

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Кафедра Общего земледелия, Защиты растений и селекции

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
МАГИСТРА**

«ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОТИПОВ
ЯРОВОГО ЯЧМЕНЯ К ГОЛОВНЕВЫМ БОЛЕЗНЯМ»

Исполнитель – магистр заочного отделения
агрономического факультета

МАЛАФЕЕВА ЮЛИЯ ВИКТОРОВНА

Руководитель: профессор, д.с.-х.н.

Сафин Р.И.

Допущена к защите: зав. кафедрой,
профессор, д.с.-х.н.

Сафин Р.И.

Казань – 2018 г

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
II. УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.	15
2.1. Методика ПЦР.....	15
2.2. Методика анализов, учетов и наблюдений.....	24
III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	27
3.1. Распределение генотипов по устойчивости по результатам ПЦР	27
3.2. Полевая оценка генотипов.....	34
ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ.	35
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	36
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	41

Актуальность темы. Яровой ячмень относится к числу наиболее древних зерновых злаковых культур и сохраняет свое значение как для РФ, так и для Республики Татарстан. Наиболее широкое распространение в Татарстане данная культура получила при возделывании на зернофуражные цели. Одной из основных причин недостаточной реализации потенциала продуктивности современных генотипов ячменя остается развитие на них большого количества различных заболеваний. Наряду с различными видами гельминтоспориозных микозов (сетчатого, бурого, полосатого), карликовой ржавчиной и мучнистой росой, сохраняют свою опасность и головневые болезни – пыльная, каменная и черная. В контроле головневых инфекций в современных технологиях возделывания культуры решающее место занимают химические протравители семян, эффективность использования которых достаточно высока. Вместе с тем, широкое развитие у патогенов резистентности к триазольным протравителям, в сочетании с необходимостью производства органических продуктов, где использование пестицидов запрещено, а также отсутствия эффективности против головневых болезней у биопрепаратов диктует необходимость в разработке альтернативных систем контроля данных микозов. Основным направлением при этом остается селекционный метод защиты, т.е. поиск генотипов с максимальной устойчивостью к данным болезням. Для достижения данной цели все большее распространение приобретают молекулярно-генетические методы анализа генотипов.

В связи с этим, изучение особенностей устойчивости генотипов ярового ячменя к головневым болезням имеет большую теоретическую и прикладную значимость.

Цель исследований – изучение устойчивости различных генотипов ярового ячменя к заболеваниям типа головни.

Задачи исследований:

- изучить методами ПЦР с применением специфических праймеров генотипы ярового ячменя на наличие генов устойчивости к различным расам головневых грибов;
- дать полевую оценку устойчивости генотипов к головневым болезням.

Научная новизна. Впервые в зоне проведения исследований рассмотрены возможности использования молекулярно-генетических методов анализа генотипов ярового ячменя на устойчивость к головневым болезням.

Положения, выносимые на защиту:

1. результаты оценки устойчивости генотипов ярового ячменя к головневым патогенам;
2. использование методов ПЦР для оценки устойчивости генотипов в селекционной работе.

Практическая значимость. Разработанные приемы позволяют проводить оценку и отбора генотипов на ранних этапах селекционного процесса.

Объем работы. ВКР изложена на 41 страницах компьютерного текста, состоит из введения, трех глав, выводов и предложений производству, включает 7 таблиц, 7 рисунка, 1 приложение. Список литературы состоит из 38 наименований, в том числе 24 иностранных авторов.

Род *Hordeum* включает 31 вид, включая диплоидные ($2n = 2x = 14$), тетраплоидные ($2n = 4x = 28$) и гексаплоидные ($2n = 6x = 42$) формы (von Bothmer, Komatsuda, 2011), и все виды могут быть классифицированы в четырех различных гапломах, основанных на мейотической хромосомной поведении в межвидовых гибридах (Blattner, 2009).

Культурный ячмень (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.) ($2n = 2 \times 7 = 14$) возник от своего дикого прародителя (*Hordeum vulgare* ssp. *spontaneum* C. Koch.) и используется, в основном в мировом растениеводстве, для кормление животных и получения солода (Борисонник, 1974). Ячмень был одним из первых одомашненных зерновых культур, наряду с пшеницей двузернянкой в районе Плодородного Полумесяца Ближнего Востока. Из археологических свидетельств самые ранние остатки зерен ячменя датируются 10 000 лет назад (Badr et al., 2000). Этот злак – один из главных для сельского хозяйства Евразии с неолитических времен, имеющий способность к отличной адаптации к различным агроэкологическим условиям (Григорьев, 2015), именно поэтому ячмень является четвертой по важности зерновой культурой после кукурузы, риса и пшеницы (Mayer et al., 2012).

В качестве универсальной и высококачественной кормовой культуры зерно ячменя обычно используется в рационе сельскохозяйственных животных, таких как крупный рогатый скот, птица и свиньи (Blake et al., 2011). Зерно ячменя обычно содержит большое количество растворимого волокна, называемое бета-глюканом (β -глюкан), которое может связывать воду в кишечнике и увеличивать вязкость дигеста, тем самым влияя на поглощение питательных веществ. β -глюкан может быть гидролизован двумя целлюлазами: 1,3-1,4- β -глюканазой и 1,4- β -глюканазой (Fernandes et al., 2016). Исследования показали, что добавление ферментов, таких как 1,3-1,4- β -глюканаза, для расщепления смешанного связанного β -глюкана имеет положительные

результаты в отношении рациона на основе ячменя, эффективно снижая степень полимеризации (Ribeiro et al., 2012).

Культурный ячмень классифицируется в зависимости от расположения колосков в колосе на двух-(distichum) и шестирядный (vulgare), что накладывает отпечаток на его использование в качестве пищи, зернофуража или сырья для пивоварения. На территории Республики Татарстан в основном выращивается двурядный ячмень.

Российская Федерация – крупнейший производитель зерна ячменя в мире (рис. 1).

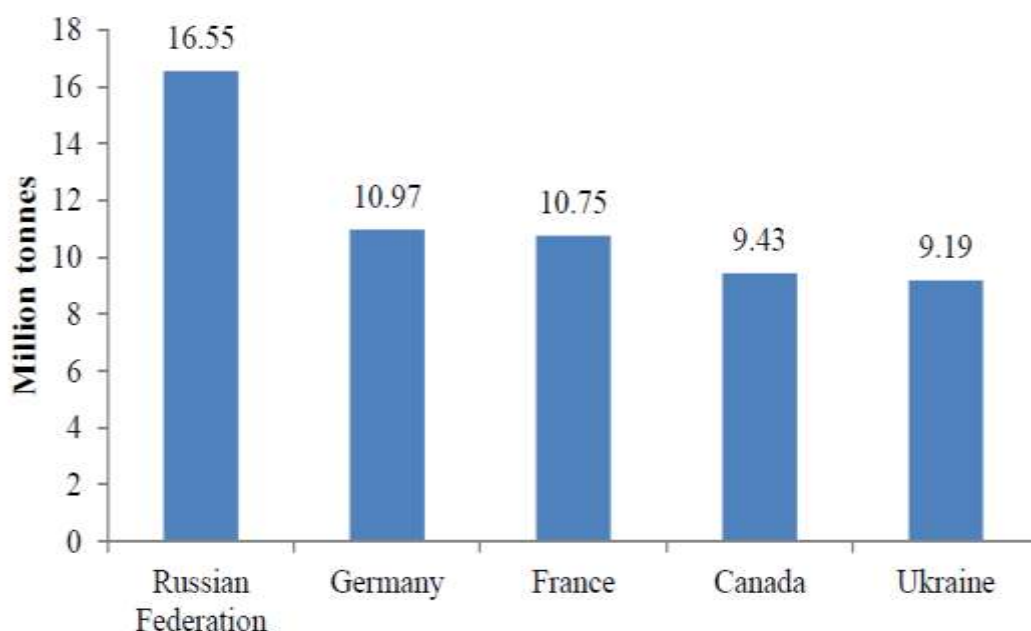


Рис. 1 – Объемы производства зерна ячменя в пяти наиболее крупных производителей по данным ФАО ООН за 2005-2014 гг.

Значительное место ячмень занимает и в структуре экспорта зерна из России (2,86 млн. т в 2016 году). В Республике Татарстан в 2016 году посевные площади культуры составили 370 тыс. га, уступая только площади посева яровой пшеницы. При этом урожайность ярового ячменя достигла 2,62 т/га, против 2,18 т/га у яровой пшеницы, что подтверждает более высокую пластичность культуры и высокую ее адаптивную способность (Глуховцев, 2001).

Вместе с тем, урожайность ярового ячменя в РФ и РТ значительно ниже возможно уровня, что в том числе связано и с большими потерями урожая от болезней.

В мире и в РФ яровой ячмень поражается целым рядом вредоносных болезней, таких как сетчатая пятнистость (*Pyrenophora teres* Drechs.), темно-бурая пятнистость (*Cochliobolus sativus* (S. Ito & Kurib.) Drechsler ex Dastur), фузариоз колоса (*Fusarium graminearum* Schwabe), мучнистая роса (*Blumeria graminis* (DC) Speer f. sp. *hordei* EM. Marchal), стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis* Pers.: Pers. f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. и *Puccinia graminis* Pers.: Pers. f. sp. *secalis* Eriks. & E. Henn.), ринхоспориоз (*Rhynchosporium commune* (Oudem.) JJ Davis) и другими. К числу распространенных и вредоносных болезней ярового ячменя относятся головневые заболевания – твердая (каменная), ложная пыльная головня и пыльная головня, вызываемая соответственно базидиальными грибами *Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh (*U. hordei*), *Ustilago nigra* Tapke (*U. nigra*), and *Ustilago nuda* (Jens.) Rostr (*U. nuda*).

Потери урожая, вызванные развитием головневых грибов, прямо пропорциональны проценту зараженных колосьев, в которых зерна будут полностью заменены телиоспорами гриба (Thomas, 1997). В течение длительного времени головня вызвали большие потери при производстве ячменя, но с развитием обработка семян системными фунгицидами (Степановский, 1998) и использования устойчивых сортов вредоносность данных заболеваний резко снизилась (Menzies et al., 2014). Вместе с тем, развитие резистентности патогенов к триазолом и увеличение доли посевов ячменя выращиваемых по принципам органического производства вновь обострили интерес к изучению данных заболеваний (Айдарова, 2009).

***Ustilago nuda* (Jens.) Rostr**

Жизненный цикл возбудителя пыльной головни был подробно изучен. При прорастании мицелий присутствует внутри эмбриона и переходит в узел кущения у поверхности почвы, проникает в узел и затем входит в точку роста. Во время роста междоузлий процесс заражения продолжается от нижне-

го междоузлия к верхним. Как правило, грибок может проникать во все молодые ткани в колосе, за исключением стержня. По мере развития в колосе гифы патогена дифференцируются и превращаются в массу телиоспор. Растущие массы телиоспор объединяются и колос полностью трансформируется в сухую, оливково-коричневую массу телиоспор, за исключением тонкой мембраны околоплодника, которая закрывает споры и разрывается вскоре после начала колошения. Телиоспоры рассеиваются и переносятся ветром на близлежащие открытые цветки ячменя. В результате, от колоса остается только голый стержень. Телиоспоры на зараженных колосьях прорастают в открытых цветках, а дикариотические заражающие гифы проникают через семязачаток, достигают развивающегося эмбриона, где сохраняются и сохраняются.



Рис. 2 – Растения ярового ячменя, пораженные *Ustilago nuda* (Jens.)

Rostr

***Ustilago hordei* (Pers.) Lagerh**

Развитие возбудителя начинается с момента прорастания телиоспоры на поверхности семян ячменя после посева. Практически сразу после посева происходит прорастание телиоспор. В результате двукратного деления образуется четырехклеточный промицелий с содержанием по одному ядру в клетке, от 24 до 29 мкм.

Споридии чаще всего одиночные, расположены на вершине и сбоку промицелия, у перегородок. Достигнув в длину 9,2 – 9,4 мкм, они отделяются от промицелия. Переход из гаплоидной фазы в дикариотическую осуществляется путем копуляции споридий, клеток одного или рядом расположенного промицелия при помощи мостика. Мейоз производят четыре базидиоспоры (споридии), в которых тип спаривания (MAT-1 и MAT-2) выделяется в соотношении 1: 1. Когда Споридии с противоположным типом спариванием оказываются в непосредственной близости, то образуется конъюгационные трубки которые сливаются с образованием инфекционного дикариотического мицелия.

Дикариотические гифы инфицируют coleoptile, реже другие части проростка. Прорастание зерновок стимулирует прорастание окружающих их телиоспор.

Наиболее благоприятный период для заражения ячменя – первые восемь суток после начала прорастания семян (Степановских, 1990).

Достигнув колоса, патоген разрушает его, превращая все части в черную массу телиоспор образующих твердые скопления, отчего данный вид головни получил название «каменная» или твердая.



Рис. 3 – Растения ярового ячменя, пораженные *Ustilago hordei* (Pers.)
Lagerh

Генетика устойчивости ярового ячменя к головневым болезням

Геном ячменя (НН, $2n = 2x = 14$) является одним из крупнейших геномов культивируемых растения с размером 4873 Мб на гаплоидное ядро. Сравнительные исследования генетических карт пшеницы, ржи и ячменя показало, что порядок локусов в хромосомах в этих культурах очень похоже, что отражает общее эволюционные связи между данными видами культурных злаков.

Существенный интерес при анализе генома растений представляет изучение доминантных генов устойчивости к инфекционным болезням – R-гены.

В таблице 1 представлен каталог R-гены ячменя к инфекционным заболеваниям.

Таблица 1 – Символы основных генов устойчивости (R) ячменя против патогенных микромицетов (по Chelkowski, 2003)

Символ	Патоген	Общее количество генов
<i>Rph</i>	<i>Puccinia hordei</i>	17
<i>Rpg</i>	<i>Puccinia graminis</i>	4
<i>Rps</i>	<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>hordei</i>	4
<i>MI (Reg)</i>	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	4
<i>Rcs</i>	<i>Cochliobolus sativus</i>	23
<i>Rpt</i>	<i>Pyrenophora teres</i>	5
<i>Rdg(Rhg)</i>	<i>Pyrenophora graminea</i>	6
<i>Rrs (Rh)</i>	<i>Rhynchosporium secalis</i>	3
<i>Run (Un)</i>	<i>Ustilago nuda</i>	15
<i>Ung</i>	<i>Ustilago nigra</i>	8
<i>Ruh</i>	<i>Ustilago hordei</i>	1

Гены вертикальной устойчивости к болезням (R-гены) обычно относят к следующим классам: 1. внутриклеточные протеинкиназы; 2. рецептор-подобные протеинкиназы, содержащие богатые лейцином повторы (LRR); 3. внутриклеточные LLR белки, содержащие сайт связывания с нуклеотидами (NBS) и мотив «лейциновая молния» (LZ); 4. внутриклеточные NBS-LRR белки, несущие домен; LLR белки, обеспечивающие связывание с мембраной внеклеточных белков (Bouzidi et al. 2002). Особое интерес представляет изучение R-гены четвертого класса, т.к. сохранение между различными генами устойчивости NBS-LRR открывает возможность для использования стратегий полимеразной цепной реакции (ПЦР) для выделения и клонирования других членов семейства R-генов или аналогов с использованием дегенеративных или специфических праймеры для этих консервативных регионов (YU et al. 2000).

Гены устойчивости к *Ustilago nuda*

Первый ген устойчивости *Run (Un)* был обнаружен у ячменя сорта «Trebi» в 1940-х годах в Северной Америке. С тех пор с тех пор идентифицировано в общей сложности 15 генов устойчивости (Mueller, 2006). Среди этих генов устойчивости ген Un8, является наиболее эффективным и долговечным устойчивостью, эффективной против всех известных изолятов пыльной головки ячменя (Thomas and Menzies 1997).

Селекция на устойчивость ярового ячменя к головневым болезням

Создание устойчивых сортов – один из основных приемов интегрированных систем защиты, поэтому развитие данного направления имеет важное значение. Значение сорта в контроле головневых болезней подтверждено в многих исследованиях (Бадина, 1981; Неттевич и др., 1984; Кирдогло, 1990; Неттевич и др., 1998; Сурин, 2011; Жичкина, 2014; Лоскутов и др., 2014; Бехтольд и др., 2015). Для более успешной селекции на устойчивость необходимо использование новых подходов к отбору исходного материала, в том числе на основе молекулярно-генетических методов (Бабкенова, 2015).

Отбор на основе молекулярных маркеров или маркер-ориентированная селекция (Molecular marker-assisted selection - MMAS) – это отбор исходного материала на основе генотипа, используемый для ускорения создания сортов в программе селекции. Этот метод позволяет выбирать для признаков с высокой наследственностью в ранних поколениях и ранжировать несколько желательных генов вместе в один генотип при минимальных затратах (Miedaner и Korzun 2012). С помощью MMAS выбор желаемых линий не зависит от крупномасштабных фенотипических тестов, когда молекулярные маркеры устанавливаются для интересующих признаков. MMAS также может быть успешно применен в нескольких беккроссах (Xu and Crouch, 2008).

Во многих исследованиях были предприняты попытки разработать молекулярные маркеры генов устойчивости ячменя к наиболее опасным патогенам: вирусу желтой мозаики ячменя (Tyrka et al., 2008; Sedlacek et al., 2010),

листовая ржавчина (Sedlacek and Stemberkova 2010), сетчатой пятнистость (Keiper et al. 2008), мучнистой росе (Repkova et al., 2009; Sedlacek and Stemberkova 2010).

В селекции ячменя было использовано примерно 50 генов для MMAS, особенно успешными оказались работы по гену *Rpg1* к стеблевой ржавчине (Steffenson and Smith 2006), устойчивостью к мучнистой росе (Miedaner and Korzun 2012), гену *gym4* / *gym5* к вирусной мозаике (Miedaner и Korzun 2012).

Использование MMAS для защиты от пыльной головки — один из лучших примеров того, как маркеры могут повысить эффективность селекционного процесса. Первоначально Un8 был нанесен на длинное плечо хромосомы 5 ячменя (1HL) в связи с маркером RFLP ABC 261 (Eckstein et al., 1993). Впоследствии для Un8 были разработаны маркеры микросателлитов (Li et al., 2001) и последовательности, характеризующиеся амплифицированной областью (SCAR) (Eckstein et al., 2002).

Последние достижения в секвенировании генома ячменя дали возможность идентифицировать новые молекулярные маркеры тесно связанные с геном Un8.

Принципы метода ПЦР для анализа геномов

Принцип реакции ПЦР может быть обобщен как репликация *in vitro* малых фрагментов ДНК-матрицы до желаемого размера (<10 кб). ДНК-продукт, полученный после ПЦР известен как ампликоны. Ампликоны увеличены по экспоненте по завершении каждого цикла. Он включает разделение двух противоположных нитей ДНК посредством тепловой денатурации ферментативного разматывания происходит в клетках. Пара мелких одноцепочечных фрагментов ДНК (праймер) в противоположном направлении друг к другу и комплементарные матричной ДНК в реакции, которая действует как субстрат для добавления ряда нуклеотидов фосфодиэфиром склеивание. И этому спо-

способствует использованию термостабильной ДНК-полимеразы Taq в реакции. Добавление нуклеотида происходит в 3'-ОН-группе праймера. На практике все компоненты реакции собирают на льду и добавляют один за другим. Как правило, полимеразу добавляют при последнем и конечном объеме реакции сделанные удвоенной дистиллированной водой. Немедленно реакции переносятся на термоциклером для запуска реакций. Идеальная реакция ПЦР включает три этапа; денатурация, отжиг и расширение праймера.

1. Температура и продолжительность денатурации: начальная денатурация при 95 ° С в течение 3-10 минут рекомендуется перед циклом ПЦР до полной денатурации ДНК. Впоследствии 10-30 мин второй из денатурации при такой же температуре является достаточным в начале цикла.

2. Температура и продолжительность отжига: при этой температуре оба праймера отжигают до комплементарной последовательности в матричной ДНК. Температура оптимального отжига составляет 5° С ниже температуры, чем основа с наименьшей температурой плавления (T_m) и разница между T_m обоих основ должна быть не более 5 ° С.

3. Температура и продолжительность расширения: Расширения обычно выполняются при 72 ° С. При такой температуре, нуклеотиды добавляются в конце 3'-ОН с помощью ДНК Taq полимеразы и удлиненной до желаемой длины. Как правило, для расширения 1000 оснований достаточно одной минуты (например, 2 минуты для продукта 2 кБ). Для изделий менее 1 кб, Рекомендуется 45-60 секунд. Продукция более 3 кб, практически трудно усилить используя обычную ДНК-полимеразу Taq. Специальный вид ферментов с высокой степенью полимеризации являются обязательным.

Анализ литературного материала доказал необходимость в проведении оценки различных генотипов ярового ячменя на устойчивость к головневым болезням в условиях Республики Татарстан.

II. УСЛОВИЯ И МЕТОДИКА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Методика ПЦР

Выделение ДНК

Проращивание семян проводится на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, при температуре 25-27°C в термостате в течение 5-7 суток.

Выделяют ДНК из навески проростков, которая растирается пестиком до образования однородной суспензии с добавлением 400 мкл буфера для лизирующего реагента и 17 мкл лизирующего реагента. Затем инкубируют пробирки при температуре 64°C в течение 1 ч, периодически встряхивая на вортексе. Потом осаждают центрифугированием и надосадочную жидкость отбирают отдельным наконечником добавляют по 25 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешивают на вортексе и оставляют в штативе на 10-15 мин, перемешивая через каждые 2 мин. Затем вновь осаждают сорбент центрифугированием и удаляют надосадочную жидкость. Образовавшийся осадок промывается в два этапа:

1. С добавлением 300 мкл раствора для отмывки 1, центрифугированием в течение 1 минуты при 5000 об/мин и удалением жидкой фазы;
2. С добавлением 500 мкл раствора для отмывки 2, центрифугированием и удалением жидкой фазы (повторить процедуру отмывки).

После отмывки пробирки помещают в термостат при температуре 64°C на 5-10 мин для подсушивания сорбента универсального. В пробирки добавляют по 50 мкл ТЕ-буфера для эволюции ДНК. Помещают в термостат на 5-8 мин, периодически перемешивая на вортексе. Центрифугируют и отбирают надосадочную жидкость, где содержится очищенная ДНК.

Проведение полимеразной цепной реакции

Определение количество образца из обработанной клинической пробы переносится в специальную микроцентрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 0,2 или 0,5 мл. В эту же пробирку добавляется амплификационная

смесь, состоящая из воды, ПЦР-полимеразы (добавляется в смесь в последнюю очередь). Как правило, объем реакционной смеси составляет 25 мкл. Пробирки переносятся в программируемый термостат (амплификатор) и проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе. Время проведения реакции в зависимости от заданной программы составляет 2-3 часа.

Регистрация результатов

Амплифицированный специфический фрагмент ДНК выявлялся методом электрофореза в агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение внедрения, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290-330 нм. В зависимости от размера образующих в результате ПЦР ампликонов используют гель с содержанием агарозы от 1,5% до 2,5%. Для приготовления агарозного геля расплавляют в СВЧ-печи или на водяной бане смесь агарозы, буфера и воды, добавляют раствор бромистого этидия. Охлажденную до 50-60°C смесь заливают в форму слоем толщиной 4-6 мм и с помощью специальных гребенок делают в геле карманы для нанесения образца. Гребенки устанавливают таким образом, чтобы между дном лунок и основанием геля оставался слой агарозы 0,5-1 мм. После застывания геля в карманы наносится амплификат в количестве 5-15 мкл. Рекомендуется параллельно с контрольными и опытными пробами проводить электрофорез смеси маркеров длин фрагментов ДНК. Гель с нанесением образцов переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером, камеру подключают к источнику питания и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в течении 30-45 мин при напряженности электрического поля 10-15 В/см. При этом фронт красителя, входящего в состав реакционной смеси должен пройти не менее 3 см.

После окончания электрофореза гель переносится на стекло трансиллюминатора и просматривают в ультрафиолетовом свете.

2.2. . Методика анализов, учетов и наблюдений

Материалом исследования служили перспективные сорта и сортообразцы из коллекционных и селекционных участков ТатНИИСХ. В качестве исследуемых образцов использовались 7-10 дневные проростки.

Экстракция геномной ДНК осуществлялась набором для выделения ДНК из растительного материала «ДНК-Сорб-С». Молекулярно-генетическая оценка образцов ячменя на предмет идентификации генотипов ярового ячменя, несущих гены устойчивости к пыльной и твердой головне, проводилась методами ПЦР с использованием соответствующих серий праймеров. Детекция результатов анализа проводилась методом горизонтального электрофореза с последующей визуализацией результатов в ультрафиолетовом трансллюминаторе. Размеры фрагментов ДНК оценивались по подвижности в сравнении со стандартными ДНК маркерами. В работе использовались продукты для молекулярно-биологических исследований производства ООО «СибЭнзим» (Россия).

Таблица 2. – Праймеры для идентификации гена устойчивости к пыльной головне.

Ген	Источник	Маркер	Праймеры для ПЦР-анализа	ПЦР продукт (п.н.)
Un8	Hordeum vulgare	Un8-700R	T800F4: 5'-TGCCACCAAGATGTCATGAAT-3' T800R: 5'- GAGTTCTAGCTTGACGAC- CAAACGATAC-3'	716
		Un8-700S	T800F4: 5'- TGCCACCAAGATGTCATGAAT-3' H700R: 5'- GTTCTAGCATGACGACCAAAAT-3'	714

Таблица 3 – Праймеры для идентификации гена устойчивости к твердой головне.

Ген	Источник	Маркер	Праймеры для ПЦР-анализа	ПЦР продукт (п.н.)
Run	Hordeum vulgare	UhR 450	ULR1-F: 5'-GATAAGGATGTTCCGCC-3' ULR-R: 5'-CCCGAGGTCCAAAATCAG-3'	716
		aHor2	KV1: 5'-CCACCATGAAGACCTTCCTC-3' KV9: 5'-TCGCAGGATCCTGTACAACG-3'	714

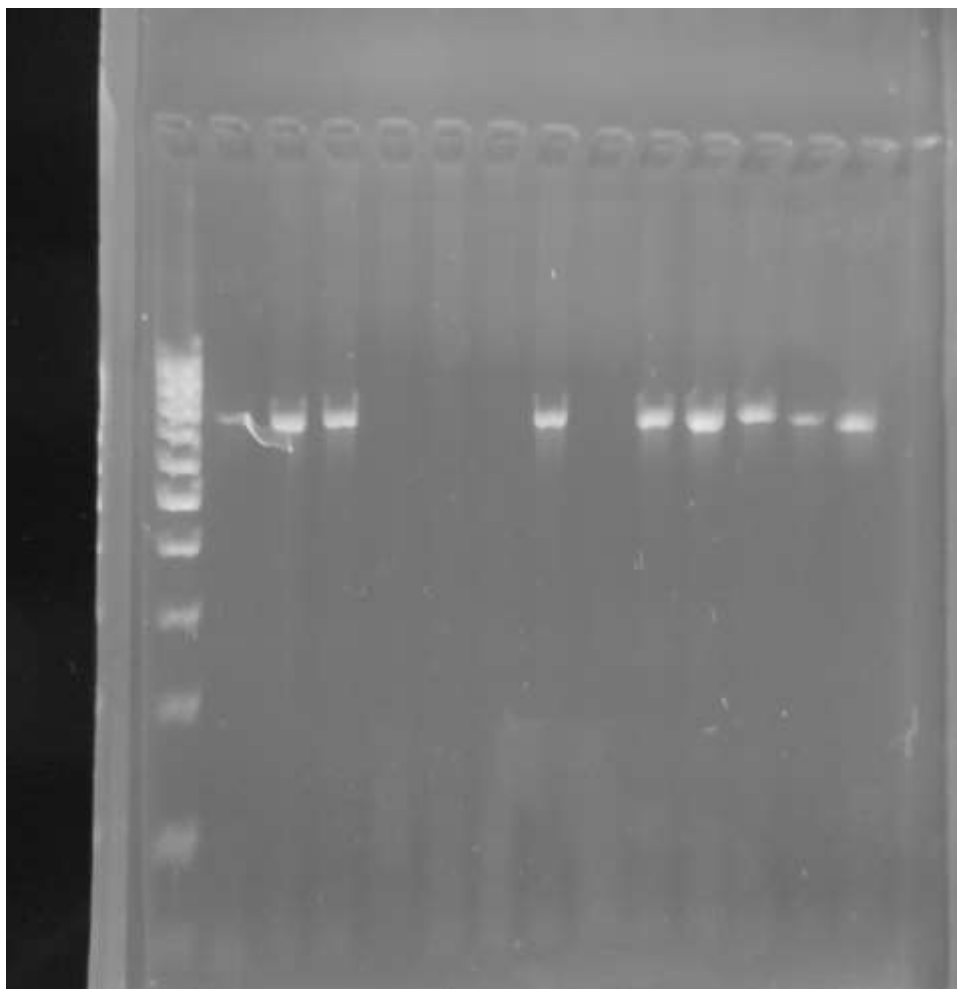


Рис. 3 – Результат анализа ПЦР на наличие генов устойчивости у генотипов ярового ячменя к твердой головне.

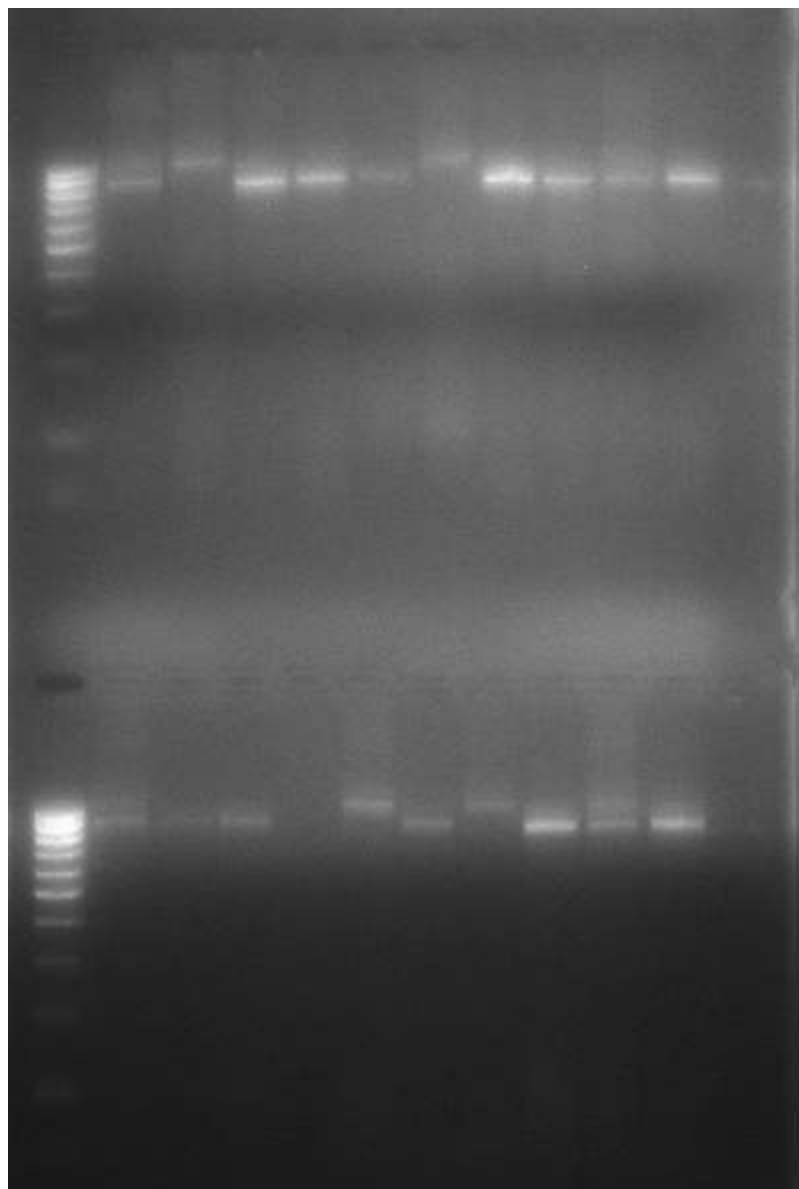


Рис. 3 – Результат анализа ПЦР на наличие генов устойчивости у генотипов ярового ячменя к пыльной головне.

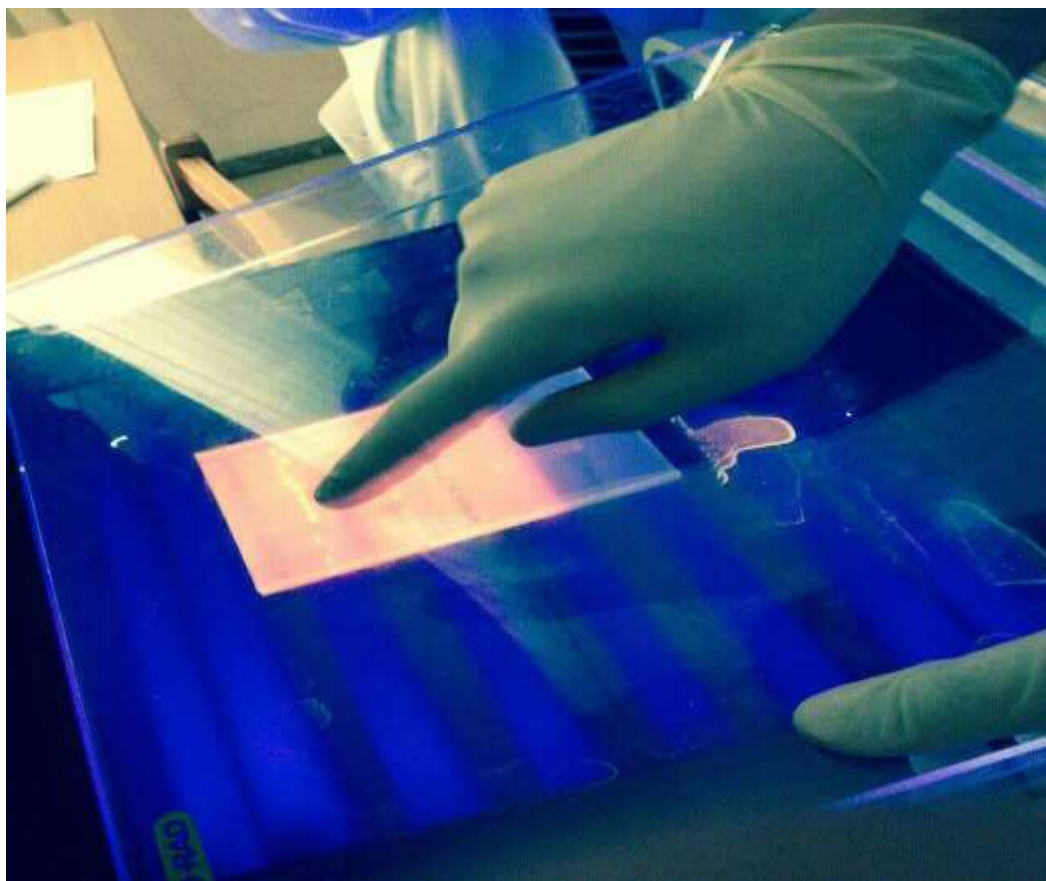


Рис. 4 – Просмотр результатов анализа



Рис. 5 – Оборудование для ПЦР в лаборатории ТАТНИИСХ





Рис. 6 – Оборудование для ПЦР в лаборатории ТАТНИИСХ

2.2. Методика анализов, учетов и наблюдений

Полевые опыты закладывались на полях отдела яровых зерновых, зернобобовых и крупяных культур Татарского НИИ сельского хозяйства. Почва опытного участка серая лесная, среднесуглинистого механического состава. Мощность пахотного слоя составляет 24-25 см. Агротехнические показатели имеют следующие значения: pH солевой вытяжки 5,7; гидролитическая кислотность 5,07 мг/экв.; сумма поглощенных оснований 20,78 мг/экв; степень насыщенности основаниями 80,3%; содержание гумуса (по Тюрину) – 3,35%; содержание P_2O_5 и K_2O (по Кирсанову) соответственно 28,0 и 16,7 на 100 г почвы; содержание легкогидролизуемого азота 26,08 на 100 г почвы.

Метеоусловия в период проведения исследований (2018 г.) характеризовались значительными отклонениями от средних многолетних данных (рис. 7). В мае погода была устойчиво теплой. Среднесуточная температура воздуха в первой декаде мая составила 12,6°C, во-второй – 13,5, в третьей – 14,3°C. Среднесуточная температура воздуха за месяц составила 13,3°C или на 29 % выше среднемноголетней. Сумма осадков за месяц составила 46 мм или это составляет всего 65,1 % от нормы. Сравнительно большее количество осадков выпало во 2-й декаде мая. В июне месяце в среднем за месяц среднесуточная температура воздуха была 16,7°C, что на 15% выше среднемноголетней. В целом за месяц выпало 39,0 мм осадков или 34 % от нормы, что не очень хорошо отразилось на развитии растений ярового ячменя. Температура воздуха в июле месяце была немного выше среднемноголетней температуре и составила в среднем 23,0°C. Осадков в течение месяца выпадало на 10 % меньше среднемноголетних. В августе среднесуточная температура воздуха была на уровне среднемноголетней и составила в среднем 19,4°C, а сумма осадков за месяц составила 13 мм, что на 44% меньше многолетних значений.

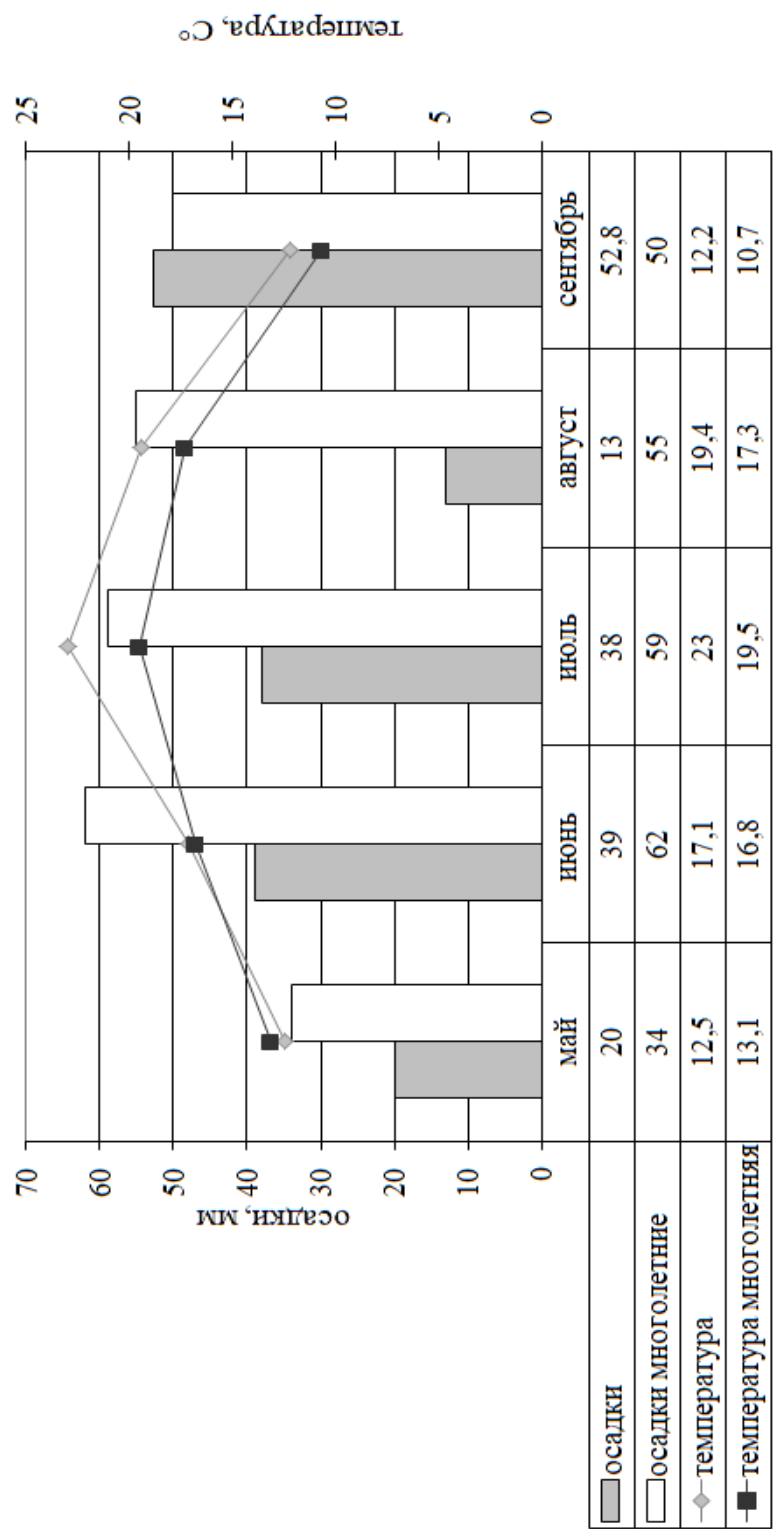


Рис. 7 – Агроклиматические условия вегетационного периода 2018 года (станция ТатНИИСХ)

Таким образом, погодные условия вегетационного периода 2018 года были не совсем благоприятными для нормального роста и развития ярового ячменя, что и отразилось на формировании урожая.

Материалом исследования служили перспективные сорта и сортообразцы из коллекционных и селекционных участков ТатНИИСХ. В качестве исследуемых образцов использовались 7-10 дневные проростки.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Распределение генотипов по устойчивости по результатам ПЦР

Результаты ПЦР на наличие R-генов устойчивости у изучаемых генотипов ярового ячменя отражены в таблице 4.

Таблица 4. – Результаты молекулярно-генетической оценки некоторых сортов ярового ячменя из коллекционного питомника ТатНИИСХ по главным генам устойчивости к пыльной и каменной головне

Сорт	Пыльная головня		Каменная головня	
	ген Un700-S	ген Un700-R	ген aHor2	ген Uhr450
Бота	-	-	R	-
Дина	-	-	S	R
Импульс	S	-	S	R
Мироновский 86	S	-	S	R
Беатрис	S	-	R	R
Идегей 21	S	-	S	-
BL 1215	-	-	R	R
Корнет	S	-	S	R
Вереск	-	-	S	R
Раушан	-	-	-	R
Нудум 95	-	-	-	R
Сталкер	S	-	R	-
Челябинский 99	S	-	-	R
Московский 3	-	-	R	R
Signal	-	-	R	R
Рубикон	-	-	R	R
МСХ-2	-	-	S	R

МСХ-4	-	-	-	-
Сонет	S	R	R	-
Волгарь	-	-	S	-
Московский 2	-	-	R	-
Рахат	S	-	S	R
Нур	-	-	S	-
BL -1602 мн.	S	-	S	R
Sid 878082	-	-	-	-
Симон	-	R	-	-
Зевс мн.	-	-	S	R
Камышинский 23	-	-	R	R
Адамс	-	-	-	R
Гасцинец	-	-	S	-
Сябра	-	-	-	R
Дивный	-	-	S	R
Айдас	-	-	-	R
К-6992	-	-	-	R
СДС Доли	-	-	-	-
Clandine	S	-	-	-
Waranda	-	-	-	-
Steffi	-	-	-	R
Nora	-	-	-	-
Лель мн.	-	-	-	-
Ronda	-	-	-	-
Asmen	-	-	-	-
Соболек мн.	-	-	-	-
WW 7428	-	-	-	-
HYSh 24306	-	-	-	-
Beras	-	-	-	-

Вадим	-	-	-	-
Steffi	-	-	-	-
Karin мн.	-	-	-	-
Гриф	-	-	-	-
Эльф	-	-	-	-
BL 934 мн.	-	-	-	R
GB – 001	-	-	-	-
Karsburg	-	-	-	-
Winnipeg мн.	-	-	-	-
Duel мн.	-	-	-	-
Akka	-	-	-	-
Adora	-	-	-	-
Криничный	-	-	-	-
Ceriy	-	-	-	R
Cerkka	-	-	-	-
Karina	-	R	-	-
Kran Pajberg	-	-	-	R
Kork	-	-	-	R
Landia	-	-	-	R
Битрана	-	-	-	R
O'Connor	S	-	-	R
Новосадски 448	S	-	-	-
K-17	S	-	-	-
Ясный	S	R	-	R
Зазерский 85	S	R	-	-
Андрей	S	-	S	-
Вятский	S	-	R	-
Колизей	S	-	R	-
Волга	-	-	S	-

Харьковский 102	S	-	R	-
-----------------	---	---	---	---

Примечание:

- - отсутствие гена

R - ген устойчивости

S- ген восприимчивости

В процессе проводимых исследований было протестировано 76 сортов, отобранных на опытных участках ТатНИИСХ, с двумя маркерами устойчивости к пыльной головне (Un8-700R и Un8-700S) и двумя маркерами устойчивости к каменной головне (aHor2 и Uhr450).

Сравнительный анализ результатов амплификации ДНК показал, что аллель гена устойчивости к каменной головне aHor2 присутствует у 17,1% исследуемых сортов, а 21,0% сортов показали наличие аллеля гена восприимчивости к каменной головне. Что касается использования маркеров для выявления аллеля гена Uhr450, то в этом случае было выявлено значительно большее количество устойчивых к каменной головне сортов – 42,1% исследуемых образцов.

При проведении реакции на выявление гена Un8, 26,3% сортов показали присутствие в геноме гена восприимчивости к этой болезни, при этом ген устойчивости был показан только в пяти случаях из 76, что составило 6,8%.

В таблице 5 представлены результаты оценки перспективных линий ярового ячменя.

В результате ПЦР анализа, не было обнаружено сортолиний, имеющих в геноме главные гены устойчивости как к пыльной, так и к каменной головне. Однако, полученные данные позволяют сделать вывод о целесообразности применения данного метода, позволяющего проводить отбор линий на молекулярно-генетическом уровне, что будет способствовать значительному ускорению селекционного процесса.

Таблица 5. Молекулярно-генетическая оценка некоторых перспективных линий ярового ячменя из селекционного питомника ТатНИИСХ по генам устойчивости к пыльной и каменной головне

Сортолиния	Пыльная головня	Каменная головня
К-429-12	S	S
44-00	-	S
К-269-12	-	R
К-262-12	-	S
К-622-12	-	S
К-580-12	-	S
К-267-12	-	S
К-37-13	R	S
К-19-14	-	R
К-23-13	-	S
К-12-14	R	S
К-295-12	S	S
К-561-13	S	S
К-51-12	-	S
К-5-14	S	S
40-00	-	R
К-30-14	S	S
К-136-08	-	S

Примечание:

- - отсутствие гена

R - ген устойчивости

S- ген восприимчивости

Учитывая, что кроме уже протестированных, существует целый ряд разработанных генов-маркеров, позволяющих определить наличие или отсутствие желаемых генов в геноме сортов и линий ячменя, рекомендуется продолжить расширенное исследование с использованием других маркеров для получения достоверных результатов.

Значительный интерес представляет оценка влияния родительских форм на устойчивость линий к головне (табл. 6).

Таблица 6. – Устойчивость и восприимчивость к твердой и пыльной головне линий ярового ячменя и их родительских форм

Болезнь	Исследуемые образцы		
	Линии	Родительские формы	
	К-429-12	Каштан	Московский 2
Твердая головня	S	R	-
Пыльная головня	S	S	S

Болезнь	Исследуемые образцы		
	Линии	Родительские формы	
	К-30-14	Одесский 163	Омский 83 x Roland
Твердая головня	S	S	-
Пыльная головня	S	R	R

Устойчивость	Исследуемые образцы		
	Линии	Родительские формы	
	К-37-13	Виконт	Омский 87
Твердая головня	S	-	S
Пыльная головня	R	R	R

Результаты оценки показали, что наследование устойчивости и восприимчивости к головневым болезням ячменя носит сложный характер. Так у линии К-429-12 отмечается восприимчивость к твердой головне, тогда как у

родительских форм отмечается устойчивость (Каштан) или отсутствие генов устойчивости (Московский 2).

Для линии К-30-14 по отношению к пыльной головне проявился интересный эффект – у обоих родительских форм отмечается устойчивость, тогда как у линии наблюдается восприимчивость к микозу.

У линии К-37-13 наблюдается полное совпадение устойчивости к обоим видам головни с устойчивостью родительских форм.

Выявленные закономерности позволяют говорить о необходимости более детального изучения наследования признаков устойчивости или восприимчивости ярового ячменя к головневым болезням.

3.2. Полевая оценка генотипов

Данные по урожайности линий ярового ячменя представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Урожайность линий ярового ячменя в полевых условиях, т/га, 2018 г

Линия	Урожайность, т/га	Устойчивость к пыльной головне	Устойчивость к твердой головне
К-269-12	4,83	-	R
К-295-12	5,15	S	S
К-429-12	5,09	S	S
К-622-12	4,73	-	S
К-23-13	4,89	-	S
К-561-13	4,95	S	S
К-19-14	5,17	-	R
К-30-14	5,89	S	S
НСР ₀₅	1,75		

Результаты оценки позволили выделить перспективные линии по урожайности К-30-14, К-295-12 и К-19-14. При этом первые две линии были вос-

приимчивыми к обоим головневым заболеваниям, тогда как у третьей линии имелись гены устойчивости к твердой головне.

Таким образом, проведенный анализ позволяет сделать предварительный вывод о том, что гены устойчивости к головне и продуктивность ярового ячменя не связаны напрямую. Причиной этого, по всей видимости, является то, что урожайность зерновых культур, в том числе и ярового ячменя контролируется большим количеством генов и связана с локусами количественных признаков – QTL (англ. quantitative trait loci). Данный подход особенно важен в маркер-ориентированной селекции (Molecular marker-assisted selection - MMAS)

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие предварительные выводы:

1. ПЦР анализ генов устойчивости к головневым болезням ярового ячменя позволяет выделить ценные источники устойчивости как среди сортов, так и сортолиний. Среди изученных генотипов ярового ячменя отсутствуют источники устойчивости к обоим типам головни.
2. Наследование устойчивости к головневым микозам носит сложный характер.
3. Наличие генов устойчивости к головне и продуктивность ярового ячменя не связаны на прямую.

ПРЕДЛОЖЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВУ

Использовать методы маркер-ориентированной селекции (Molecular marker-assisted selection - MMAS) в селекции ярового ячменя на устойчивость к головневым болезням.

.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айдарова Н. С. Головневые болезни ярового ячменя в условиях нижнего Поволжья и меры борьбы с ними: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.01.11. / Айдарова Надежда Сергеевна – Саратов, 2009. – 20 с.
2. Бабкенова С. А. Изучение сортообразцов ярового ячменя на устойчивость к головневым заболеваниям в условиях Северного Казахстана / С.А. Бабкенова // Селекция, семеноводство и производство зернофуражных культур для обеспечения импортозамещения: материалы координационного совещания по селекции, семеноводству, технологии возделывания и переработке зернофуражных культур (27-31 июля 2015г., г. Тюмень). – Тюмень, 2015. – С. 16-18.
3. Бадина Г. В. Повышение устойчивости ячменя к пыльной головне методом гибридизации / Г.В. Бадина, Л.В. Иванова // Проблемы и пути повышения устойчивости растений к болезням и экстремальным условиям среды в связи с задачами селекции: тез. докл. Всесоюз. конф. – Л., 1981. – ч. 3. – С. 128-129.
4. Бехтольд Н.П. Оценка ярового ячменя отечественной селекции на устойчивость к пыльной и твердой головне / Н.П. Бехтольд, Е.А. Орлова // Актуальные направления сельскохозяйственной науки в работах молодых ученых: материалы науч. - метод. конф. (АНИИСХ, 9-10 июля 2015.). – Барнаул, 2015. – С. 14 – 12.
5. Борисонник З. Б. Ячмень яровой / З.Б. Борисонник. – М.: Колос, 1974. – 255 с.
6. Глуховцев В. В. Яровой ячмень в Среднем Поволжье (селекция, агротехника, сорта) / В.В. Глуховцев. – Самара: Поволжский НИИ селекции и семеноводства, 2001. – 151 с.
7. Жичкина Л. Н. Устойчивость сортов ячменя к каменной головне в лесостепи Заволжья / Л.Н. Жичкина // Аграрная наука – сельскому хозяйству:

материалы IX Международной научно-практической конференции. – Барнаул, 2014. – С. 92-93.

8. Кирдогло Е. К. Селекция ячменя на устойчивость к головневым и листостебельным заболеваниям / Е.К. Кирдогло // Селекция ячменя на повышение адаптивности с целью увеличения и стабилизации урожая: сб. науч. тр. – Одесса ВСГИ, 1990. – С. 69 - 77.

9. Лоскутов И. Г. Генетические ресурсы культурного ячменя и овса для селекции / И.Г. Лоскутов, О.Н. Ковалева, Е.В. Блинова // Достижения и перспективы развития аграрной науки в области земледелия и растениеводства: сборник пленарн. докл. Междунар. науч.- практ. конфер., посвящ. 80-летию Казахского научно-исслед. института земледелия и растениеводства. – Алмалыбак, 2014. – С. 127-132.

10. Неттевич Э. Д. Селекционно-генетическая ценность различных источников устойчивости ярового ячменя к пыльной головне в Нечерноземной зоне РСФСР / Э.Д. Неттевич, А.В. Макарычев, Л.А. Марченкова: доклады ВАСХНИЛ. – М., 1984. – № 4. – С. 3-5.

11. Неттевич Э. Д. Селекция ярового ячменя в Центральном регионе России на устойчивость к пыльной головне / Э.Д. Неттевич, В.П. Смолин // Новые методы селекции и создание адаптированных сортов сельскохозяйственных культур: результаты и перспективы. – Киров, 1998. – С. 152-153.

12. Степановских А. С. Головневые болезни ячменя / А. С. Степановских. – Челябинск: Юж. – Урал. кн. изд-во, 1990. – 440 с.

13. Степановских А. С. Защита посевов ячменя от головни / А. С. Степановских. – М.: Росагропромиздат, 1989. – 62 с.

14. Сурин Н.А. Адаптивный потенциал сортов зерновых культур сибирской селекции и пути его совершенствования (пшеница, ячмень, овес) / Н. А. Сурин. – Новосибирск, 2011. – 708 с.

15. Badr A, On the origin and domestication history of barley (*Hordeum vulgare*)/ Badr A, Müller K, Schäfer-Pregl R, El Rabey H, Effgen S, Ibrahim HH, Pozzi C, Rohde W, Salamini F.//. Mol Biol Evol.– 2000.– V.17. – P. 499-510.

16. Blake T, Barley feed uses and quality improvement/ Blake T, Blake VC, Bowman JGP, Abdel-Haleem H.//In Barley: Production, Improvement and Uses, S.E. Ullrich, ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2011, pp 522-531.
17. Blattner FR. Progress in phylogenetic analysis and a new infrageneric classification of the barley genus *Hordeum* (Poaceae: Triticeae). //Breeding Sci. – 2009.– V. 59. – P. 471-480.
18. Bouzidi, M.F. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers / M.F. Bouzidi, S. Badaoui, F. Cambon, F. Vear, De Labrouhe D. Tourvielle, P. Nicolas, S. Mouzeyar // Theor. Appl Genet. – 2002. – V. 104. – P. 592–600.
19. Chelkowski, J. Resistance genes in barley (*Hordeum vulgare* L.) and their identification with molecular markers //J. Appl. Genet. – 2003. – V. 44(3). – Pp. 291-309.
20. Eckstein PE, Duncan SJL, Scoles GJ, Rossnagel BG. An RFLP for true loose-smut resistance and for scald resistance. Proceedings of the 15th North American Barley Research Workshop. Guelph, Canada. 1993.
21. Eckstein PE, Krasichynska N, Voth D, Duncan S, Rossnagel BG, Scoles GJ. Development of PCR-based markers for a gene (Un8) conferring true loose smut resistance in barley / Eckstein PE, Krasichynska N, Voth D, Duncan S, Rossnagel BG, Scoles GJ. //Can J Plant Pathol. – 2002. – V. 24. – P. 46-53.
22. Fernandes VO, 1,3-1,4- β -Glucanases and not 1,4- β -glucanases improve the nutritive value of barley-based diets for broilers/ Fernandes VO, Costa M, Ribeiro T, Serrano L, Cardoso V, Santos H, Lordelo M, Ferreira LMA, Fontes CMGA. // Anim Feed Sci Technol. – 2016.– V.211. – P. 153-163.
23. Keiper FJ. Diagnostic microsatellite markers for the barley net blotch pathogens, *Pyrenophora teres* f. *maculata* and *Pyrenophora teres* f. *teres*/ Keiper FJ, Grcic M, Capio E, Wallwork H. // Australas Plant Path. – 2008. – V. 37. – P. 428-430.
24. Mayer KF, A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome/ Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P,

Platzer M, Fincher GB, Muehlbauer GJ, Sato K, Close TJ, Wise RP, Stein N. // Nature. –2012.– V.491. – p. 711-716.

25. Menzies JG. Incidence and severity of loose smut and surface-borne smuts of barley on the Canadian prairies from 1972 to 2009/ Menzies JG, Thomas PL, Woods S.//*Can J Plant Pathol*, 2014. – V.36. – p. 300-310.

26. Miedaner T, Korzun V. Marker-assisted selection for disease resistance in wheat and barley breeding/ Miedaner T, Korzun V. //Phytopathology, 2012. – V. 102. – P. 560-566.

27. Mueller KJ. Susceptibility of German spring barley cultivars to loose smut populations from different European origins//*Eur J Plant Pathol*. – 2006. – V.116. – P. 145-153.

28. Repkova J. New CAPS marker for selection of a barley powdery mildew resistance gene in the Mla Locus/ Repkova J, Dreiseitl A, Lizal P.// *Cereal Res Commun*, 2009. – V. 37. – P. 93-99.

29. Ribeiro T. The thermostable β -1,3-1,4-glucanase from *Clostridium thermocellum* improves the nutritive value of highly viscous barley-based diets for broilers/ Ribeiro T, Lordelo MMS, Prates JAM, Falcão L, Freire JPB, Ferreira LMA, Fontes CMGA. // *Br Poult Sci*. – 2012.– V.53. – p. 224-234.

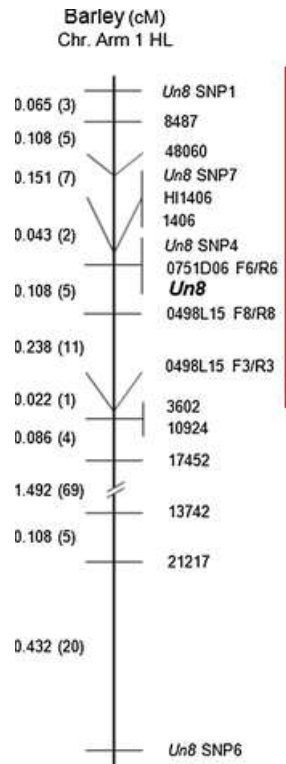
30. Sedlacek T, Stemberkova L. Development of a molecular marker for simultaneous selection of Rph7 gene and effective Mla alleles in barley//*Cereal Res Commun*, 2010. – V. 38. – P. 175-183.

31. Sedlacek T. Development of CAPS marker for identification of rym4 and rym5 alleles conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex in barley/ Sedlacek T, Marik P, Chrpova J. // *Czech J Genet Plant Breed*. – 2010. – V. 46. – P. 159-163.

32. Steffenson BJ, Smith KP. Breeding barley for multiple disease resistance in the Upper Midwest region of the USA//*Czech J Genet Plant Breed*, 2006. – V. 42. – P. 79-85.

33. Thomas P. Smuts. In *Compendium of Barley Diseases* (2nd edn), D.E. Mathre, ed. APS press, St. Paul, Minnisota, USA, 1997, pp 45-49.

34. Thomas PL. Cereal smuts in Manitoba and Saskatchewan, 1989-1995/ Thomas PL, Menzies JG.// Can J Plant Pathol, 1997.– V. 19. – P. 161-165.
35. Tyrka M, A new diagnostic SSR marker for selection of the Rym4/Rym5 locus in barley breeding/ Tyrka M, Perovic D, Wardynska A, Ordon F.// J Appl Genet. – 2008. – V. 49. – P.127-134.
36. von Bothmer R, Komatsuda T. Barley origin and related species// Barley: Production, Improvement, and Uses, S.E. Ullrich, ed. Wiley-Blackwell, Chichester, UK, 2011, pp 14-62.
37. Xu Y, Crouch JH. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice/ Xu Y, Crouch JH. //Crop Sci, – 2008. – V. 48. – P. 391-407.
38. YU, Y. A bacterial artificial chromosome library for barley (*Hordeum vulgare* L.) and the identification of clones containing putative resistance genes/ Yu Y., Tomkins J.P., Waugh R., Frisch D.A., Kudrna D., Kleinhofs A., Brueggeman R.S., Muehlbauer G.J., Wise R.P., Wing R.A.//Theor. Appl. Genet. – 2000. – V. 101. – P.1093-1099.



Физическая карта хромосомы 1HL в которой располагаются гены устойчивости Un8