

13. Vanzetti L.S., Pflüger L.A., Rodríguez -Quijano M. et al. Genetic variability for waxy genes in Argentinean bread wheat germplasm // *Electronic J. Biotechnol.* – 2009. – Vol. 12. – P. 1–9.
14. Saito M., Vrinten P., Ishikawa G. et al. A novel codominant marker for selection of the null Wx-B1 allele in wheat breeding programs // *Mol. Breeding.* – 2009. – Vol. 23. – P. 209–217.
15. Дивашук М.Г., Климушина М.В., Карлов Г.И. Молекулярно-генетическая характеристика аллеля Wx-B1 мягкой пшеницы и применимость ДНК маркеров для его идентификации // *Генетика.* – 2011. – Т. 47, №12. – С. 1611–1615.
16. Vrinten P., Nakamura T., Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat // *Mol. General Genet.* – 1999. – Vol. 261. – P. 463–471.
17. Brody, J.R., Kern, S.E. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 2004. – Vol. 333. – P. 1–13.

STEPANENKO O.V.^{1,2}, STEPANENKO A.I.¹, MORGUN B.V.¹

¹*Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine Ukraine, 03680, Kyiv, 148 Akademika Zabolotnoho St., e-mail: molgen@icbge.org.ua*

²*National Technical University of Ukraine "Kyiv Polytechnic Institute"*

MOLECULAR GENETIC METHODS FOR IDENTIFICATION OF ALLELIC VARIANTS OF Wx GENES IN SOFT WHEAT LINES BY CODOMINANT MOLECULAR MARKERS

Aims. Starch texture is one of the important factors in the quality of wheat products. Thus, it is important to control the amylose content in starch. There are three genes controlling the synthesis of amylose: *Wx-A1*, *Wx-B1* and *Wx-D1*. Each gene can occur in several allelic variants: active allele (a) encoding the protein synthesis Wx, null allele (b) in which the synthesis of a functional protein is absent, and functional Wx alleles with different enzymatic activity of protein GBSSI. **Methods.** The most reliable way to assess the allelic state of *Wx* genes is molecular marking using polymerase chain reaction. **Results.** Among the studied wheat lines Wx-1 and Wx-6 by codominant molecular markers there were identified homozygous plants carrying null alleles of *Wx-A1*, *Wx-D1*, *Wx-B1*, and heterozygous plants for *Wx-B1*. **Conclusions.** Homozygous and heterozygous allelic states of the *Wx* wheat genes were distinguished and can be effectively involved in the breeding process.

Key words: *Triticum aestivum* L., PCR, DNA marker, marker-assisted selection.

СТОЛЕПЧЕНКО В.А.², ВАСЬКО П.П.², КОНДРАЦКАЯ И.П.¹, ФОМЕНКО Т.И.¹

¹*ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» Беларусь,* ²*РУП «Научно-практический центра НАН Беларуси по земледелию»*

Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2В, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ СОЗДАНИЯ МЕЖВИДОВЫХ ГИБРИДОВ ЛИСОХВОСТА

Ведущая роль в создании устойчивой кормовой базы в Республике Беларусь принадлежит многолетним травам на пашне, сенокосах и пастбищах. Среди злаковых трав основную долю в травосмеси занимают сорта райграса пастбищного, лисохвоста лугового и фестулолиума, которые характеризуются интенсивным отрастанием и высоким качеством корма с содержанием обменной энергии 11-11,5 МДж/кг сухого вещества и сырого протеина на уровне 18-20% [1]. Основные направления селекции многолетних злаковых трав направлены на создание генотипов с хорошей отрастаемостью и стабильностью урожая; высокой устойчивостью к основным болезням, зимостойкостью, теневы-

носливостью; хорошей конкурентной способностью в многокомпонентных травостоях; а также стабильной семенной продуктивностью. Объединение хозяйственно-полезных признаков в межвидовом гибриде позволит сформировать сорто-популяцию с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью. Впервые предпринимается попытка разработать геномную технологию селекции лисохвоста лугового на основе дупликации генома, интрогрессивной гибридизации с использованием ДНК-маркирования с целью целенаправленно преобразования генома, расширения генофонда исходного материала и повышения эффективности селекции.

Материалы и методы

Объектом исследования служили родительские и гибридные формы лисохвоста лугового (*Alopecurus pratensis* L.) и лисохвоста вздутого (*Alopecurus ventricorus* Pers.). Для повышения фертильности гибридов при скрещивании переводят стерильные гибриды на тетраплоидный уровень, обрабатывая их колхицином. Полиплоидия способствует закреплению гетерозиса не только в первом, но и в последующих поколениях. Использовали селекционно-генетические методы, позволяющие преодолеть как постгамную, так и прогамную несовместимость [2].

Результаты и обсуждение

При создании межвидовых гибридов в качестве материнской формы использовались растения лисохвоста лугового Рассвет, Rg-782, Brudzynska, Криничный, Puszavan, 4-RA местный, Донской 20, Pioret, Обский в качестве отцовской – лисохвост вздутый Довский. Проведено семь комбинаций скрещиваний с использованием фитотронно-тепличного комплекса и в полевых условиях. В фазу полного вымётывания была проведена изоляция растений лисохвоста, затем в период цветения (12 апреля в фитотронно-тепличном комплексе и с 15 мая в поле) под изоляторами было проведено опыление. На 14-17 день после опыления срезанные султаны перемещены в лабораторные условия, где из них было произведено извлечение 332 штук зерновок (табл. 1).

При скрещивании близкородственных видов для преодоления постгамной несовместимо-

Общие белки из семян гибридных растений лисохвоста экстрагировали буфером для растворения белка pH 6,8 из расчета 150 мл буфера на одну зерновку. Для разделения общих белков использовали 12%-ный полиакриламидный гель с SDS по Лаэмли. Разделение белка вели в течение 3 часов, при величине тока 30 мА на одну пластину. Гели фотографировали на цифровой камере, интенсивность зон и величины молекулярных масс оценивали с помощью специализированного программного обеспечения для ПЭВМ.

сти, выражающейся в атрофии эндосперма, применяется метод извлечения зародыша и его выращивания на искусственных питательных средах. Оптимальный срок извлечения зародыша из материнских тканей зависит от его состояния и степени дифференциации и переносится на питательную среду до начала дегенерации завязи и зародыша. Для увеличения выхода гибридов был использован метод эмбриокультуры *in vitro*. При скрещивании гибридные зародыши выделяют на 17-18 день после оплодотворения. Зародыши вычлняют из завязи в асептических условиях препаровальной иглой под микроскопом и помещают в колбу на питательную агаровую среду. Колбы с зародышами в течение 2 суток инкубируют в темноте. Через 4-6 недель в период образования двух-трех настоящих листьев и нормально развитых корней растения высаживают в сосуды с почвой.

Таблица 1. Результативность создания межвидовых гибридов лисохвоста лугового с лисохвостом вздутым

	Комбинации Скрещивания	Извлечено зерновок		Высажено зародышей		Получено растений	
		шт.	%	шт.	%	шт.	%
Результаты проведения гибридизации в ФТК							
	Лт—3	25	49,0	13	41,9	2	20,0
	Лт—11	15	29,4	9	29,0	3	30,0
	Лт—31	11	21,6	9	29,0	5	50,0
		51		31		10	
Результаты проведения гибридизации в полевых условиях							
	Лк—2	18	6,7	15	9,8	2	6,1
	Лк—3	44	16,2	8	5,2	1	3,0
	Лк—5	37	13,7	30	19,6	15	45,4
	Лк—7	19	7,0	17	11,1	2	6,1
	Лк—9	75	27,7	28	18,3	4	12,1
	Лк—11	63	23,2	43	28,1	5	15,2
	Лк—31	15	5,5	12	7,9	4	12,1
		271		153		33	

На регенерационную питательную среду МС было высажено 184 штук зародышей, из которых 76,7% погибло. Доращивание зародышей было проведено в стерильных условиях в термостатах при температуре 24⁰С до появления проростков, после чего пробирки были переставлены в световую культуральную комнату с режимом 16-ти часового фотопериода с освещенностью 8000 люкс и температурой 20-22⁰С. В результате проведения биотехнологических работ из 92 зародышей, выращиваемых на агарной среде Р-8, в искусственную среду было пересажено 17 зеленых растений. Растения лисохвоста, у которых наблюдалось 2-3 побега, были высажены во второй декаде сентября широкоягодно в полевых условиях для прохождения яровизации. После перезимовки сохранилось 15 растений; процент гибели растений составил 11%, в который вошло два слабо развитых растения.

Полученные гибридные растения лисохвоста, срезанные на высоте 7-8 см, в количестве 43 штук были пересажены в сентябре 2012 года для прохождения яровизации в естественных условиях. У растений насчитывалось 4-5 вегетативных побегов. Формирование генеративных побегов и цветение происходит на втором году жизни. В полевых условиях проведены наблюдения за растениями лисохвоста второго года жизни (регенеранты F₁), полученными гибридизацией лисохвоста лугового и лисохвоста вздутого. Растения были получены при проведении трех комбинации скрещиваний. Первая комбинация скрещивания – материнская форма лисохвост луговой Донской 20 и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский. Вторая комбинация скрещивания – материнская форма лисохвоста лугового Pioret и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский. Третья комбинация скрещивания - материнская форма лисохвоста лугового Обский и отцовская форма лисохвоста вздутого Довский.

В процессе вегетационного периода текущего года при структурном анализе учитывались количественные и качественные показатели по основным признакам кормовой и семенной продуктивности. У гибридных растений наблюдаются различия по длине и ширине листовой пластинки, также по массе одного побега. Отме-

чено отсутствие поражений на листьях в двух комбинациях скрещиваний и наличие пятнистостей во второй популяции. Наблюдения в первых числах сентября за развитием растений показывают, что среднесуточные приросты у растений лисохвоста после проведения подкоса составляют 1,0-3,2 см/сутки при значительном количестве побегов. Характеристика гибридных растений лисохвоста поколения F₁ представлены в таблице 2.

Содержание общего белка определяли с трехкратной повторностью из листьев гибридных растений лисохвоста и родительских форм в трех укосах. Содержание растворимых углеводов определяли с четырехкратной повторностью. Как видно из рисунка 1 гибридные растения 3/1, 3/2 и 3/3 отмечены наибольшим содержанием белка, а гибридное растение 1/3 наименьшим. В целом по содержанию белка гибридные растения лисохвоста имеют схожие показания. По содержанию растворимых углеводов у гибридных растений наблюдаются существенные отличия. У гибридных растений 3/1, 3/2, 3/3, у трех материнских форм и одной отцовской форме содержание растворимых углеводов почти в два- три раза больше, чем у гибридного растения 1/1 – 2/3.

Проведен биохимический анализ гибридных растений лисохвоста по электрофоретическим спектрам общих растворимых белков. Идентификация маркерных белков проводилась на основе разработанных методик разделения общих белков гибридов райграсов и гибридных растений овсяницы луговой на овсяницу тростниковую [3, 4]. Оценена внутригибридная изменчивость по общим белкам семян у гибридных растений F₁. В результате анализа электрофоретических спектров общих белков семян установлено, что основная часть полипептидов у гибридов растений лисохвоста и их родительских форм расположена в диапазоне молекулярных масс от 116,0 до 10,0 кДа. Спектры значительно изменчивы и имеют компоненты, распределение и уровень экспрессии которых индивидуально практически для каждого образца (рис. 2).

Таблица 2. Характеристика гибридных растений лисохвоста поколения F₁

№ п / п	Сортообразец	Кол-во побегов шт./раст. (май)	Зеленая масса, г/растение	К-во побегов, шт./раст (сентябрь)	Масса одного побега, г	Ширина листа, мм	Длина листа, см	Семенная продуктивность, г/5 побегов	Диаметр куста, см	Сухое вещество, %
1	1/1	22	40,34	101	0,399	8-10	20,5-31,0	1,22	20	23,5
2	1/2	20	43,22	114	0,379	4,0-5,0	19,0-22,5	1,09	11	24,8
3	1/3	26	80,70	199	0,406	5,0-6,0	19,0-27,1	2,25	25	23,3
4	1/4	32	81,52	257	0,317	7,0-9,0	22,1-27,3	2,5	21	20,0
5	1/5	30	79,90	123	0,650	6,1-9,0	24,0-29,3	2,45	17	20,6
6	1/6	35	162,70	235	0,692	6,1-8,2	25,1-30,2	3,19	26	20,6
7	1/7	7	3,20	7	0,533	6,0-8,0	17,3-23,5	-	5	21,1
8	1/8	40	133,02	226	0,589	7,5-7,6	23,2-27,0	2,44	30	19,1
9	1/9	50	106,82	301	0,355	5,0-5,5	15,2-17,3	3,55	29	18,4
10	2/1	40	93,10	240	0,388	5,0-6,0	18,5-31,0	1,09	14	20,6
11	2/2	31	89,92	276	0,326	3,5-4,5	8,1-21,3	0,05	18	21,9
12	2/3	3	4,76	54	0,088	2,0-2,5	8,2-12,0	0,06	9	21,4
13	3/1	19	99,88	98	1,019	9,0-9,2	30,0-33,0	1,38	17	21,8
14	3/2	16	80,42	95	0,847	10-1,0	22,1-27,6	-	22	21,1
15	3/3	21	90,72	114	0,796	6,1-7,2	28,2-29,3	0,68	19	20,7
16	1	♀	81,26	170	0,48	9,0	15,0-25,7	2,08	23	21,3
17	2	♀	62,6	190	0,467	5,5	14,1-21,4	0,4	20	21,3
18	3	♀	90,34	102	0,800	9,0	18,0-29,6	0,69	15	21,2
19	4	♂	87,31	150	0,544	8,6	17,2-25,4	1,05	25	22,3

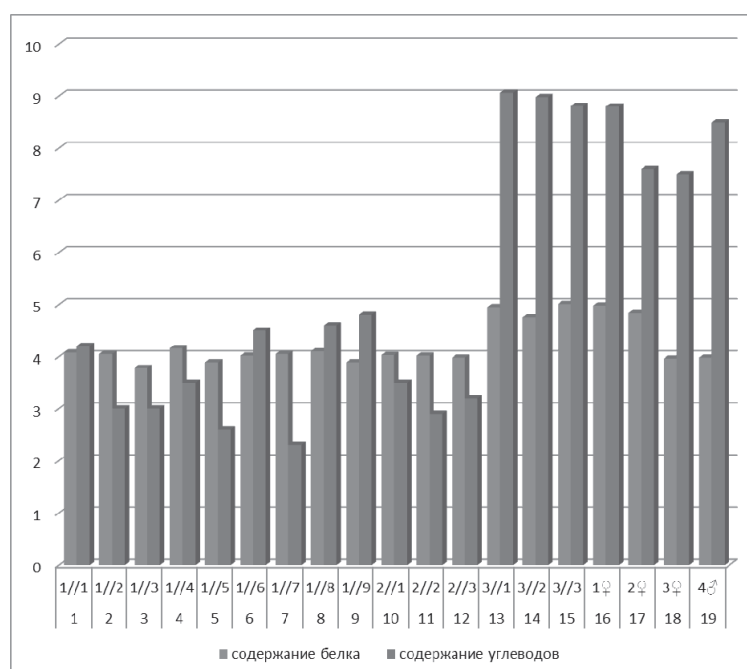


Рис. 1. Количественное определение общего белка и растворимых углеводов в листьях гибридных растений лисохвоста и родительских форм

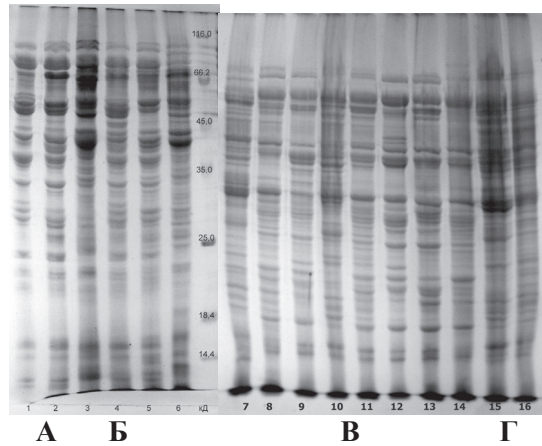


Рис. 2. Электрофоретическое разделение общих растворимых белков из семян гибридных растений лисохвоста: А (1-2) третья комбинация скрещивания; Б (3-5) материнские формы лисохвоста лугового Донской 20, Pioret, Обский, (6) – отцовская форма лисохвоста вздутого Довский; В (7-14) – первая комбинация скрещивания; Г (15-16) – вторая комбинация скрещивания

Для количественной оценки уровня изменчивости, использовались коэффициенты сходства, вычисляемые по форме: $K = [N_1 / (N_1 + N_2)] \times 100\%$, где N_1 – число пар гомологичных белковых компонентов; N_2 – число различающихся белковых компонентов. Средний коэффициент сходства ($K_{ср}$) характеризует ее изменчивость – чем меньше значение коэффициента, тем выше изменчивость. Вычисления проводились для каждой пары в трех комбинациях скрещиваний и полному электрофоретическому спектру общих растворимых белков. Сравнение внутригибридной изменчивости в трех комбинациях скрещиваний показало, что самая высокая является у растений первой комбинации скрещивания, для которых среднее значение коэффициентов сходства составляет 47-65%. Низкая изменчивость наблюдается во второй комбинации скрещивания – 86%. Достаточно изменчивыми по значениям коэффициента сходства являются третья

комбинация скрещивания – 74%.

Выводы. Результатом проведенной работы явилось создание межвидовых гибридов лисохвоста лугового (*A. pratensis*) с лисохвостом вздутым (*A. ventricorus*). Дана характеристика гибридным растениям по семенной и кормовой продуктивности, по содержанию общего белка и растворимых углеводов. Выявлена изменчивость полипептидных спектров общих белков между гибридными растениями, подтвержденная коэффициентом сходства. Отдельные гибридные растения лисохвоста имеют свои специфические белковые компоненты, что позволяет дифференцировать внутригибридную изменчивость. Комплексная оценка созданных форм межвидовых гибридов *A. pratensis* с лисохвостом вздутым *A. ventricorus* на анализирующих фонах позволила провести отбор морфотипов с высоким качеством корма и стабильной семенной продуктивностью.

Литература

1. Васько П.П. Продуктивность многолетних злаковых трав и пути ее повышения // Земледелие и растениеводство: Научные труды. – Минск: Белорусский научно-исследовательский институт земледелия и кормов. – 2000. – Вып. 37. – С. 113-119.
2. Шишлова А.М. Создание дигаплоидов зерновых культур и их использование в селекции / М. П. Шишлов и др // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук. – 2007. – №2. – С. 49-58.
3. Кондрацкая, И.П., Столепченко В.А., Фоменко Т.И. Биохимическая характеристика межродовых гибридов райграса пастбищного и овсяницы луговой // «Проблемы и пути повышения эффективности растениеводства в Беларуси»: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию образования Института земледелия. – Минск. – 2007. – С. 124-127.
4. Столепченко В.А., Кондрацкая И.П., Шишлова А.М., Васько П.П., Фоменко Т.И., Козловская З.Г. Полиморфизм хозяйственно-ценных признаков и свойств отдаленных гибридов овсяницы луговой (*Festuca pratensis*) и овсяницы тростниковой (*Festuca arundinaceae*) // Теоретические и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений: материалы III Междунар. науч. конф., посвящ. 50-летию отдела биохим. и биотехнол. растений, Минск, 14-16 мая 2008 г. / редкол.: В.И. Решетников [и др.]. – Минск: Изд. центр БГУ, 2008. – С. 177-182.

STOLEPCHENKO V.A.², VASKO P.P.², KONDRATSKAYA I.P.¹, FOMENKO T.I.¹

¹ Central Botanical Garden of NAS of Belarus,

² SPS of Agriculture of NAS of Belarus,

Belarus, 220012, Minsk, str. Surganova, 2v, e-mail: ikondratskaya@mail.ru

BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES TO SELECTING OF CREATION OF ALOPECURUS INTERSPECIFIC HYBRIDS

Aims. The first attempt to work out genomic technology selection *Alopecurus platensis* L. was made with the purposeful aim to convert genome and to expand gene pool of initial material and increase efficiency of selection. **Methods.** The subject of exploring were parental and hybrid forms *A. platensis* and *A. ventricosus* Pers. **Results.** Hybrid plants were characterized by seed and feed efficiency, by content of total protein and soluble carbohydrates. A variability polypeptide spectrum of total proteins was detected among hybrid plants confirmed by coefficient of similarity.

Key words: *Alopecurus*, hybrid plants, selection, protein.

УРБАНОВИЧ О.Ю.,¹ КУЗМИЦКАЯ П.В.,¹ КОЗЛОВСКАЯ З.А.,² АНОШЕНКО Б.Ю.³

¹ ГНУ "Институт генетики и цитологии НАН Беларуси"

Республика Беларусь, 220072, г. Минск, Академическая, 27, e-mail: O.Urbanovich@igc.bas-net.by

² РУП "Институт плодородства"

Республика Беларусь, 223013, Минский р-н, пос. Самохваловичи, ул. Ковалева, 2

³ ЦБС НАН Беларуси

Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Сурганова, 2в

ГОМОЛОГ ГЕНОВ *HcrVf* СЕМЬИ ЯБЛОНИ ИЗ ГЕНОМА ГРУШИ

Парша груши является опасным заболеванием этой культуры. Оно вызывается грибными патогенами рода *Venturia*. Сорты груши могут поражаться двумя видами *Venturia*. Уссурийская груша (*P. ussuriensis* Maxim.), груша Бретшнейдера (*P. bretschnideri* Rehd.) и груша грушелистная (японская) (*P. pyrifolia* Naka) восприимчивы к *V. nashicola*, а европейская груша (*P. communis* L.) – к *V. pirina* Aderh. [1, 2].

На пораженных паршой плодах и листьях возникают темные бархатистые пятна, при сильном поражении дерева его плоды трескаются, а листья осыпаются. Помимо этого, пораженные деревья менее морозостойки. По данным разных авторов, потери урожая груши от парши могут составлять от 50 до 70%.

Большинство возделываемых в Европе сортов груши являются в той или иной степени восприимчивыми к парше [3]. Поэтому в селекции груши приоритетным становится направление по созданию высокопродуктивных сортов, имеющих генетическую устойчивость к парше в сочетании с хорошим качеством плодов [4]. С этой целью ведется направленный поиск аллельных форм генов, обеспечивающих такую устойчивость, с целью последующего их внедрения в геномы вновь создаваемых сортов.

На сегодняшний день число известных генов груши, отвечающих за устойчивость к парше, невелико. Исследование межвидовых гибридов

груши позволило идентифицировать ген *Vn*, обеспечивающий устойчивость к *V. nashicola* [5]. В геноме японской груши сорта Kinchaku обнаружен ген *Vnk*, [6]. Он также обеспечивает устойчивость к *V. nashicola*. как и ген *Rvn2*, картированный в геноме сорта европейской груши Bartlett [7]. Идентифицированный позже у сорта европейской груши Navaга ген *Rvp1* определяет устойчивость к виду к *V. pirina* [3]. В геноме груши обнаружено также два больших QTL локуса на 3 и 7 хромосомах, ассоциированные с устойчивостью к *V. pirina* [8].

О генах яблони, обеспечивающих устойчивость к парше, известно больше [9, 10]. Клонированы и описаны гены-гомологи, получившие название *HcrVf* [11, 12]. Один из этих гомологов является функционально активным и ассоциирован с устойчивостью яблони к парше [13]. Геном груши и яблони имеет много общего в структуре и организации. [14, 15]. Их нуклеотидные последовательности идентичны на 96.35% [16]. Существует высокая вероятность, что геном груши также содержит гены устойчивости к парше, гомологичные *HcrVf* генам яблони, которые могут обладать функциональной активностью. В связи с этим, целью данного исследования являлось выделение из генома устойчивого к парше сорта груши последовательности, гомологичной *HcrVf* генам яблони, и анализ ее структуры.