

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.1. - С.249-251

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ МАРКИРОВАНИЕ У ЛИНИЙ И СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ

Базылова Т.А., магистрант

НАО «Казахский аграрный национальный университет», г.Алматы

Введение Тритикале (*Triticosecale*) — гибридный род злаков, гибрид ржи и пшеницы, одна из важнейших кормовых культур Казахстана. Тритикале поражается болезнями, такими как бурая (*Puccinia recondita Rob. et Desm*), стеблевая (*P.graminis Pers.sp.f.tritici Ericss.et Henn.*) и желтая (*P.striiformis West.*) ржавчины[1].

Стеблевая ржавчина (возбудитель болезни гриб *Puccinia graminis Pers.sp.f.tritici Ericss.et Henn.*) поражает зерновые культуры - пшеницу, тритикале, рожь, ячмень и овес.

Вредоносность стеблевой ржавчины зависит от выносливости сорта, сроков заражения растений и интенсивности развития болезни[2-4].

Поиск новых генов устойчивости к возбудителям ржавчины – основная задача, стоящая перед селекционерами во всем мире. Источником этих генов служат близкородственные виды пшеницы, которые в последние десятилетия все активнее используются в селекции.

Известно более 50 генов устойчивости к стеблевой ржавчине, часть из них уже потеряли эффективность. По данным СИММИТ(СИММУТ), эффективность к расе Ug99 сохраняют гены *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp*, *Sr2*, *Sr13*, *Sr14*, *Sr22*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*, *Sr33*, *Sr45*, *Sr40*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr27* и *1A.1R* (Singh et al., 2006) [5].

Тритикале – это пшенично-ржанной гибрид, поэтому информация о маркерах, расположенных в геномах А и В пшеницы и R геноме ржи, может быть с успехом использована для анализа генома тритикале на наличие генов устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине[6].

ДНК-маркирование тритикале по выявлению носителей эффективных *Sr*-генов является актуальным. Выявление доноров и носителей эффективных генов устойчивости к болезням задача селекции. В настоящее время для идентификации многих *Lr* и *Sr* генов созданы молекулярные маркеры. Маркирование сортов тритикале по устойчивости к ржавчинным болезням проводили в лаборатории биотехнологии КазНИИЗиР в рамках грантового финансирования КН МОН РК.

Материалом исследований служили 30 генотипов тритикале питомника конкурсного сортоиспытания Казахского НИИ земледелия и растениеводства. Образцы тритикале выращены на научном стационаре отдела зерновых культур Казахского НИИ земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР).

Методика исследований Выделение геномной ДНК из 7-15 дневных проростков тритикале с использованием методики *DeLaporta(1983)*.

Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции.

ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Eppendorf Mastercycler» (Германия). В работе использованы молекулярные маркеры к генам стеблевой ржавчины *Sr*. ПЦР для каждого маркера *Sr* проводили снаиболее оптимальными условиями, согласно оригинальным работам.

Разделение продуктов амплификации в 1,5-2% агарозных гелях, окрашенных бромистым этидием. В качестве маркеров использовали GeneRuler 100br DNA Ladder («Thermo Scientific»).

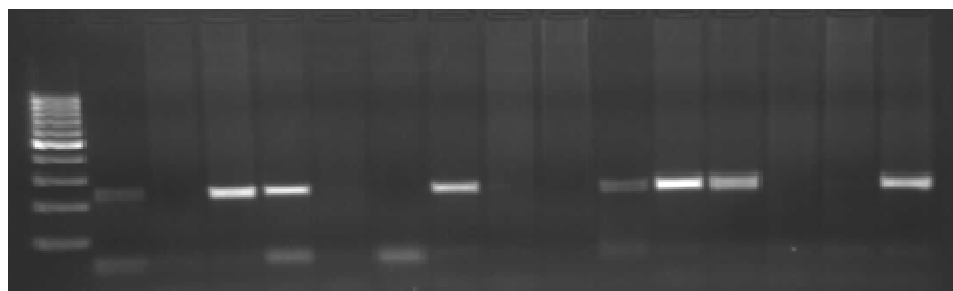
На основании анализа научной литературы, международных баз данных GrainGenes, MASWheat и сравнительного анализа работ по эффективным генам устойчивости к стеблевой ржавчине подобраны молекулярные маркеры, сцепленные с генами устойчивости к стеблевой ржавчине.

Результаты исследований Для ДНК маркирования образцов тритикале по устойчивости к стеблевой ржавчине выбраны четыре эффективных *Sr* – генов *Sr2*, *Sr22*, *Sr36* и *Sr40*, которые локализованы в геномах А и В и могут присутствовать в тритикале. Проведен ПЦР – анализ на наличие у 30 линий тритикале *Sr-генов (Sr2, Sr22, Sr36 и Sr40)*.

Ген *Sr2* локализован в длинном плече хромосомы 3BS[7], ген *Sr22* локализован в длинном плече 7AL, источником гена является *T.monococcum*. Ген *Sr36* и *Sr40* локализованы в коротком плече хромосомы 2В, источником генов является *T.timopheevii*.

Для идентификации носителей гена *Sr2*, гена устойчивости к стеблевой ржавчины использован SSR – маркер gwm533, тесно сцепленный с *Sr2* – геном, преимуществом которого является то, что он выявляется независимо от влияния среды и стадии развития растений [8]. В качестве положительного контроля была использована линия Pavon76.

С целью идентификации носителей гена *Sr22* проведен ПЦР анализ с праймерами к SSR-локусу *Xcfa2019*, расположенному на расстоянии 6сМ от гена *Sr22* [9]. Анализу были подвергнуты 28 образцов тритикале казахстанской селекции.



М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Рисунок 1 Продукты амплификации ДНК образцов тритикале с использованием к локусу CFA-2019F сцепленному с геном устойчивости *Sr22*

М-Маркер 100bp 1. *Sr22*-контроль 2.Т-42 3.СП2-221 4.Т-989-1 5.Тд-35
6.Тд-45 7.Тд-49 8.212-1 9.Т-14-4 10.ИМ-332 11.Т-409-2 12.Тд-23 13.15/10
14.Т-1004,15.Т-30/10

При использовании праймеров к локусу *Xcfa2019* амплифицировались фрагменты ДНК размером 235 п.н.. К носителям гена *Sr22* следуют отнести линии: СП2-221, Т-989-1, Тд-49, ИМ-332, Т-409-2, Тд-23, Т-30/10, 73/17-2, 480-4, ЯТХ-40-11, ЯТХ-232-4, ЯТХ-327-11, ЯТХ352-11.

Выводы Отработаны протоколы ПЦР анализов для идентификации носителей генов устойчивости стеблевой ржавчины. Проведен ПЦР – анализ на наличие у 30 линий и сортов тритикале *Sr-генов (Sr2, Sr22, Sr36 и Sr40)*.

Молекулярно-генетический анализ дает возможность выявить специфические геномные маркеры, которые могут использоваться для селекции генотипов. В будущем селекция, основанная на молекулярных маркерах, может значительно увеличить эффективность бридинга сельскохозяйственных культур.

Решающей задачей молекулярно-генетического исследования сегодня является использование теоретических обобщений для разработки ДНК-технологий с целью практического использования и внедрение в селекцию сельскохозяйственных растений, в частности такой важной культуры как тритикале. Использование молекулярных маркеров открывает перспективы для изучения генетической природы количественных признаков путем маркировки локусов, определяющих их развитие, и на этой основе практического повышения эффективности методов селекции.

Список литературы

1.Койшибаев М. Болезни зерновых культур: симптомы, распространение и вредоносность, специализация, биологические особенности, структура популяции возбудителей и интегрированная защита посевов.- Алматы: Бастау, 2002. - 368с.

2.Джиембаев Ж.Т. Виды ржавчины, поражающие хлебные злаки в Казахстане.//Тр. Казахского НИИ защиты растений. - Алма-Ата: Кайнар, 1972. - С. 232-254.

3.Турапин В.П. Стеблевая ржавчина пшеницы в Казахстане и особенности мер борьбы с ней. - Алма-Ата: КазНИНТИ, 1986.- 20 с.

4.Турапин В.П. Резерваторы болезни зерновых культур и меры борьбы с ними. - Алма-Ата, 1991.- 48 с.

5. Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Huerta-Espino J., Kinyua M.G., Wanyera R., Njau P., Ward R.W. Current status, likely migration and strategies to mitigate wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen.

CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science // Nutrition and Natural Resources. – 2006. – Vol. 1(054). DOI: 10.1079/PAVSNNR20061054

6. Долматович Т.В., Булойчик А.А., Борзяк В.С., Гриб С.И., Буштевич В.Н. Маркирование генов устойчивости к бурой ржавчине и их экспрессия на разных стадиях онтогенеза у сортов и перспективных образцов озимого тритикале // Вестник Национальной академии наук Беларуси. – 2015. - №2. – 54-59.

7. Helguera M., Khan, I. A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky PCR Assays for the Lr37-Yr17-Sr38 Cluster of Rust Resistance Genes and Their Use to Develop Isogenic Hard Red Spring Wheat Lines // Crop Sci. – 2003. - Vol.43. – P.1839–1847.

8. Gold J., Harden D., Towneley-Smith F. et al. Development of a molecular marker for rust resistance genes Sr39 and Lr35 in wheat // Theor. Appl. Genet. - 1999. - Vol.99. - P.554-560.

9. Khan R.R., Bariana H.S., Dholakia B.B., Naik S.V., Lagu M.D. Rathjen A.J., Bhavani S., Gupta V.S. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. - 2005. – Vol. 111. - P.846-850