



ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2020/0323.2

(22) 27.03.2020

(45) 24.07.2020, бюл. № 29

(72) Маденова Айгуль Калихожаевна; Кохметова Алма Мырзабековна; Атишова Макпал Нуржумаевна; Галымбек Канат; Кеишилов Женис Советканович; Кумарбаева Мадина Талгаровна

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Институт биологии и биотехнологии растений» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан

(56) Куресбек А. Исследование новых доноров для повышения устойчивости мягкой пшеницы к твердой головне // диссертационная работа доктора философии (PhD) по специальности 6D081 100 - Защита растений и карантин. Алматы. 2018 г. Стр. 127

(54) **СПОСОБ СОЗДАНИЯ ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВЫХ К ТВЕРДОЙ ГОЛОВНЕ**

(57) Полезная модель относится к сельскому хозяйству, к методам отбора в селекции растений и может быть использована в селекции пшеницы на повышение устойчивости к твердой головне пшеницы.

В предлагаемом способе создания линий пшеницы, устойчивых к твердой головне, включающем

фитопатологическое исследование, скрещивание выявленных устойчивых образцов с высокопродуктивными неустойчивыми, согласно полезной модели после инокуляции образцы пшеницы подвергают фитопатологическому скринингу полевой устойчивости к болезни, затем проводят молекулярный скрининг на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации носителей Vt-генов устойчивости к твердой головне, выявленные носители Vt-генов скрещивают с донорами высокой продуктивности образцов пшеницы, затем гибриды первого поколения F1 дважды беккроссируют и отбирают линии, несущие ДНК-маркеры к Vt-генам устойчивости, а потомство второго поколения F2 тестируют в полевых условиях на устойчивость к твердой головне пшеницы.

Преимуществом предлагаемого метода по сравнению с традиционным способом является то, что при использовании молекулярных маркеров на любом этапе селекционного процесса отслеживается наличие эффективных Vt-генов устойчивости к твердой головне, которые не зависят от условий выращивания и погодных условий, что, в конечном итоге, обеспечивает создание устойчивых к твердой головне образцов пшеницы.

Полезная модель относится к сельскому хозяйству, к методам отбора в селекции растений и может быть использована в селекции пшеницы на повышение устойчивости к твердой головне пшеницы.

Использование генетически устойчивых сортов является наиболее эффективным, экономически и экологически надежным методом контроля болезней, позволяющим снизить или элиминировать применение фунгицидов и свести к минимуму потери урожая от болезней, включая твердую головню *Tilletia caries* и *T. levis*. Известно, что метод применения протравителей семенного материала растений наносит урон окружающей среде, заражение пшеницы происходит во время прорастания, этому способствуют прохладные и влажные условия. Пораженные колосья легковесные, не понижают, имеют серовато-фиолетовый оттенок, издадут сеledочный запах. При посеве непротравленными семенами пшеница поражается головней до 10 % и более, что приводит не только к прямым потерям, но и заметному снижению качеству зерна. Из-за токсических свойств спор головни, содержащих алкалоид триметиламин, головня негативно влияет на здоровье человека и сельскохозяйственных животных. Сильно заспореное зерно нельзя использовать для приготовления продуктов питания и комбикормов для животных.

Поскольку синтетические химические препараты запрещены в органическом сельском хозяйстве, твердая головня является серьезной угрозой для производства органической пшеницы и для семеноводства В постановлении Комиссии (ЕС) № 1452/2003, указывается, что, начиная с 2004 г. весь растительный материал, используемый для органического земледелия, должен производиться без химических обработок.

В производстве практически отсутствуют устойчивые к твердой головне сорта пшеницы. Создание устойчивых сортов пшеницы обеспечивает стабильность производства, особенно в годы эпифитотии, также обеспечивает качество, себестоимость и в полевых условиях обеспечивает санитарно-эпидемиологическую безопасность.

Методы ДНК-генотипирования и селекции при помощи молекулярных маркеров (MAS) позволяют ускорить перенос хозяйственно ценных генов и локусов количественных признаков в процессе селекции и обеспечить создание новых сортов с целым комплексом полезных свойств.

Известен способ создания линий пшеницы, устойчивых к твердой головне, в условиях, адаптированных к почвенно-климатическим условиям юго-востока Казахстана, гексаплоидных синтетических линий пшеницы SYNT-JAPAN и SYNT-ELITE в период с 2014 по 2017 годы, включающий фитопатологические и селекционные исследования с созданием коллекции из 30 линий, устойчивых к твердой головне и имеющих высокую урожайность. Указанные гексаплоидные

синтетические линии пшеницы скрещивали с высокоурожайным отечественным коммерческим сортом мягкой озимой пшеницы, в результате чего были получены гибриды F1, на которых проведены фитопатологические исследования. Далее, размножая их в полевых условиях, были получены поколения F2. При этом каждое растение поколения F2, сравнивали с родительскими формами, после чего были выбраны растения, устойчивые к болезням с доминантными источниками. В условиях искусственного заражения и размноженных в полевых условиях поколения F3 исследовали на устойчивость к болезни и изучали на следующем этапе (1).

Недостатки данного способа заключаются в следующем.

1. Длительность способа. В целом при использовании данного способа для создания устойчивых к твердой головне генотипов пшеницы затрачивается около 10 лет, поскольку каждое поколение после каждого беккросса необходимо проверять на признак устойчивости раз в год в полевых условиях.

2. Трудоемкость способа. Необходимо проводить от четырех и выше этапов скрещивания для получения устойчивых к болезни линий, чтобы избежать в дальнейшем расщепления на устойчивость.

Задачей предлагаемой полезной модели является разработка способа создания линий пшеницы, устойчивых к твердой головне, обеспечивающего сокращение длительности и трудоемкости процесса.

Поставленная техническая задача достигается предлагаемым способом создания линий пшеницы, устойчивых к твердой головне, включающем фитопатологическое исследование, скрещивание выявленных устойчивых образцов с неустойчивыми, в котором согласно полезной модели после инокуляции образцы пшеницы подвергают фитопатологическому скринингу полевой устойчивости к болезни, затем проводят молекулярный скрининг на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации носителей Vt-генов устойчивости к твердой головне, выявленные носители Vt-генов скрещивают с донорами высокой продуктивности образцов пшеницы, затем гибриды первого поколения F1 дважды беккроссируют и отбирают линии, несущие ДНК-маркеры к Vt -генам устойчивости, а потомство второго поколения F2 тестируют в полевых условиях на устойчивость к твердой головне пшеницы.

Преимуществом предлагаемого метода по сравнению с традиционным способом является то, что при использовании молекулярных маркеров на любом этапе селекционного процесса отслеживается наличие эффективных Vt-генов устойчивости к твердой головне, которые не зависят от условий выращивания и погодных условий, что, в конечном итоге, обеспечивает создание устойчивых к твердой головне образцов пшеницы.

Пример. Для определения устойчивости пшеницы к болезни, осуществляли инокуляцию образцов пшеницы твердой головней - *Tilletia caries* и *T. levis* путем заsporения семян сухими спорами из расчета 1 г спор на 100 г семян с последующим фитопатологическим анализом на искусственном инфекционном фоне по методу Кривченко. Оптимальная температура для прорастания спор головни и заражения всходов - в пределах 10-13°C. Для инокуляции использовали споры текущего года, которые хранили в прохладном помещении. Учет осуществляли путем подсчета больных и здоровых колосьев с вычислением процента поражения.

Лабораторный анализ включает выделение ДНК и ПЦР-анализ для выявления устойчивых Vt-генов у исследуемых образцов десяти коммерческих сортов пшеницы. Выделение геномной ДНК осуществляли из 5-дневных проростков пшеницы с помощью СТАВ-метода (фиг. 1).

Затем из проб ДНК пшеницы с добавлением компонентов реакционной ПЦР-смеси осуществляли ПЦР - анализ (полимеразная цепная реакция) с использованием разработанных для соответствующих Vt -генов протоколов (фиг. 2). Для идентификации носителей Vt-генов использованы STS маркеры. Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл dNTP (2,5 mM каждого нуклеотида), 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 18 мкл MQ-H2O. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК проводили электрофорез в 2 %-м агарозном или 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) в TBE-буфере (45 mM трис-борат, 1mM EDTA, pH 8). Амплификация проводилась в амплификаторе BioRad (TM100 Thermalcycler, Syngarore): начальная денатурация - 94°C в течение 5 мин; 45 циклов - 1 мин при 94°C; 1 мин - 45°C; 2 мин -72°C; финальная элонгация проводилась в течение 7 мин при 72°C.

Под действием электрического тока фрагменты ДНК продвигаются в геле от катода к аноду («от минуса к плюсу»), скорость их движения при этом обратно пропорциональна размерам (мелкие фрагменты проходят больший путь). Положение фрагментов в геле определяют по флуоресценции бромид аэтидия - интеркалирующего агента, встраивающегося между двумя цепями молекулы ДНК.

В результате ПЦР анализа выявлены сорта пшеницы Карасай, Султан - 95 и Алмалы, как носители наиболее эффективного гена устойчивости к твердой головне - Vt10. Эти сорта были подвергнуты гибридизации. Далее проводили скрещивание выявленных устойчивых сортов с высокоурожайными, но неустойчивыми к твердой головне образцами путем опыления кастрированных колосьев материнских форм с использованием твел - метода (метод Н. Борлауга).

Далее отобранные гибриды первого поколения - F1 беккроссировали двукратно исходным сортом,

потомство F2 тестировали с помощью ДНК маркера FSD/RSA к Vt генам устойчивости и отбирали линии, несущие ДНК маркер. В районе локализации Vt-генов расположено несколько молекулярных маркеров из которых наиболее оптимальным оказался маркер FSD/RSA (2, 3). Информация о последовательности нуклеотидов маркера приведена в таблице 1. Этот маркер использован для отбора носителей эффективного гена устойчивости к твердой головне Vt10. Основные этапы применения маркера FSD/RSA для отбора носителей устойчивости к твердой головне Vt10 представлены в таблице 2.

На заключительном этапе потомство F2 тестировали в полевых условиях на искусственном инфекционном фоне. Устойчивость оценивали трижды - начиная с молочной спелости до полной спелости зерна. Учет поражения растений проводили по шкале Кривченко. Линии, содержащие ДНК-маркеры для Vt10 гена, показали высокую устойчивость (0-5 %) к твердой головне.

В результате двухлетних генетико-селекционных и фитопатологических исследований при сочетании оценки экспериментального материала пшеницы на искусственном инфекционном фоне и молекулярного скрининга с использованием молекулярных маркеров нами получена новая линия пшеницы, характеризующая высокой устойчивостью к твердой головне, которая может быть использована в селекции устойчивости к твердой головне.

Таким образом, созданные предложенным способом линии могут пополнить генофонд пшеницы по Vt10 генам устойчивости и могут быть использованы в селекционных программах как доноры генов при создании устойчивых к болезням сортов пшеницы. Молекулярные ДНК-маркеры, подобранные к генам устойчивости, позволят отбирать линии, содержащие гены устойчивости, без проведения полевых тестов и, соответственно, сократить срок создания новых образцов пшеницы, устойчивых к твердой головне.

1. Куресбек А. Исследование новых доноров для повышения устойчивости мягкой пшеницы к твердой головне // диссертационная работа доктора философии (PhD) по специальности 6D081100 - Защита растений и карантин. Алматы. 2018 г. Стр 127.

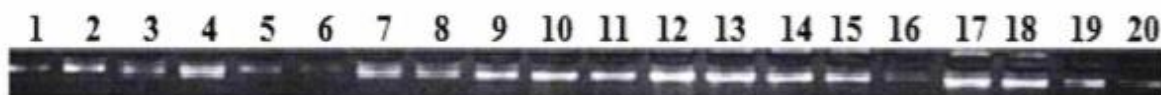
2. Goates B.J. Common bunt and dwarf bunt //In book: Wilcoxson R.D., Saari E.E. (eds.), Bunt and Smut Diseases of wheat: Concepts and methods of disease management // - Mexico, D.F.: CIMMYT, - 1996. - P.12-25.

3. Laroche, A., Demeke, T., Gaudet, D., Puchalski, B., Frick, M., and McKenzie, R. Development of a PCR marker for rapid identification of the Vt10 gene for common bunt resistance in wheat. Genome. - 2000. - Vol. 43. - P. 217-223.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Способ создания линий пшеницы, устойчивых к твердой головне, включающий фитопатологическое исследование, скрещивание выявленных устойчивых образцов с высокопродуктивными неустойчивыми, *отличающийся* тем, что после инокуляции образцы пшеницы подвергают фитопатологическому скринингу полевой устойчивости к болезни, затем проводят

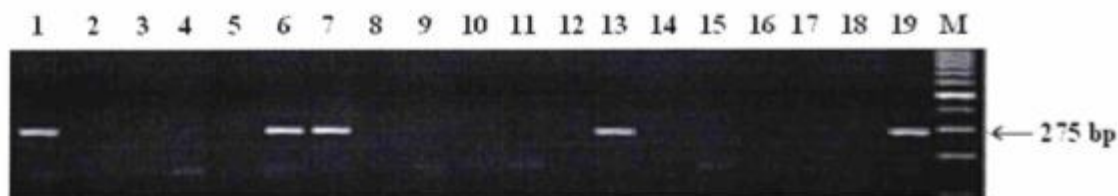
молекулярный скрининг на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) для идентификации носителей *Vt*-генов устойчивости к твердой головне, выявленные носители *Vt*-генов скрещивают с донорами высокой продуктивности образцов пшеницы, затем гибриды первого поколения F1 дважды беккроссируют и отбирают линии, несущие ДНК-маркеры к *Vt*-генам устойчивости, а потомство второго поколения F2 тестируют в полевых условиях на устойчивость к твердой головне пшеницы.



Фигура 1 - Проверка чистоты ДНК на 1% -агарозном геле

Таблица 1

| | |
|---|--|
| Название маркеров | FSD/RSA |
| Нуклеотидная последовательность праймеров | GTTTTATCTTTTATTTTC CTCCTCCCCCA |
| Условия реакции ПЦР | (4 мин при 94°C, 50 сек при 94°C, 50 сек при 42°C, 90 сек при 72°C, 7 мин при 72°C): 45 циклов |
| Размер продукта амплификации | 275 пар нуклеотидов |
| Условия проведения электрофореза | 2% агароза |



Фигура 2 - Идентификация гена *Vt10* с использованием маркера FSD/RSA

Таблица 2

| Название образца | Маркер <i>Bt10</i> FSD/RSA | Фитопатологическая оценка к твердой головне, % | |
|------------------|----------------------------|--|------------|
| | | 2018 г, F1 | 2019 г, F2 |
| 4 | присутствует | 0 | 0 |
| 16 | присутствует | 0 | 0 |
| 285 | присутствует | 2 | 3,5 |
| 290 | присутствует | 0 | 0 |
| 303 | отсутствует | 15 | 19 |
| 322 | присутствует | 2,8 | 4,3 |
| 323 | присутствует | 1,5 | 3,4 |