

В результате исследований по урожайности и дружности созревания можно выделить некоторые образцы лука репчатого: Supra (Голландия) – 41,4 т/га, Беловежский (Беларусь) – 47 т/га, Эллан (Голландия) – 44,2 т/га, Surprise (США) – 50 т/га, Местный (Беларусь) – 43,6 т/га, Эпоха (Россия) – 45,1 т/га, Апогей (Молдова) - 40 т/га, которые на 25 – 56,7% превзошли стандарт - сорт Ветразь (31,9 т/га). В однолетней культуре по этому показателю выделились следующие образцы: Цимес (Польша) - 36,0 т/га, Эксибишен (Голландия) - 42,0 т/га, Корона (Голландия) - 37,9 т/га, Niagara F₁ (США) - 35,6т/га, Американ F₁ (США) - 35,5 т/га. Эти образцы рекомендуется использовать в селекции на повышение урожайности.

Большинство образцов, предложенных для селекции на продуктивность, отличаются и высокими товарными качествами. Для использования в селекции рекомендуются образцы: из Нидерландов – Эллан, Рейсбургер, Эксибишен, Корона; из США – Surprise, Red globe, Niagara F₁; из России – Эпоха; из Чехии - К-301; из Молдовы – Апогей.

В качестве исходного материала в двухлетней культуре для селекции на скороспелость выделены образцы: Эпоха (Россия), Дыямент (Беларусь), Лясковец (Польша) и Авази Чукодака (Япония), период вегетации которых в среднем за исследуемые года составил 85 дней, что на два дня короче, чем у стандарта (87 дней). Более скороспелыми из семян оказались образцы отечественной селекции Ветразь и Скарб Литвинов (101 день).

Наиболее лёжкие – сорта лука отечественной селекции и местные сорта. Эти образцы с хорошо вызревшими луковичами обладают длительным периодом покоя. На основании многолетних исследований можно рекомендовать для селекции сорта и гибриды с 90-100%-ной лёжкостью: из отечественных – Ветразь, Местный, Дыямент; из зарубежных - Spirit F₁ (Голландия). В однолетней культуре наиболее лёжкоспособные оказались белорусские (Ветразь, Дыямент, Крывіцкі ружовы, Скарб литвинов) и российские сорта (Золотничок, Бородковский). Перечисленные образцы можно использовать и в селекции лука на устойчивость к болезням при хранении.

Полученный исходный материал используется в дальнейшей селекционной работе.

1. Пивоваров В.Ф., Ершов И.И., Агафонов А.Ф. Луковые культуры. – М., 2001, 500 с.
2. Агафонов А.Ф. Пути совершенствования и ускорения селекционного процесса луковых культур. Сб.науч.тр./ВНИИССОК,2002; Вып.37, с.25-33
3. Казакова А.А. Лук. – Л., Колос. – 1970. – 360 с.
4. Жаркова С.В. Создание исходного материала для селекции лука репчатого в Западной Сибири. Автореферат. – М.,2001 – 27 с.
5. Лебедева Н.Т. Улучшить селекцию лука. // Картофель и овощи. – 1996. - №5, с. 28.
6. Н.П.Купреенко. Болезни лука репчатого в Беларуси. – 2005. – 120 с.
7. Купреенко Н.П. Производство лука в Белоруссии. // Картофель и овощи. – 2003. - №5, с. 8-9.
8. Методические указания по селекции луковых культур // Всесоюзная академия сельскохозяйственных наук В.И.Ленина. – М.,1989, 65 с.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИНИЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ AFLP

М.Е. Баташова, М.М. Онищенко, Н.М. Чекалин

Научно-исследовательский селекционный центр

Полтавская государственная аграрная академия, Полтава, Украина

instagro@pdaa.com.ua

Мягкая пшеница, *Triticum aestivum* (2n = 42 ABD), одна из наиболее важных культур в мировой экономике. Генетические карты пшеницы были разработаны и расширены с применением различных маркерных систем: RFLP, микросателиты и другие [3, 4]. Идентифицирован целый ряд молекулярных маркеров, ассоциированных с около 40 экономично ценными признаками пшеницы [2, 9, 10]. Знание локализации генов,

контролирующих эти признаки и их специфических аллелей, предлагает широкие возможности для MAS-селекции зерновых культур [5, 6].

Техника AFLP (amplification fragment length polymorphism) – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов ДНК применяется для визуализации одновременно сотен амплифицированных рестриктных фрагментов ДНК [1]. Полученный фингерпринт является высокополиморфным, причем полиморфизм AFLP выше, чем RAPD и ISSR. Данная технология позволяет определить генетические изменения, вызванные точковыми мутациями в сайтах рестрикции или в участках отжига праймеров [4]. Тем не менее, высокий уровень полиморфизма дает возможность оценить изменчивость через весь геном, давая общую картину уровня генетической изменчивости [7, 8]. Наибольшего применения этот метод достиг в генотипировании и таксономическом анализе, тогда как более детальную информацию про изменчивость по одному или нескольким локусам можно получить с помощью других маркерных систем, таких как микросателлитные последовательности (SSR и др.) [6].

Целью данной работы являлся молекулярно-генетический анализ линий и сортов озимой пшеницы различного происхождения по маркерам AFLP и поиск их информативных вариантов для дифференциации исследуемого материала.

В исследовании принимали участие 17 линий и сортов озимой пшеницы Полтавской государственной аграрной академии и один сорт бельгийской селекции. AFLP-анализ проводился по 5 комбинациям MseI и EcoRI праймеров (табл.1), которые были отобраны как наиболее информативные для изучения генома растений в лаборатории биотехнологии центра сельскохозяйственных исследований CARAH (Бельгия).

ДНК экстрагировали из 5-дневных проростков озимой пшеницы с помощью специфичного реагента для изоляции геномной ДНК из растительных клеток Plant DNAzol фирмы INVITROGEN, в соотношении 0.3 мл DNAzol на 0.1 г материала.

Рестрикцию ДНК и лигацию адаптеров проводили в термоциклере GeneAmp PCR при t 37⁰С 2 часа. Преселективные праймеры AFLP: EcoRI: 5'-GACTGCGTACC A-3'; MseI: 5'-GATGAGTCCTGAGTAA C-3'. Преселективную амплификацию проводили в Thermocycler GeneAmp PCR 9700 при следующем температурном режиме: цикл 1 – 2 мин 37 °С; циклы 2...21 – 20 сек 94 °С, 30 сек 56 °С, 2 мин 72 °С; цикл 22 – 30 мин 60 °С. Селективную амплификацию проводили в Thermocycler GeneAmp PCR 9700 по программе „Selective amplification” при следующем температурном режиме: 2 мин 94 °С (1 цикл); 20 сек 94 °С, 30 сек 66 °С, 2 мин 72 °С (1 цикл); 20 сек 94 °С, 30 сек 66 °С (-1 °С /цикл), 2 мин 72 °С (9 циклов); 20 сек 94 °С, 30 сек 56 °С, 2 мин 72 °С (20 циклов); 30 мин 60 °С (1 цикл).

Анализ результатов селективной амплификации проводился в капиллярном электрофорезе ABI Prism 3100. Амплифицированные фрагменты определялись по наличию (1) или отсутствию (0) их на электроферограмме. Критерием полиморфности маркера было отсутствие амплифицированного продукта хотя бы в одном из образцов.

Анализ генетического родства сортов, основанный на сходстве матриц данных, проведен методом кластерного анализа UPGMA.

В данной работе AFLP-анализ проведен по 5 комбинациям MseI и EcoRI праймеров (таблица). В результате получено 843 амплифицированных фрагмента, 185 из которых, размером от 50 до 500 пн, были полиморфными (21 %).

Исследованные комбинации праймеров при амплификации с геномной ДНК показали различный уровень полиморфизма между линиями. Наибольший уровень полиморфизма AFLP-фрагментов отмечен по комбинации С3 (34 %), наименьший - по комбинации С12 (13 %) (таблица).

Анализ генетических дистанций и кластеризации линий определил, что наиболее информативными маркерами для селекции были С3 и С6 комбинации, которые на наш

взгляд наилучшим образом отображают филогенетические отношения между сортами и линиями озимой пшеницы полтавской селекции.

Таблица

Полиморфизм AFLP-фрагментов у озимой пшеницы по 5-ти комбинациям праймеров

Комбинация	Праймеры		Количество линий оз. пшеницы	Общее количество AFLP-фрагментов	Количество полиморфных фрагментов	Уровень полиморфизма, %
	MseI	EcoRI				
С 3	CTG	ACA	10	146	50	34
С 6	CTG	AAG	12	194	34	17
С 12	CTA	AAG	6	184	25	13
С 17	CAC	ACA	6	148	33	22
С 27	CAT	AGG	6	171	43	25
Общее			18	843	185	21

Небольшие значения генетических дистанций указывают на низкий уровень генетического разнообразия между современными сортами пшеницы, что показано и другими авторами [3, 5]. Так, в нашем опыте, бельгийский сорт Kaspart оказался генетически неотдаленным от наших сортов по комбинации С3 (рис. 1).

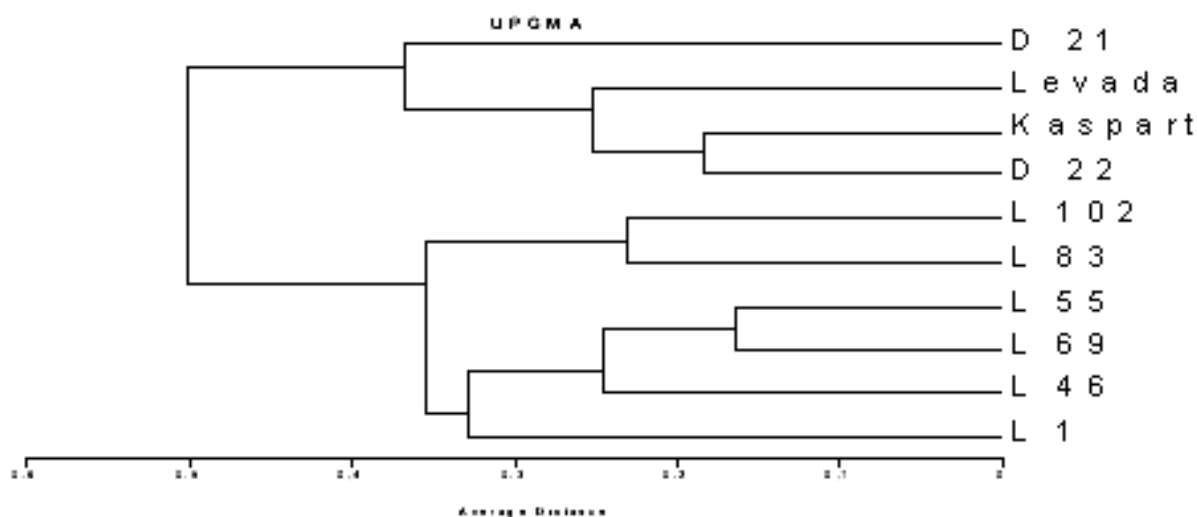


Рис. 1. Дендрограмма генетических дистанций исследуемых линий и сортов озимой пшеницы по комбинации праймеров С3.

В общем, комбинации праймеров С3 и С6 показали себя наиболее информативными в отличии от других, хотя уровень полиморфизма фрагментов в комбинации С6 (17%) был в 2 раза меньше чем в С3 (34%) (табл. 1).

На дендрограмме комбинации С3 две линии сорта Фора (L83 и L102) находятся в одном кластере, но с дистанцией 0,235 (рис.1). Это указывает на возможность маркеров AFLP определять генетические дистанции даже между изогенными линиями.

Кластерное распределение на дендрограмме комбинации С6 соответствует происхождению данных линий. Только линия 177 F₃ оказалась несколько отдаленной от остальных (0,37), возможно по причине своей гетерогенности (рис.2). Так, линии 15 и 24 из одной комбинации скрещивания расположились в одном кластере, однако показано, что они не являются генетически подобными, а линия 26 из той же комбинации оказалась несколько отдаленной.

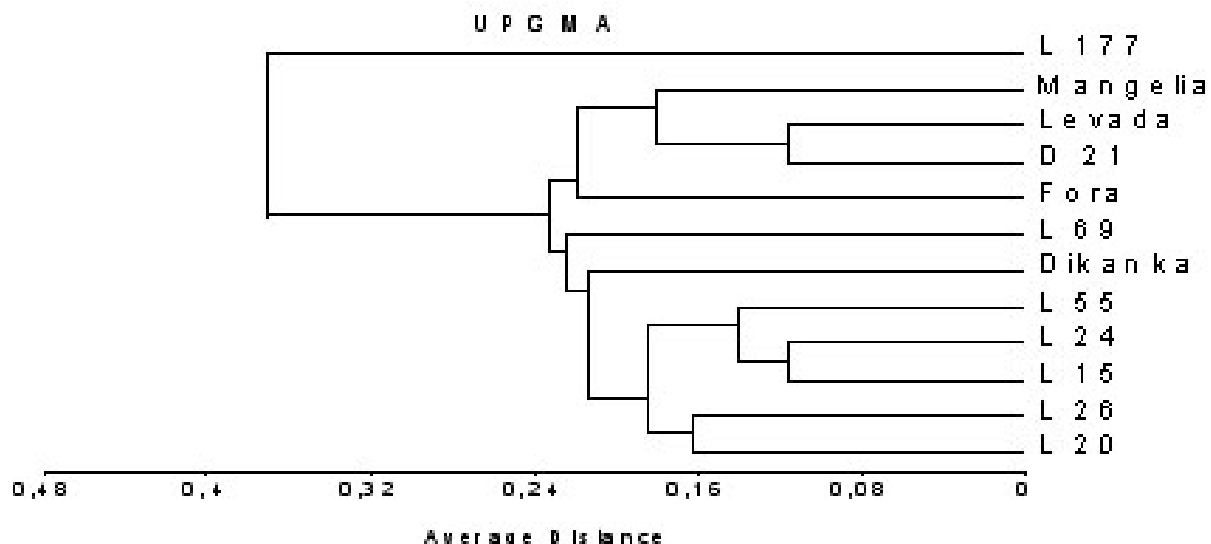


Рис. 2. Дендрограмма генетических дистанций исследуемых линий и сортов озимой пшеницы по комбинации праймеров С6.

Анализ дендрограмм по комбинациям С12, 17, 27 не показал существенных закономерностей их дифференциации, не смотря на уровень полиморфизма AFLP-фрагментов по данным комбинациям. На наш взгляд, это связано с тем, что С3 и С6 AFLP-праймерные комбинации определяют фрагменты генома, которые возможно были включены в селекционный процесс и поддавались селекционному отбору. В результате они наиболее адекватно отображают внутривидовую дифференциацию сортов и линий озимой пшеницы. Полученные данные позволяют предположить, что эти комбинации праймеров могут раскрыть характерные признаки популяции и дают возможность использовать их в исследованиях озимой пшеницы на внутривидовом уровне.

Авторы выражают благодарность лаборатории биотехнологии Центра сельскохозяйственных исследований CARAH (Бельгия), и особенно доктору Martine Gadenne, в содействии проведения данной работы.

1. Глазко В.И., Глазко Г.В. Толковый словарь по прикладной генетике, ДНК-технологии и биоинформатике. К., 2000. –С.35-36.
2. Blaszczyk L., Tyrka M., Chelkowski J. PstI AFLP based markers for leaf rust resistance genes in common wheat // J. Appl. Genet. -2005. -46(4). –P.357-364.
3. Bohn M., H.F. Utz, Melchinger A.E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance // Crop science. -1999. -39. –P.228-237.
4. Breyne P., Boerjan W., Gerats T., Van Montagu M., Van Gysel A. Applications of AFLP in plant breeding, molecular biology and genetics // Belg. Journ. Bot. -1997. -129(2). –P.107-117.
5. Gupta P.K., Varshney R.K., Sharma P.C., Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding // Plant Breed. -1999. -118. –P.369-390.
6. Korzun V. Use of molecular markers in cereal breeding // Cellular and molecular biology letters. -7. -2002. –P.811-820.
7. Mueller U.G., Wolfenbarger L.R. AFLP genotyping and fingerprinting // Tree. -1999. -14, 10. –P.389-394.
8. Savelkoul P.H.M. et al. Minireview AFLP analysis: the state of art. -1999. –J. of Clinical Microbiol. -37, 10. – P.3083-3091.
9. Tyrka M. Fingerprinting of common wheat cultivars with an Alw44I-based AFLP method // J.Appl.Genet. -2004. - 45(4). P. 405-410.
10. Yan L., Loukoianov A., Tranquilli G., Helguera M., Fahima T., Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene VRN1. -2003. –Proc. Natl. Acad. Sci. –USA. -100. –P.6263-6268.