

ИЗУЧЕНИЕ ГИБРИДОВ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СЕПТОРИОЗУ

H.B. Новоселова, А.В. Харина

Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого, Киров, Россия

Септориоз – одна из значимых болезней пшеницы, способная приводить к большим потерям урожая. В литературе описано более двадцати локусов устойчивости пшеницы к грибу *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous, который относится к самым вредоносным возбудителям септориоза. При помощи микросателлитных ДНК-маркеров нами были выявлены гибриды, несущие гены *Stb2* и *Stb9*. Данные гибриды представляют интерес для дальнейшей селекции устойчивых к септориозу сортов пшеницы.

Ключевые слова: ПЦР, SSR-маркеры, маркер-вспомогательная селекция, гибридизация, *Triticum aestivum* L.

THE STUDY OF WHEAT HYBRIDS WITH THE USE OF DNA-MARKERS OF RESISTANCE TO SEPTORIOSIS

N.V. Novoselova, A.V. Kharina

Federal Agricultural Research Center of the North-East named N. V. Rudnitsky, Kirov, Russia

Septoriosis is one of the important wheat diseases, which leads to significant yield losses. More than twenty loci of resistance to *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous have been described in literature. This fungus is related to most harmful causative agents of septoriosis. Using SSR markers, we identified hybrids with *Stb2* and *Stb9* genes. These hybrids are interesting for further breeding of septoriosis resistant cultivars of wheat.

Keywords: PCR, SSR markers, marker assisted breeding, hybridization, *Triticum aestivum* L.

Мягкая пшеница – важная продовольственная культура, выращиваемая по всему миру, однако её урожайность лимитируется различными биотическими и абиотическими стрессами. Септориоз относится к наиболее значимым грибным заболеваниям пшеницы. Его самыми вредоносными возбудителями являются *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous и *Parastagonospora nodorum* (Berk.) Quaedvlieg, Verkley & Crous. *Z. tritici* является грибом-гемибиотрофом и способна вызывать потери урожая пшеницы в размере до 50 %. К настоящему времени определено более двадцати локусов устойчивости пшеницы к *Z. tritici* (т. н. *Stb*-генов). Основная масса ДНК-маркеров, сцепленных с *Stb*-генами, относится к микросателлитным (SSR) маркерам [1, 4, 5, 7]. Микросателлитные маркеры отличаются высоким внутривидовым полиморфизмом. Преимуществами применения SSR-маркеров являются кодоминантность, точность, надежность и хорошая воспроизводимость результатов анализа [8]. Целью нашей работы было идентифицировать среди селекционного материала яровой мягкой пшеницы гибридные линии, несущие локусы устойчивости к *Z. tritici*.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись гибриды, предоставленные лабораторией селекции яровой мягкой пшеницы ФАНЦ Северо-Востока (г. Киров). В естественных полевых условиях Кировской области гибриды F₂ и родительские сорта оценивали по степени поражения, используя шкалу Saari and Prescott (1975) [9]. Определяли индекс устойчивости каждого образца [2]. Для получения ДНК семена анализируемых образцов были пророщены в рулонах фильтровальной бумаги. Выделение ДНК из 5-дневных проростков гибридов F₃ произведено гуанидин-изотиоционатным методом [10]. Для подтверждения наличия генов *Stb2* и *Stb9* использовали микросателлитные SSR-маркеры Xgwm 389 и Xwmc 317

соответственно, ранее показавшие сцепление с данными локусами [5]. Последовательности SSR-маркеров (табл. 1) были взяты из БД GrainGenes [6].

Таблица 1
SSR-маркеры, использованные для поиска *Stb*-генов

Ген	Маркер	Праймеры, прямой и обратный (5' – 3')	Температурный режим	Размер ампликона, п н
<i>Stb2</i>	Xgwm 389	ATCATGTCGATCTCCTTGACG TGCCATGCACATTAGCAGAT	I 95 °C – 5 мин; II 35 циклов: 95 °C – 30 с, 72 °C – 2 мин; III 72 °C – 7 мин	120
<i>Stb9</i>	Xwmc 317	TGCTAGCAATGCTCCGGGTAAC TCACGAAACCTTTCCCTCCTCC	I 95 °C – 5 мин; II 35 циклов: 95 °C – 1 мин, 65 °C – 50 с, 72 °C – 1 мин; III 72 °C – 7 мин	139

Состав реакционной смеси на 10 мкл: ДНК – 2 мкл, 10 x PCR буфер – 1 мкл, смесь dNTPs (4 mM) – 0,5 мкл, по 1 мкл прямого и обратного праймера, Таq-полимераза – 3,75 ед., вода mQ – 3,75 мкл. Условия проведения ПЦР и ожидаемый размер ампликонов представлены в табл. 1. Реакции выполнены на амплификаторе ТП4-ПЦР-01-«Терцик» («НПО ДНК-технология»). ПЦР-продукты были разделены методом вертикального электрофореза в 8 %-м полиакриламидном геле и окрашены бромистым этидием (1 %). Результаты электрофореза документировали с помощью видеосистемы «Взгляд» и ПО «IC Measure» («Компания Хеликон»). Размер амплифицированных фрагментов определяли с использованием 100bp+2Kb+3Kb ДНК-маркеров веса («СибЭнзайм»).

Результаты и обсуждение. На основании анализа научной литературы [1] и изучения коллекционных образцов [3] были выбраны сорта-носители генов устойчивости к *Z. tritici* *Stb2* и *Stb9*. Данные сорта были любезно предоставлены для селекционной работы Всероссийским институтом генетических ресурсов растений им. Н. И. Вавилова (г. Санкт-Петербург). Среди исходного материала с *Stb*-генами наибольший интерес представляет сорт Epos, характеризующийся в полевых условиях как умеренно восприимчивый (степень поражения составила 22,5 %) к септориозу листьев (табл. 2).

Таблица 2
Характеристика исходных форм и гибридов F₂ яровой мягкой пшеницы по устойчивости к септориозу листьев (2023 г)

Исходная форма/гибрид	Каталог ВИР	Происхождение	Ген	Септориоз	
				степень поражения, %	ИУ*
Heines Kolben	31235	Германия	<i>Stb6</i>	55,0	0,62
Heines Kolben x Nova Prata	-	-	-	66,7	0,90
Nova Prata	47064	Бразилия	<i>Stb2</i>	26,7	0,43
Nova Prata x Heines Kolben	-	-	-	53,3	0,59
Nova Prata x Награда	-	-	-	46,7	0,69
Apex x Nova Prata	-	-	-	53,3	0,56
Tonic	59449	Великобритания	<i>Stb9</i>	36,7	0,49
Tonic x Баженка	-	-	-	24,0	0,37
Epos	65801	Германия	<i>Stb2</i>	22,5	0,43
Epos x Heines Kolben	-	-	-	8,3	0,18
Epos x Tonic	-	-	-	6,7	0,14

*- индекс устойчивости сорта.

Гибриды с этим сортом в качестве материнской формы: Epos x Heines Kolben и Epos x Tonic, проявили полевую устойчивость к болезни (степень поражения листа 8,3 и 6,7 %, соответственно). Остальные сорта показали себя восприимчивыми к септориозу (степень поражения от 26,7 до 55,0 %). Гибриды с ними также характеризовались как восприимчивые, кроме умеренно восприимчивого гибрида Tonic x Баженка (степень поражения 24,0 %).

В ходе исследования был проведен ПЦР-анализ 102 гибридных линий F_3 , полученных от семи комбинаций скрещиваний (табл. 3). Нами были выявлены гибриды пшеницы, унаследовавшие от сорта-донора *Stb*-локусы (рис. 1). При использовании английского сорта Tonic (донора гена *Stb9*) была получена высокая доля (от 40 до 100 %) растений-гибридов, несущих локус устойчивости. Примечательны образцы 1167 и 1176, полученные при скрещивании сортов Epos и Tonic. У данных образцов были идентифицированы маркеры, связанные как с *Stb2*, так и с *Stb9*. Так как пирамидирование генов способствует более длительной устойчивости сортов к болезням [1], образцы 1167 и 1176 представляют собой ценный материал для дальнейшей селекции.

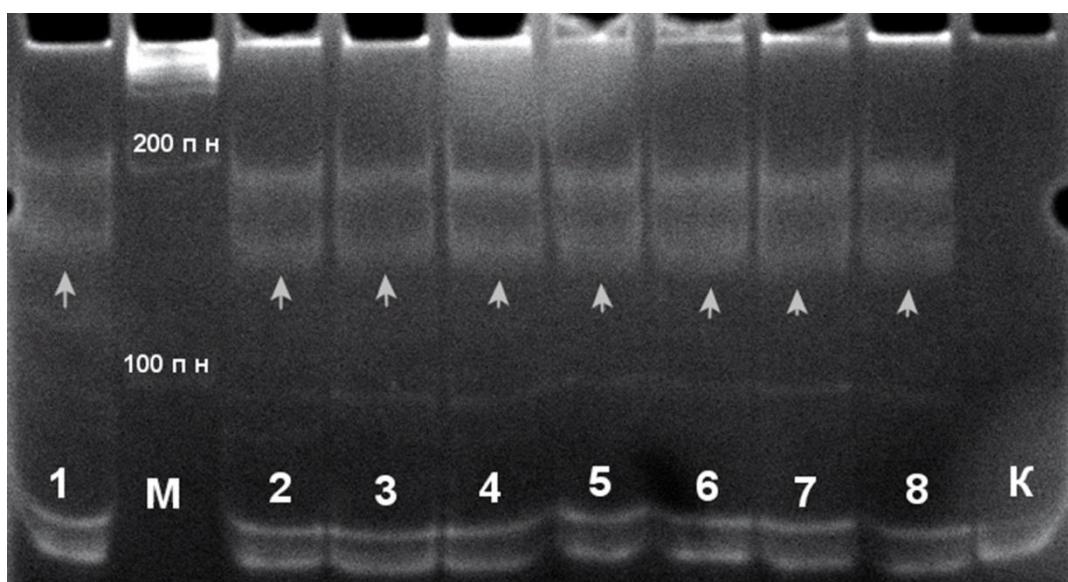


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации с праймерами к маркеру Xwmc 317 (сцеплен с локусом *Stb9*) в 8 %-м полиакриламидном геле. К — отрицательный контроль; М — маркер молекулярного веса; 1 – 8 – исследуемые линии пшеницы 1123 - 1130; Стрелками отмечены целевые амплификаты (139 п н).

Таблица 3
Результаты ПЦР-анализа гибридных линий F_3 яровой мягкой пшеницы

№ линий	Гибридная комбинация	Общее кол-во проанализированных растений	Образцы с <i>Stb</i> -генами	
			шт	%
<i>Stb2</i>				
1081 – 1099	Heins Kolben x Nova Prata (<i>Stb2</i>)	19	-	-
1102 – 1114	Nova Prata (<i>Stb2</i>) x Награда	13	1	8
1115 – 1117	Nova Prata (<i>Stb2</i>) x Heins Kolben	3	-	-
1131 – 1151	Apex x Nova Prata (<i>Stb2</i>)	21	-	-
1154 – 1161	Epos (<i>Stb2</i>) x Heins Kolben	8	-	-
1162 – 1186	Epos (<i>Stb2</i>) x Tonic (<i>Stb9</i>)	25	1	4
<i>Stb9</i>				
1118 - 1130	Tonic (<i>Stb9</i>) x Баженка	13	13	100
1162 - 1186	Epos (<i>Stb2</i>) x Tonic (<i>Stb9</i>)	25	10	40

Таким образом, нами были выделены гибридные линии, несущие локусы *Stb2* и *Stb9*. Данный селекционный материал был получен в результате скрещивания сортов пшеницы Epos и Tonic. Гибриды F₂ этих сортов проявили полевую устойчивость в естественных условиях Кировской области, гибриды F₃ также будут оценены по устойчивости к септориозу колоса.

Благодарности. Статья подготовлена при поддержке Минобрнауки РФ в рамках Государственного задания ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого» (тема № FNWE-2022-0001)

Библиографический список

1. Бакулина А. В., Харина А. В., Широких А. А. Септориоз листьев и колоса пшеницы: генетический контроль устойчивости хозяина (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. 2020. № 2. С. 26-35. DOI: 10.25750/1995-4301-2020-2-026-035.
2. Коломиец Т. М., Панкратова Л. Ф., Пахолкова Е. В. Сорта пшеницы (*Triticum L.*) из коллекции Grin (США) для использования в селекции на длительную устойчивость к септориозу // Сельскохозяйственная биология. 2017. № 52(3). С. 561-569. DOI: 10.15389/agrobiology.2017.3.561rus
3. Новоселова Н. В., Харина А. В., Бессолицына Е. А., Савинцева Л. С. Скрининг *Stb*-генов устойчивости к септориозу у сортов мягкой пшеницы // Зерновое хозяйство России. 2023. № 15(2). С. 57–62. DOI: 10.31367/2079-8725-2023-85-2-57-62.
4. Ababa G. Biology, taxonomy, genetics, and management of *Zymoseptoria tritici*: the causal agent of wheat leaf blotch // Mycology. 2023. V. 14. №. 4. P. 292-315. DOI: 10.1080/21501203.2023.2241492
5. Brown J. K. M., Chartrain L., Lasserre-Zuber P., Saintenac C. Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding // Fungal Genetics and Biology. 2015. V. 79. P. 33-41. DOI: 10.1016/j.fgb.2015.04.017.
6. GrainGenes, a database for Triticeae and Avena. URL: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/> (дата обращения: 17.01.2024)
7. Gupta P. K., Vasistha N. K., Singh S., Joshi A. K. Genetics and breeding for resistance against four leaf spot diseases in wheat (*Triticum aestivum L.*) // Frontiers in plant science. 2023. V. 14. P. 1023824. DOI: 10.3389/fpls.2023.1023824
8. Li T., Cai S., Cai Z., Fu Y., Liu W., Zhu X., Lai C., Cui L., Pan W., Li Y. TriticeaeSSRdb: A Comprehensive Database of Simple Sequence Repeats in Triticeae // Frontiers in Plant Science. 2024. V. 15. P. 1412953. DOI: 10.3389/fpls.2024.1412953
9. Saari E. E., Prescott J. M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease // Plant Disease Reporter, 1975. V. 59(5). P. 377–380.
10. Sambrook J., Fritch T., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual // New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.