

Создание исходного материала для селекции озимой пшеницы на иммунитет методом молекулярного маркирования*

Н.А. Николаев, соискатель, **Е.Е. Кочкина**, зав. лабораторией, ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Повышение иммунитета у вновь создаваемых сортов является приоритетным направлением в селекции озимой пшеницы в Оренбургском ГАУ. Оно диктуется современными требованиями сельскохозяйственного производства, предъявляемыми к толерантным и иммунным сортам, чтобы обеспечить стабильность их урожайности и качество зерна по годам.

В зоне расположения Оренбургской области среди грибных болезней злаков экономически значимой является бурая ржавчина. Защитить пшеницу от этой болезни можно созданием устойчивых сортов.

Успешное решение поставленной задачи будет определяться наличием разнообразного исходного материала по *Lr*-генам, правильным подбором родительских пар, знанием закономерностей наследования важнейших признаков, мощным и надёжным инструментом в решении проблемы

устойчивости – использованием молекулярных маркёров [1, 2].

В настоящее время имеется достаточное количество доноров *Lr*-генов. По «Каталогу генных символов» известно более 70 генов устойчивости к бурой ржавчине различного происхождения и разной эффективности защиты от патогена по регионам и континентам [3].

Поскольку собственные *Lr*-гены мягкой пшеницы почти потеряли резистентность, их источником в последнее время является генофонд дикорастущих сородичей пшеницы или исходный материал, созданный с его участием: *Aegilopsventricosa*, *Ae.umbellulata*, *Ae.squarrosa*, *Ae.speltoides*, *Secalecerale*, *Agropyronelongatum* [4].

Идентифицировать *Lr*-гены можно традиционными способами – гибридологическим, фитопатологическим, по родословной, и новым современным подходом – с использованием молекулярных маркёров. Они разработаны для большинства генов устойчивости [5].

* Работа выполнена при финансовой поддержке МСХ РФ по теме «Исследование и разработка новых направлений и методов в селекционно-семеноводческой работе и подготовке специалистов, владеющих навыками данной работы с применением современных информационных технологий».

Молекулярные маркёры – это генетические маркёры, тесно сцепленные с «целевым» геном [6]. Являются надёжным инструментом детекции одного или комбинации генов в генотипе. Они позволяют контролировать передачу нужного гена от донора реципиенту в череде поколений возвратных скрещиваний на любой стадии развития растений, ускорять процесс селекции, пирамидировать гены [7].

Цель исследования: создание нового селекционного материала озимой пшеницы с содержанием одного или пирамиды генов устойчивости к бурой ржавчине. В задачи исследования входило: а) идентификация «целевых» генов устойчивости к бурой ржавчине с использованием ПЦР-анализа у индивидуальных растений в серии возвратных скрещиваний и у сортов-доноров устойчивости из коллекции ВНИИР; б) выделение растений с эффективными генами (отбор по фенотипу и генотипу).

Материал и методы исследования. Материалом исследования служили набор моногенных линий серии Thatcher, набор сортов, несущих *Lr*-гены (предоставлены Е.И. Гульяевой, ВИЗР), и гибридный материал, созданный в ОГАУ. Полевые испытания проводили на полях учебно-опытного хозяйства ОГАУ.

Гибридные растения пшеницы получали от скрещивания доноров, несущих гены *Lr10*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr34*, *Lr37*, *Lr46* с местными сортами и линиями-реципиентами. В качестве доноров использовали коллекционные образцы: Станичная (*Lr34*), Renan (*Lr37*, *Lr24*), Лютесценс 660 (*Lr24*), линия 113/00¹-4 (*Lr10*, *Lr21*, *Lr37*, *Lr46*). Интрогрессивная линия 113/00¹-4 получена от скрещивания Родина × *Aegilops triuncialis* (предоставлена И.Ф. Лапочкиной, Немчиновка). В качестве реципиентов брали сорта и перспективные линии, полученные с участием сортов Пионерская 32, Колос Оренбуржья, Жемчужина Поволжья, Тарасовская остистая и др.

Идентификацию *Lr*-генов осуществляли при помощи ПЦР-анализа и праймеров, маркирующих гены *Lr10*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr34*, *Lr37*, *Lr46*. ДНК растений выделяли с использованием SDS-буфера из проростков. Протоколы проведения ПЦР заимствованы из литературных источников и базы Интернет [5].

Амплификацию проводили в термоциклере «Терцик». Реакционная смесь включала ДНК растений (1 мкл), специфические праймеры (по 1 мкл), дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, буфер, фермент Taq-полимеразу, хлорид магния. Реакционную смесь доводили до 15 мкл водой без нуклеаз.

Продукты амплификации генов анализировали путём электрофоретического разделения в горизонтальном 1%-ном или 2%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Резуль-

таты визуализировали в ультрафиолетовом свете. В качестве маркёров молекулярного веса использовали GeneRuler 1 kbp DNA Ladder и GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). Положительное заключение о наличии гена делали при обнаружении в дорожке специфической светящейся полосы определённой массы, которую устанавливали по линейке молекулярных масс. Для документирования полученных результатов гелевые пластины фотографировали (рис. 1).

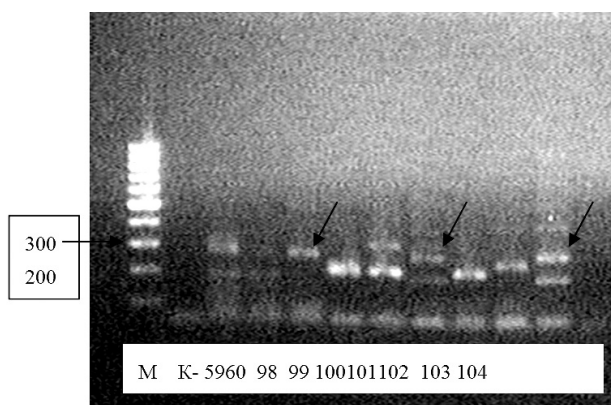


Рис. 1 – Идентификация гена *Lr46*:

М – маркёр молекулярной массы; К – отрицательный контроль; 59–104 – исследуемые образцы. Стрелкой указан контрольный фрагмент амплификации размером 242 п.о.

Результаты исследования. На провокационном фоне в 2014 и 2018 гг. испытан набор моногенных линий серии Thatcher (NIL) и набор сортов в фазе взрослых растений для выявления генов устойчивости к бурой ржавчине, способных защищать растения в данной эколого-географической зоне возделывания озимой пшеницы. Болезнь диагностировали по её симптомам проявления на листьях. Оценку степени поражённости растений бурой ржавчиной проводили визуально по проценту занимаемой уредопустулами площади флагового и предфлагового листьев. Пик инфекционной нагрузки приходился на фазу молочно-восковой спелости.

Установлено, что в местных условиях выращивания пшеницы по данным 2014 и 2018 гг. были неэффективны (поражение 30 % и более) против возбудителя болезни гены NIL – *Lr10*, *Lr13*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr32*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr37*, *Lr45*; сорта – Egret (*Lr13*), Marquis (*Lr35*) (табл. 1). Эффективность других генов была следующей: 1. Умеренно устойчивые (поражение до 15 %): NIL – *Lr21*, *Lr23*, *Lr26*, *Lr38*, сорт – Agata (*Lr19*). 2. Устойчивые (поражение до 5 %): NIL – *Lr9*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr44*; сорта – Gaza (*Lr23*), Gatcher (*Lr27+31*), CS₂A₁₂M (*Lr28*), CSP44 (*Lr48+34*), Pavon 76 (*Lr46+34*), Pavon (*Lr47*), VL404 (*Lr49+34*).

1. Оценка сортов и моногенных линий серии *Thatcher* на устойчивость к грибным болезням

Линии	Поражение бурой ржавчиной по годам, %		Поражение стеблевой ржавчиной	Поражение мучнистой росой
	2014	2018	2018	2018
<i>ThLr9</i>	ед.	5	сильное	+
<i>ThLr29</i>	0	–	–	–
<i>ThLr34</i>	5	ед.	0	+
<i>Th Lr44</i>	5	5	сильное	+
<i>ThLr23</i>	5	10	слабое	+
<i>Th Lr35</i>	0	30	слабое	+
<i>Th Lr36</i>	0	35	слабое	+
<i>ThLr19</i>	5	50	слабое	+
<i>Th Lr45</i>	0	65	сильное	+
<i>Th Lr38</i>	10	15	слабое	+
<i>ThLr26</i>	15	5	слабое	+
<i>ThLr21</i>	15	15	сильное	+
<i>ThLr13</i>	20	35	сильное	+
<i>ThLr37</i>	40	–	–	–
<i>ThLr32</i>	60	40	слабое	+
<i>ThLr20</i>	70	80	сильное	+
<i>ThLr10</i>	80	15	слабое	+
Сорта				
<i>Lr23, Gasa</i>	0	0	0	0
<i>Lr46+34, Pavon 76</i>	0	ед.	0	0
<i>Lr47, Pavon</i>	0	0	0	0
<i>Lr48+34, CSP44</i>	ед.	0	0	0
<i>Lr49+34, VL404</i>	0	ед.	сильное	0
<i>Lr28, CS₂A₁₂M</i>	0	ед.	сильное	0
<i>Lr27+31, Gatcher</i>	ед.	5	сильное	+
<i>Lr35, Marquis</i>	0	30	слабое	+
<i>Lr19, Agata</i>	5	15	слабое	+
<i>Lr13, Egret</i>	60	–	–	–
<i>Lr20, Thew</i>	80	60	сильное	0

В 2018 г. инфекционная нагрузка патогенов была настолько интенсивной, что восприимчивые растения были поражены не только бурой, но стеблевой ржавчиной и мучнистой росой. По ним дополнительно проведён учёт поражения растений стеблевой ржавчиной и мучнистой росой, хотя это не входило в задачу исследования. Поражённость растений стеблевой ржавчиной оценивали по 3-бальной шкале: сильная, слабая, отсутствует; мучнистой росой – по 2-бальной: есть, нет. Не были поражены стеблевой ржавчиной

и мучнистой росой сорта *Gasa (Lr23)*, *Pavon 76 (Lr46+34)*, *Pavon (Lr47)*, *CSP44 (Lr48+34)*.

Таким образом, выявлены линии с известными генами устойчивости к бурой ржавчине, которые способны сдерживать развитие болезни и могут быть использованы в селекции озимой пшеницы на иммунитет.

Была начата работа по передаче эффективных в условиях данного эколого-географического региона генов устойчивости к бурой ржавчине в сорта мягкой озимой пшеницы селекции ОГАУ. В качестве доноров указанных генов были использованы сорта: *Станичная (Lr34)*, *Renan (Lr37, Lr24)* и линии: 113/00ⁱ-4 (*Lr10, Lr21, Lr37, Lr46*), *Лютесценс 660 (Lr24)*. Началу этой работы предшествовали полевые испытания, в результате которых выявлены сорта и линии, устойчивые к бурой ржавчине [8]. Освоение нами ДНК-технологии позволило идентифицировать *Lr*-гены у названных и других сортов [9].

На первом этапе создавали аналоги реципиентов по схеме скрещивания (рис. 2). Проводили беккроссы с целью увеличения адаптивного материала сорта-реципиента в гибридном потомстве и уменьшения доли наследственности донора, как мало приспособленного к местным условиям произрастания, или имеющего низкие хозяйственно ценные признаки и свойства.

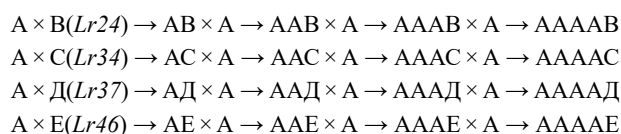


Рис. 2 – Схема получения аналогов:
 А – сорт-реципиент; В, С, Д – сорт-донор

После первого и последующих насыщений применяли ПЦР-анализ. С его помощью находили гибридные растения, в генотипе которых присутствовал «целевой» ген. Такие растения использовали для повторного скрещивания с реципиентом.

После 4–5 возвратных скрещиваний полученные аналоги скрестили между собой с целью пирамидирования генов, т.е. объединения в одном генотипе нескольких «целевых» генов устойчивости по схеме: $AAAAB \times AAAAC \times AAAAA \times AAAAE$.

После самоопыления гибридных растений BC5F1 получили гибридные популяции BC5F2, из которых сделали индивидуальный отбор растений. В 2018 г. потомство отобранных растений испытали на провокационном фоне. Затем из них отобрали по фенотипу семьи, которые не были поражены бурой ржавчиной.

Особое внимание было обращено на две семьи, которые оказались без симптомов заболевания не только бурой, но и стеблевой ржавчиной, и

мучнистой росой. Отсутствие расщепления в этих семьях по искомым генам свидетельствует об их гомозиготном состоянии.

Молекулярный анализ, применимый в первую очередь к этим семьям, показал, что семья Эрт-232 обладала комбинацией из четырёх идентифицированных генов: *Lr46*, *Lr34*, *Lr10*, *Lr1*. Семья Эрт-231 имела в своём генотипе три гена: *Lr46*, *Lr34*, *Lr1*. Для практической селекции и это более ценные формы, обладающие групповой устойчивостью к местным патогенам возбудителей.

Ген *Lr1* в настоящее время утратил свою эффективность повсеместно [10]. Ген *Lr10* также утратил эффективность во всём мире, однако, согласно R.A. McIntosh, он может быть эффективным в сочетании с другими генами [11].

Lr34 – ген возрастной устойчивости, при которой болезнь развивается медленнее, несмотря на восприимчивый тип реакции растения. Подобную устойчивость называют частичной или устойчивостью по типу медленного развития [12]. Ген тесно сцеплен с генами устойчивости к мучнистой росе (*Pm46*), стеблевой (*Sr57*) и жёлтой ржавчине (*Yr18*) [13]. Сорты с геном *Lr34* сохраняют устойчивость в различных зонах в течение нескольких десятилетий [11].

Ген *Lr46*, как и *Lr34*, относится к группе генов, обеспечивающих частичную устойчивость. Сохраняет устойчивость к бурой ржавчине по настоящее время [11].

Таким образом, в результате возвратных скрещиваний получены устойчивые к бурой ржавчине формы, близкие по фенотипическому выражению к местным сортам и линиям, обладающие пирамидой генов, которые способны обеспечить продолжительную защиту растений от грибных заболеваний.

Семьи Эрт-232 и Эрт-231 переданы в селекционный питомник для испытания на хозяйственную полезность. Проводится идентификация *Lr*-генов у других полученных семей и растений.

Выводы. В результате испытания моногенных линий серии Thatcher и сортов выявлены *Lr*-гены и их комбинации, способные защитить растения от местной популяции бурой ржавчины в Оренбуржье как эколого-географическом регионе возделывания озимой пшеницы: *Lr9*, *Lr23*, *Lr27+31*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr44*, *Lr46+34*, *Lr47*, *Lr48+34*, *Lr49+34*.

В результате возвратных скрещиваний, проводимых под контролем ДНК-маркирования, осуществлён перенос от доноров с эффективной устойчивостью генов в условиях Оренбургской области к бурой ржавчине в сорта и линии озимой пшеницы селекции ОГАУ.

Для селекции озимой пшеницы на иммунитет получен новый исходный материал с расширенной генетической основой устойчивости, содержащий в своём генотипе комбинацию из четырёх (*Lr46*, *Lr34*, *Lr10*, *Lr1*) и трёх (*Lr46*, *Lr34*, *Lr1*) *Lr*-генов.

Литература

1. Использование молекулярных маркёров в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Э.Р. Давоян, Л.А. Беспалова, Р.О. Давоян [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. № 4/1. С. 732–738.
2. Создание линий озимой пшеницы с несколькими генами устойчивости к *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* для использования в селекционных программах России / И.Ф. Лапочкина, О.А. Баранова, Н.Р. Гайнуллин [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. №6. С. 676–684.
3. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/>
4. Изучение интрогрессивных линий мягкой пшеницы с генетическим материалом *Aegilopstauschii* по устойчивости к листовой ржавчине / Э.Р. Давоян, А.С. Миков, Ю.С. Зубанова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 1. С. 97–101.
5. Сайт MAS Wheat [Электронный ресурс]. URL: <http://www.maswheat.ucdavis.edu>
6. Леонова И.Н. Молекулярные маркёры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013. Т. 17. № 2. С. 314–325.
7. Применение молекулярных маркёров в селекции пшеницы в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко / Л.А. Беспалова, А.В. Васильев, И.Б. Аблова [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012. Т. 16. № 1. С. 37–43.
8. Николаев Н.А. Полевая оценка сортообразцов озимой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине. // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. № 4(32). С. 52–54.
9. Николаев Н.А., Сычёва М.В., Краснова Л.И. Применение ДНК-маркёров в селекции пшеницы на иммунитет // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2013. № 2(40). С. 54–57.
10. Гульязева Е.И., Баранова О.А. Тенденции изменчивости популяций *Puccinia triticina* под влиянием выращиваемых сортов пшеницы и эффективность *Lr*-генов в основных зернопроизводящих регионах РФ // Технология создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб: РАСХН, Отделение защиты растений. ГНУ ВНИИЗР, 2010. С. 26–48.
11. Гульязева Е.И. Методы идентификации генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине с использованием ДНК-маркёров и характеристика эффективности *Lr*-генов. СПб., 2012. 72 с.
12. Вожжова Н.Н. Идентификация гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в сортах и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы Аграрного научного центра «Донской» // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22. № 3. С. 329–332.
13. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., et al. // Catalogue of gene symbols for wheat. The 12th Int. Wheat Genetics Symp. Japan, Yokohama, 2013; 197. Available at <http://www.maswheat.ucdavis.edu>.