

Анализ молекулярными маркерами фиолетовой окраски зерна в потомстве отдаленных гибридов тритикале, полбы и пшеницы

Петраш Н.В., м.н.с., Стёпочкин П.И., д.с.-х.н., в.н.с., Морозова Е.В., м.н.с., Шоева О.Ю., к.б.н., с.н.с., Пискарев В.В. к.с.-х.н., зав. лабораторией.*

*Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
СО РАН, Новосибирск, Россия*

**email: pnv11@bionet.nsc.ru*

*В статье представлены результаты молекулярного и фенотипического анализа гибридных линий, полученных в отдаленных скрещиваниях тритикале с фиолетовозерными линиями полбы и пшеницы. Для выявления генотипов растений F_3 (Орден $\times i:S29^{PF}$) использовали внутригенный маркер *Pp3-diagnostic* к гену *Pp3*, и маркеры *Xgwm0111*, *Xgwm0044* к гену *Pp-D1*, в случае с комбинацией F_4 (Садко $\times 27-3/17$) - *Pp3-diagnostic* и *Xgwm0046* к гену *Pp-B1*. Определены генотипы 58 образцов, из которых отобрано 45 фиолетовозерных растений F_4 (Орден $\times i:S29^{PF}$) и 4 растения F_5 (Садко $\times 27-3/17$) с установленными доминантными генами отвечающими за окраску перикарпа зерна.*

Ключевые слова: тритикале, отдаленные гибриды, фиолетовое зерно, молекулярные маркеры.

Analysis of purple-grain hybrids in distant crosses of triticale, bread wheat and emmer using molecular markers

Petrash N.V., Stepochkin P.I., Morozova E.V., Shoeva O.Yu., Piskarev V.V.*

Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

**email: pnv11@bionet.nsc.ru*

*The article presents the results of molecular and phenotypic analysis of hybrid lines obtained in distant crossings of triticale with purple-grain lines of emmer and wheat. To identify plant genotypes F_3 (Order $\times i:S29^{PF}$), we used the intragenic marker *Pp3-diagnostic* for the *Pp3* gene, and markers *Xgwm0111*, *Xgwm0044* for the *Pp-D1* gene, in the case of the combination F_4 (Sadko $\times 27-3/17$) - *Pp3-diagnostic* and *Xgwm0046* to the *Pp-B1* gene. The genotypes of 58 samples were determined, from which 45 purple-grain plants F_4 (Order $\times i:S29^{PF}$) and 4 plants F_5 (Sadko $\times 27-3/17$) with established dominant genes responsible for the color of the grain pericarp were selected.*

Key words: triticale, distant hybrids, purple-grain, molecular markers.

Стратегия селекции тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack) как и других зерновых культур претерпевает изменения в соответствии с расширением разнообразия признаков и возникающими новыми требованиями к растительной пищевой продукции.

На сегодняшний день актуальной задачей является создание сортов злаковых культур с повышенным содержанием антоцианов в зерне [12]. Антоцианы представляют собой полифенольные соединения и способны увеличить адаптивные свойства растений, что обусловлено их высокой антиоксидантной активностью [4, 5]. Кроме того, показана польза для здоровья человека при использовании в пищу продуктов богатых антоцианами [8]. Известно, что фиолетовая окраска зерна обусловлена синтезом и накоплением антоцианов в перикарпе зерновки [4]. Этот процесс запускается в результате комплементарного взаимодействия двух ключевых генов *Pp3*, расположенного на 2А хромосоме и одного из трех гомеологичных генов *Pp-1*, картированных на хромосомах 7-й гомеологической группы [11]. Показано участие гена *Rc-1* контролирующего окраску coleoptile в контроле окраски перикарпа зерна пшеницы (*Rc-1* = *Pp-1*), поэтому присутствие гена *Pp-1* возможно контролировать по окраске coleoptile [9]. Точность отбора по целевому гену *Pp3* контролируется при помощи ПЦР анализа с разработанным внутригенным ДНК-маркером *Pp3-diagnostic* [7]. Создание новых исходных форм тритикале возможно за счет переноса генов, ответственных за биосинтез антоцианов от линий доноров фиолетовой окраски зерна. С этой целью ранее нами были получены отдаленные гибриды тритикале с фиолетовозерными линиями пшеницы и полбы [2].

Целью настоящего исследования является изучение проявления фиолетовой окраски зерна в потомстве отдаленных гибридов тритикале с фиолетовозерными линиями пшеницы и полбы при помощи молекулярных маркеров.

В качестве материала использовали гибриды F₄ и F₃, полученные от скрещивания тритикале с линиями пшеницы и полбы – донорами фиолетовой окраски зерна. В первой комбинации F₄ (Садко × 27-3/17) донором окраски зерна служила фиолетовозёрная полба 27-3/17. Окраска перикарпа была передана полбе от эфиопской пшеницы (*T. aethiopicum* Jakubz.) (TRI 15744) [3]. Вторая комбинация получена от скрещивания тритикале сорта Орден с линией пшеницы i:S29*Pp-D1Pp3*^{PF} (в сокращении – i:S29^{PF}) – донором доминантных аллелей генов *Pp3* и *Pp-D1*. ДНК экстрагировали из молодых листьев растений родительских образцов и гибридов третьего (F₃) и четвертого (F₄) поколений в соответствии с методикой, описанной J. Plaschke с соавторами [13]. Выделенную ДНК комбинации F₄ (Садко × 27-3/17) анализировали внутригенным маркером *Pp3-diagnostic*, разработанным к гену *Pp3* и микросателлитным маркером тесно сцепленным с геном *Pp-D1*. Для уточнения генотипа гибридов комбинации F₄ (Садко × 27-3/17) на уровне ДНК использовали внутригенный маркер *Pp3-diagnostic*, разработанный к гену *Pp3* на хромосоме 2А и микросателлитный маркер *Xgwm0046*, фланкирующий ген *Pp-B1* на 7В хромосоме [10, 14]. ДНК комбинации F₃ (Орден × i:S29^{PF}) анализировали маркером *Pp3-diagnostic*, и микросателлитными маркерами (*Xgwm0111*, *Xgwm0044*), фланкирующими ген *Pp-D1* на 7D хромосоме [6]. Процедуру ПЦР с маркерами и разделение продуктов ПЦР в агарозном геле проводили согласно условиям, описанным ранее [1, 7].

В комбинации F_3 (Орден $\times$ i:S29^{PF}) было получено три линии под номерами 5, 6 и 7. Фенотипически линия 5 имела белое зерно и окрашенный колиоптиле, линия 6 имела окрашенное зерно и колиоптиле, зерновки линии 7 были со слабой окраской перикарпа и окрашенным колиоптиле. В дальнейшем растения трех линий были проанализированы с помощью молекулярных маркеров: *Pp3-diagnostic*, *Xgwm0111* и *Xgwm0044* (рис. 1 и 2 сверху). Из 15 растений линии 5 выявлено пять растений с генотипом Pp-D1Pp-D1Pp3pp3 и десять растений с генотипом Pp-D1Pp-D1pp3pp3. У линии 6 все 45 растения имели генотип Pp-D1Pp-D1Pp3Pp3. Линия 7 характеризовалась низкой завязываемостью, поэтому нами было получено только два растения. Генотипы этих растений не удалось однозначно определить, поскольку амплифицируемые фрагменты отличались от контролей. Возможно, это связано с хромосомными изменениями, которые часто возникают при отдаленной гибридизации.

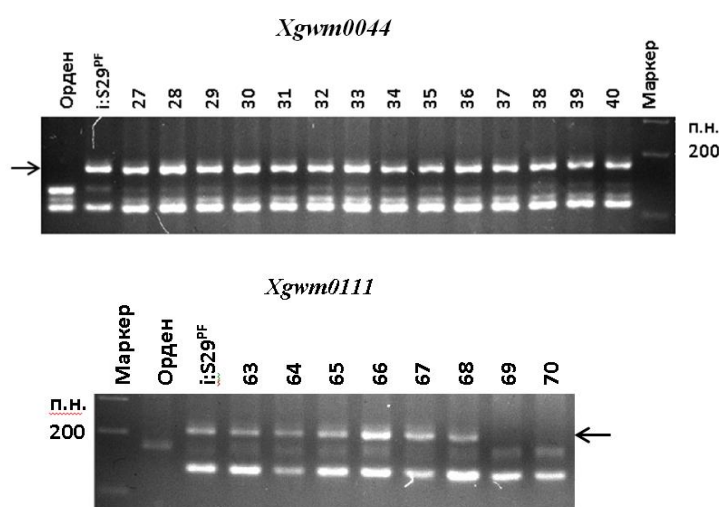


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов ПЦР родительских образцов и гибридов F_3 (Орден $\times$ i:S29^{PF}) с маркерами *Xgwm0044* и *Xgwm0111*, стрелкой указан продукт ПЦР, соответствующий участку хромосомы 7D с геном *Pp-D1*

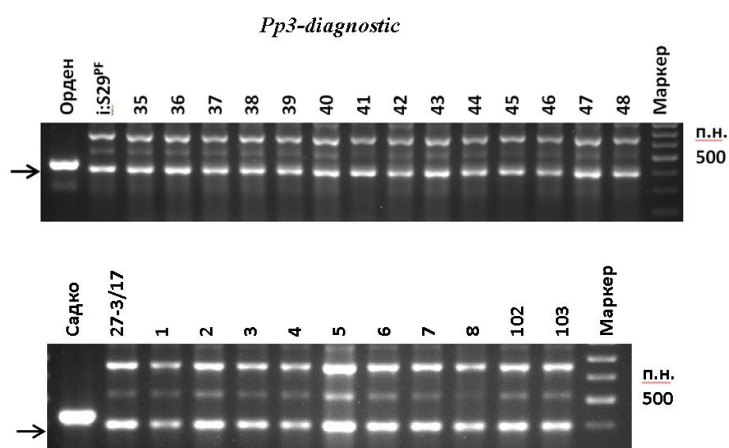


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов ПЦР с маркером *Pp3-diagnostic*. Сверху у гибридов F_3 (Орден $\times$ i:S29^{PF}) и их родителей, внизу у гибридов F_4 (Садко $\times$ 27-3/17) и их родителей; стрелками указан фрагмент ДНК длиной 398 пар нуклеотидов, свидетельствующий о наличии доминантного аллеля гена *Pp3* на 2А хромосоме

У линии 2-1 (Садко × 27-3/17) было получено 10 окрашенных зерновок, полученные из них растения анализировали с помощью молекулярных маркеров (рис. 2, 3). По результатам анализа установлено, что все 10 растений имеют генотип *Rp-B1Rp-B1Rp3Rp3*. При дальнейшем выращивании выяснилось, что фертильными было 4 растения, у которых формировались фиолетовые зерновки.

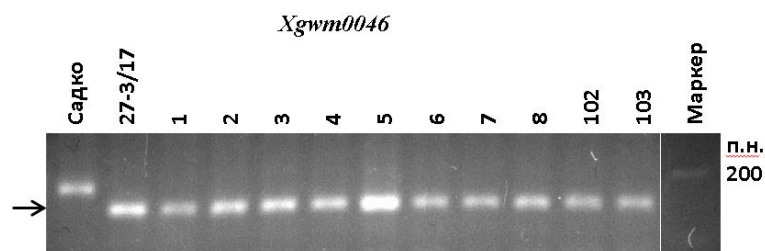


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР родительских образцов и гибридов F₄ (Садко × 27-3/17) с маркером *Xgwm0046*, стрелкой указан продукт ПЦР, соответствующий участку хромосомы 7В с геном *Rp-B1*

Всего было получено 66 растений у которых проведена визуальная оценка окраски зерна, оценены показатели продуктивности, легкости обмолота, ломкости стержня, наличие опушения на колосожке. В дальнейшем все линии будут высеяны в поле для размножения и проведения оценок.

В результате нами выделены фиолетовозерные линии отдаленных гибридов тритикале и пшеницы с доминантными генами *Rp3* и *Rp-D1* (рис. 4), а также линии от скрещивания тритикале и полбы с установленными доминантными генами *Rp3* и *Rp-B1* (рис. 5).



Рис. 4. Фотографии зерновок F₄ (Орден × i:S29^{PF}) и родительских образцов. Слева направо: тритикале сорта Орден, линия 6-2 F₄ (Орден × i:S29^{PF}), линия пшеницы i:S29^{PF}



Рис. 5. Фотографии зерновок F₅ (Садко × 27-3/17) и родительских образцов. Слева направо: тритикале сорта Садко, гибрид F₅ (Садко × 27-3/17), линия полбы 27-3/17

Финансирование: работа поддержана бюджетными проектами ИЦиГ СО РАН № FWNR-2022-0018 и FWNR-2022-0008.

Список литературы

- 1 Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Шаманин В.П., Хлесткина Е.К. Использование молекулярных маркеров в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с различной антоциановой окраской зерновок. Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. № 9(2). С. 86–99. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-11
- 2 Петраш Н.В., Стёпочкин П.И. Создание фиолетовозерных гибридов в отдаленных скрещиваниях тритикале, мягкой пшеницы и полбы методом эмбриокультуры *in vitro*. Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции. 2023. Т. 9. № 4. С. 183–188. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-25
- 3 Стёпочкин П.И., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Маркер-ориентированная селекция в создании гибридных линий *Triticum dicoccon* (Schrank) Schuebl. × *Triticum aethiopicum* Jakubz. с фиолетовоокрашенным зерном. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2023. № 184(2). С. 139–148. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-139-148
- 4 Хлесткина Е.К. Гены, детерминирующие окраску различных органов пшеницы. Вавил. журн. генет. селекции. 2012. Т. 16. С. 202–216.
- 5 Хлесткина Е.К., Шоева О.Ю., Гордеева Е.И. Гены биосинтеза флавоноидов пшеницы. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4/1):784–796.
- 6 Хлесткина Е.К., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Кукоева Т.В., Шаманин В.П., Моргунов А.И. Способ отбора линий яровой мягкой пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в зерне. Патент № 2762804 С1, 09.02.2021.
- 7 Шоева О.Ю., Гордеева Е.И., Хлесткина Е.К. Внутригенный ДНК-маркёр для отбора пшеницы с повышенным содержанием антоцианов в перикарпе зерновки. Патент № 2774444, 29.11.2021.
- 8 Юдина Р.С., Гордеева Е.И., Шоева О.Ю., Тихонова М.А., Хлесткина Е.К. Антоцианы как компоненты функционального питания. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2021. № 25(2). С. 178–189. DOI 10.18699/VJ21.022.
- 9 Gordeeva E., Shamanin V., Shoeva O., Kukoeva T., Morgounov A., Khlestkina E. The strategy for marker-assisted breeding of anthocyanin-rich spring bread wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars in Western Siberia. Agronomy. 2020. № 10(10). P. 1603. DOI 10.3390/agronomy10101603.
- 10 Khlestkina E.K., Pshenichnikova T.A., Röder M.S., Börner A. Clustering anthocyanin pigmentation genes in wheat group 7 chromosomes. Cereal Research Communications. 2009. № 37(3). С. 391–398. DOI: 10.1556/CRC.37.2009.3.8
- 11 Khlestkina E.K. Genes determining the coloration of different organs in wheat. Russian Journal of Genetics: Applied Research. 2013. № 3(1). P. 54–65.
- 12 Loskutov I.G., Khlestkina E.K. Wheat, barley, and oat breeding for health benefit components in grain. Plants. 2021. 10:86.
- 13 Plaschke J., Ganai M.W., Roeder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995. № 91(6–7). P. 1001–1007. DOI 10.1007/BF00223912.
- 14 Tereshchenko O.Y., Gordeeva E.I., Arbuzova V.S., Börner A., Khlestkina E.K. The D genome carries a gene determining purple grain colour in wheat. Cereal Research Communications. 2012. № 40(3). P. 334–341. DOI: 10.1556/CRC.40.2012.3.2