ3 - Юбилейная 180 х Сплав. ЛГ4 - Сплав х (Фантазия х (Донская остистая х Мутант 114)). Северная заря. Новосибирская 32. Омская озимая.

Исследования в полевых условиях проведены в 2018-2019гг. Схема скрещивания – полная диаллельная (6 x 6). Повторность - трехкратная. Площадь питания 10 x 20 (см²). Предшественник – чистый пар. В наших исследованиях проведен расчет комбинационной способности по Гриффингу [3] модель I, метод I (в анализ включены данные по родителям, прямым и обратным гибридам) с использованием программного продукта AGROS версия 2.13 (Мартынова С.П., д. б. н.).

Метеоусловия лет исследований значительно различались. За вегетацию озимой пшеницы в 2018 г. выпало 183,4 мм осадков, ГТК составил 1,52 (переувлажнение). За период вегетации культуры в 2019 г. выпало 152,0 мм осадков, ГТК был равен 1,10 (достаточное увлажнение). Необходимо отметить, что в период вегетации 2019г. температура была близка к норме с переувлажнением в начале, и засухой в конце сезона произрастания.

Для определения наличия аллелей гена Rht-8 и Ppd-D1 у озимой пшеницы использовался тот же растительный материал. Пробоподготовка образцов осуществлялась при помощи гомогенизатора TissueLyser LT. Экстракцию ДНК проводили из 3-х дневных проростков зерен пшеницы с помощью готового набора реактивов «ФитоСорб» («Синтол», Россия). Реакцию амплификации с праймером к SSR-маркеру гена Rht8: WMS261-F и WMS261-R проводили согласно протоколу, описанному в оригинальной статье [4]. Для определения аллельного состояния гена *Ppd-D1* использовали праймеры, разработанные Beales с соавторами [5]. Праймеры синтезированы в ООО «Биоссет» (г.Новосибирск). Для проведения ПЦР был использован набор БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2x) объемом 50 мкл. Амплификацию осуществляли в термоциклере T100 («Bio-Rad», США).

Продукты амплификации разделяли методом горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле в 1×TBE буфере и окрашивали с помощью Ethidium bromide. Результаты детектированы в системе гель документации GelDoc XR+ с помощью ПО Bio-Rad Image Lab 5.1. В качестве маркера молекулярного веса использовали «50 bp Ladder».

Результаты и их обсуждение. Преимущество аддитивного влияния генов в наследовании изучаемых признаков «длина стебля» и «продолжительности периода всходы-колошение» было отмечено в результате анализа как в 2018г., так и в 2019г. (таблица 1).

Таблица 1. -Комбинационная способность сортов озимой пшеницы по их гибридам F₁

| Источник изменчивости | Длина стебля | | | | Период всходы-колошение | | | |
|-----------------------|--------------|--------------|----------|--------------|-------------------------|--------------|----------|--------------|
| | 2018 год | | 2019 год | | 2018 год | | 2019 год | |
| | mS | % | mS | % | mS | % | mS | % |
| ОКС | 192,7* | 84,92 | 209,18* | 44,38 | 5,87* | 74,12 | 25,15* | 73,28 |
| СКС | 16,04 | 7,07 | 96,97* | 20,57 | 0,48 | 6,06 | 1,21 | 3,53 |
| Реципрокный эффект | 18,17 | 8,01 | 165,24 | 35,05 | 1,57 | 19,82 | 7,96 | 23,19 |

* Достоверно при $P \leq 0,05$

Тожественные показатели обнаружены также и по долям варианс ОКС, варианты СКС и реципрокного эффекта оказались не достоверными. Выявлено увеличение экспрессии аддитивных генов для этих показателей в более благоприятных условиях среды. Исключение составил 2019г. по длине стебля, когда было установлено, что доля варианты ОКС (44,38%) оказалась в половину меньше, а доля реципрокного эффекта была высокой, но не достоверной ввиду менее благоприятных условий вегетации

При исследовании оценок эффектов ОКС по длине стебля выявлено, что у гибридов F₁ укорачивает стебель по годам исследования сорт Северная Заря, линия ЛГ2 снижает его в 2018г. (таблица 2).

По признаку сроки колошения в эксперименте по годам исследования выделяется линия ЛГ2, которая сокращает данный показатель.

Таблица 2 - Оценки эффектов ОКС озимой пшеницы (Р) по признаку «длина стебля» по гибридам F₁

| Родительская форма | Длина стебля | | Период всходы-колошение | |
|------------------------|--------------|--------|-------------------------|--------|
| | 2018г. | 2019г. | 2018г. | 2019г. |
| ЛГ2 | -2,36 | 7,50 | -0,93 | -1,93 |
| ЛГ3 | -3,69 | 1,14 | 0,07 | -1,54 |
| ЛГ4 | -2,54 | 0,09 | 0,49 | 0,71 |
| Северная Заря | -1,60 | -4,52 | 0,10 | 0,02 |
| Новосибирская 32 | 4,93 | -1,67 | 0,94 | 1,66 |
| Омская озимая | 5,27 | -2,53 | -0,68 | 1,07 |
| Стандартное отклонение | 1,90 | 7,14 | 0,39 | 1,15 |

Проведен ПЦР анализ по определению генотипов, носителей признака «короткостебельность» для гена Rht8. Из всех известных аллелей гена Rht8 у большинства сортов пшеницы (90%) выявлено 3 основных, соответствующих фрагментам 192п.н (Rht8c), 174п.н и 165п.н. Аллель Rht8c был выявлен во всех проанализированных образцах линии ЛГ2 и сорта Северная Заря и в одном из образцов ЛГ4 среди изученных родительских форм. Сорт Омская озимая содержит аллель 174п.н, приводящий к снижению высоты растения, но лишь на 3см. Во всех остальных образцах длина амплифицированного участка ДНК соответствовала 165п.н.

Для выявления генотипов с целевым геном Ppd D1 была осуществлена полимеразно-цепная реакция (рисунок 3). У гена PpdD1 наличие бэнда 288п.н указывает на доминантный аллель PpdD1a, который соответствует нечувствительности к фотопериоду в отличие от рецессивного PpdD1b. За исключением ЛГ2 все исследованные линии и сорта имеют генотип PpdD1b. Интересно, что в линии ЛГ2 были обнаружены 3 различных генотипа по гену PpdD1. Поэтому разделение на линии ЛГ2 по генотипам PpdD1aa, PpdD1bb, PpdD1a/b позволит определить, как проявляется нечувствительность к фотопериоду и установить целесообразность отбора по этому признаку в условиях Западной Сибири.

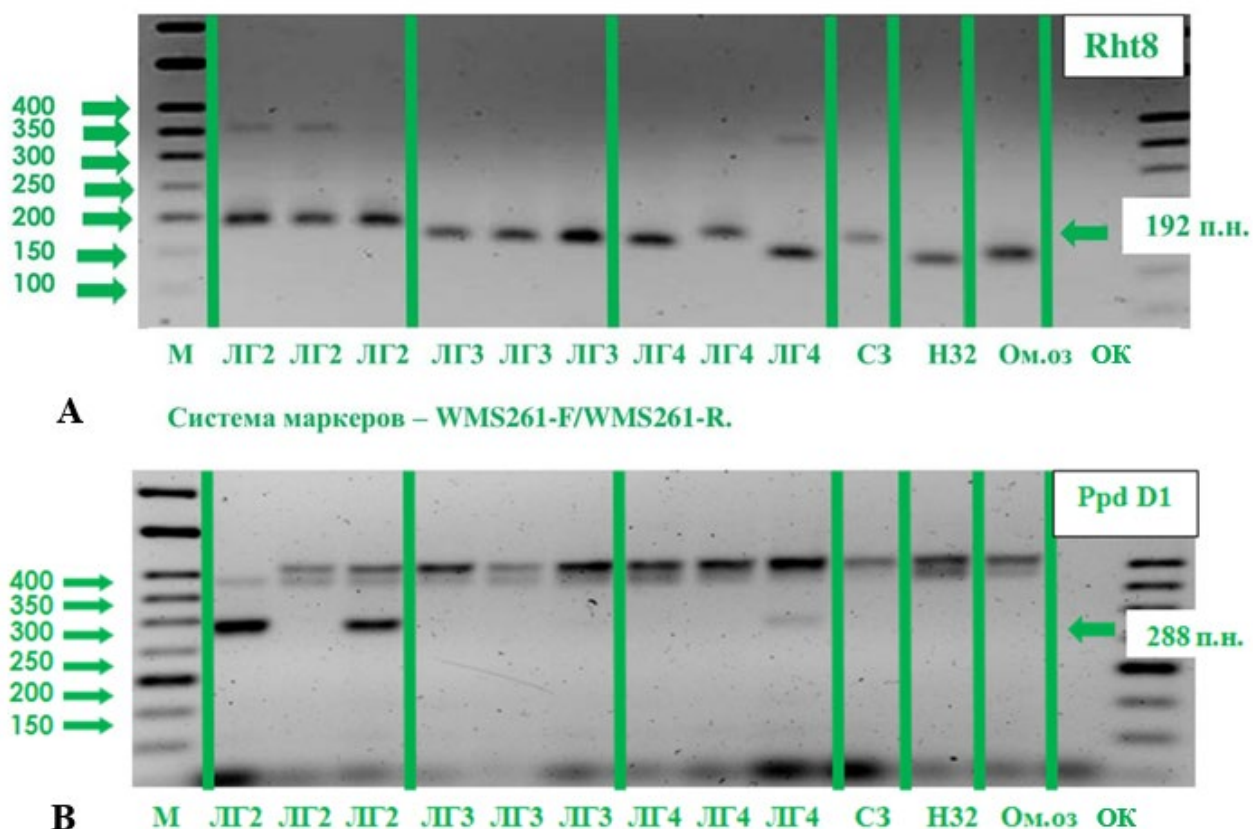


Рис.1 Электрофореграмма скрининга образцов озимой мягкой пшеницы: А - по аллелю Rht-8: М – маркер молекулярного веса (М) 50 bp (50–1000 п. н.); ОК – H₂O деионизированная (отрицательный контроль); В - по аллелю Ppd D1: М – маркер молекулярного веса (М) 50 bp (50–1000 п. н.); ОК – H₂O деионизированная (отрицательный контроль)

Заключение.

1. По признаку «короткостебельность» определены доноры: ЛГ2 и Северная Заря, по продолжительности периода всходы-колошение, таковым является ЛГ2.

2. В результате проведенных генетических анализов, как статистических, так и молекулярных (эффекты ОКС и детекция аллелей генов, отвечающих за короткостебельность) были найдены ассоциации между днк-маркерами и эффектами общей комбинационной способности для признака «длина стебля»: ЛГ2 (ОКС ($F_1 = -1,23$) = Rht 8c (192 п.н.); Северная Заря - (ОКС ($F_1 = -1,21$) = Rht 8c (192 п.н.).

3. Линии озимой мягкой пшеницы, содержащие в своем генотипе аллель Rht-8c (192п.н.), обладают укороченным стеблем и могут быть рекомендованы в качестве источников короткостебельности для использования в селекционных программах, направленных на снижение высоты растений.

4. На основании проведенных генетических анализов статистических, так и молекулярных (эффекты ОКС, а также выявив аллели генов, отвечающие за фотопериод) были установлены ассоциации маркер-признак для показателя

продолжительность периода всходы-колошение: ЛГ2 (ОКС (F1= -0,93 (2018), F1= -1,93 (2019); Ppd D1a (288п.н.).

5. Линии озимой мягкой пшеницы, несущие в своем генотипе доминантный аллель PpdD1a (288п.н.) ускоряют время цветения растений, уменьшая их жизненный цикл и могут быть рекомендованы в качестве источников скороспелости для использования в селекционных программах.

Библиографический список

1. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. том 17. № 4(2). С.1044-1054.
2. Коршунова, А.Д. Анализ распределения генов короткостебельности пшеницы и ржи среди сортообразцов яровой гексаплоидной тритикале (*triticosecale wittm.*) / А. Д. Коршунова, М. Г. Дивашук, А. А. Соловьев, Г. И. Карлов // Генетика. 2015. том 51. № 3. С. 334–340.
3. Griffing, B. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system / B. Griffing // Austral. J. Biol. Sci. 1956. Vol.9. P.463-493.
4. Korzun, V. Genetic analysis of the dwarfing gene (*Rht8*) in wheat. Part I. Molecular mapping of *Rht8* on the short arm of chromosome 2D of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) / V. Korzun, M.S. Roder, M.W. Ganal, A.J. Worland et al. // Theor. Appl. Genet. 1998. № 96. P.1104 -1109.
5. A pseudo-response regulator is misexpressed in the photoperiod insensitive Ppd-D1a mutant of wheat (*Triticum aestivum* L.) / J. Beales, A. Turner, S. Griffiths, et al. // Theor Appl Genet. 2007. Vol. 115. P. 721–733.

IDENTIFICATION OF SOURCES OF STUNTING AND PRECOCITY OF SOFT WINTER WHEAT, USING CLASSICAL ASSESSMENT METHODS AND DNA MARKERS

Mukhordova M.E., Candidate of Agricultural Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Genetic Research, Associate Professor, Omsk Agrarian Scientific Center, E-mail: mukhordova@anc55.ru

Abstract: *The article presents the results of the identification of short-stemmed and photoperiod genes in the genotype of winter wheat samples, which are used in the selection for crossing pairs of wheat varieties in the development of a new variety.*

Keywords: *soft winter wheat, diallel hybrids, combinational ability, stem length, Rht8 short-stem genes, duration of the germination-earring period, Ppd-D1 photoperiod gene.*