

УДК 633.11:581.573.4

МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ В ПРОВЕДЕНИИ ДНК-ДИАГНОСТИКИ УСТОЙЧИВОСТИ *HORDEUMVULGAREL.* К *BLUMERIAGRAMINIS*

Епишко И.А.

РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию»

г. Жодино, Республика Беларусь

Устойчивость к болезням – один из показателей адаптивного потенциала создаваемых сортов. По данным ЮНЕСКО, выращивание устойчивых к болезням и вредителям сортов сельскохозяйственных культур способно предотвратить потерю более 20% урожая [1].

Одним из главных факторов снижения урожая и его качества у ячменя (*HordeumvulgareL.*) является поражение грибной болезнью – мучнистой росой (*Blumeriagraminis*). Это едва ли не самое распространенное и вредоносное заболевание данной культуры, способное привести к потере урожая до 15-20%, а в годы эпифитотий – до 40%.

До настоящего времени стратегия успешной генетической защиты ячменя от болезней в Республике Беларусь базируется на сведениях о структуре популяций паразитов и наличии генетических коллекций доноров устойчивости. Однако устойчивость ячменя к болезням контролируется полигенными системами (горизонтальная устойчивость) и олигогенно (вертикальная устойчивость, которая имеетраспецифическую природу). Гены вертикальной устойчивости, как правило, доминантны, но бывают и исключения. По данным Тырышкина Л.Г. и других авторов, в настоящее время известно не менее 28 генов устойчивости, которые представлены более чем 100 аллелями, однако их подавляющее большинство неэффективны против современных популяций *E. graminis*. Часть из них используется в селекции: Mlg, Ml, Mia, множественные аллели устойчивости локуса Mlo {Mlo1 и т.д.) [2].

Изучение селекционной ценности известных генов устойчивости к идентифицированным 76 расам мучнистой росы показало, что в селекционный процесс целесообразно вовлекать материал с генами mlo [2].

Однако данный метод не обеспечивает надежной диагностики при выявлении устойчивости ячменя к патогену *Blumeriagraminis*, в связи с чем необходима разработка методов тестирования устойчивости объектов на уровне генома.

Использование геномной селекции, по оценкам экспертов, обеспечивает уровень достоверности полученных результатов 99,999%, экономию средств, в сравнении с традиционной селекцией, в размере 92%, эффективность селекции увеличивается в два раза.

В связи с этим, целью наших исследований была разработка метода геномной оценки селекционного материала ячменя, а именно идентификация гена mlo и выявление возможности его использования в качестве ДНК-маркера устойчивости ячменя к мучнистой росе.

Тотальную ДНК выделяли из проростков и листьев ячменя по методу Edwardsv модификации Дорохова с добавлением стадии фенольной депротей-

низации. Специфическая ПЦР проводилась в объеме 10 мкл, содержащем 1 х ПЦР буфер (60 мМTris-HCl, 25 мМKCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100) (СибЭнзим), 1,5 мМMgCl₂, 200 мкМ каждого dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 4 пМ прямого праймера (om 7F), 4 пМ обратного праймера (om 7R), 0,5 единицы Taq полимеразы (СибЭнзим), 50–100 нг геномной ДНК. Реакцию выполняли на амплификаторе AppliedBiosystemsPCRSYSTEM 2700 (США), используя программу: денатурация – 2 мин. 94 °С, затем 35 циклов: денатурация – 40 сек. 94 °С, отжиг – 1 мин. 60 °С, синтез – 1 мин 20 сек. 72 °С; заключительный синтез – 7 мин. 72 °С.

Рестрикцию проводили согласно инструкции фирмы-производителя эндонуклеазных ферментов – MBIFermentas. Продукты амплификации с маркером Vnu 1P в объеме 10-15 мкл инкубировали сферментом эндонуклеазной MspI 3ч при 37 °С.

Продукты реакции амплификации с Су-5мечеными маркерами разделяли в 6-8%-м полиакриламидном денатурирующем геле в 1х трис-боратном буфере (0,09 МТрис-борат, 0,01 М ЭДТА) в секвенаторе ALFExpress в течение 1-3 часов. Размеры полученных фрагментов устанавливали с использованием программы ALFwinFragmentAnalyser версии 1.02 сравнением внутренних стандартов размеров, которые были добавлены в каждую лунку геля.

Электрофоретическое разделение немеченых ПЦР-фрагментов проводили в 8%-м полиакриламидном геле в 0,5х трис-боратном буфере (0,045 МТрис-борат, 0,001 М ЭДТА) в течение 5-10 часов. Визуализацию полученного продукта проводили на приборе GelDoc.

В результате проведенных исследований разработаны методологические подходы, позволяющие проводить диагностику устойчивости образцов ячменя к мучнистой росе, используя в качестве маркера ген mlo.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тарасенко, Н.Д. Индуцирование мутации и устойчивость сельскохозяйственных культур к заболеваниям / Н.Д. Тарасенко // Международные научные связи. 2010. – С. 93-96.
2. Тырышкин, Л.Г. Генетическое разнообразие пшеницы и ячменя по эффективной устойчивости к болезням и возможности его расширения: дис. ... д-ра биологических наук : 03.00.15, 06.01.11/ Л.Г. Тырышкин – Санкт-Петербург, 2007. – 258 с.

УДК 636.2.034.636.087.7

ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ РАННЕСПЕЛЫХ СОРТОВ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ

Живлюк Е.К., Бородич Е.А.

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

Мягкая озимая пшеница является одной из самых распространенных важнейших продовольственных культур на земном шаре и в Республике Беларусь. Как показывает анализ посевных площадей, занятых различными сортами, в большинстве хозяйств региона не решен вопрос оптимизации сортовой структуры с учетом характера распределения и интенсивности проявления