

УДК 631.52

## ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ УЛУЧШЕНИЯ КАЧЕСТВА ПШЕНИЦЫ ТВЕРДЫХ СОРТОВ, АДАПТИРОВАННЫХ К КЛИМАТИЧЕСКИМ УСЛОВИЯМ РОССИИ С ОСОБЫМ АКЦЕНТОМ НА КОММЕРЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЗЕРНА

© 2018 С.Н.Шевченко<sup>1</sup>, П.Н.Мальчиков<sup>1</sup>, М.Г.Мясникова<sup>1</sup>,  
Винченцо Натולי<sup>2</sup>, Паскуале Де Вита<sup>3</sup>, Марчелла Джулияни<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Самарский НИИСХ», п.Безенчук, Самарская обл.

<sup>2</sup>ООО «Агролига Центр Селекции Растений», участник фонда «Сколково», г. Москва

<sup>3</sup>CREA – CI, Италия

<sup>4</sup>Университете г.Фоджа, факультет сельского хозяйства, Италия

Статья поступила в редакцию 06.07.2018

Реформы экономики, проведённые в России в 90-е годы XX века, привели к значительному сокращению посевных площадей под твёрдой пшеницей и значительному падению потребления продуктов её переработки. Большое количество макаронных изделий и крупы производилось в то время из более дешёвой мягкой пшеницы. Качество, питательная и диетическая ценность этих изделий значительно уступают аналогам из твёрдой пшеницы. В этот же период увеличился импорт макаронных изделий высокого качества в основном итальянского производства. В то же время климат и плодородные почвы степных районов России позволяют производить достаточное количество зерна для удовлетворения внутренних потребностей и экспортировать его в страны Европейского Союза, где зерно твёрдой пшеницы является единственным продуктом импорт, которого, не облагается пошлиной и имеет премиальную цену. Несмотря на эти условия, высокая конкуренция и требования к качеству зерна осложняют доступ отечественных производителей на рынок ЕС. Основным препятствием при этом являются европейские требования к качеству клейковины, которые значительно отличаются от нормативов отечественного ГОСТа, в соответствие с которым создаются сорта твёрдой пшеницы в России. В связи с этим противоречием (хороший климат и возможности производства с одной стороны и отсутствие адаптированных сортов необходимого качества с другой), актуальным селекционно-генетическим направлением следует признать создание отечественных сортов с высоким качеством клейковины, удовлетворяющим требования европейского рынка. Практическая реализация этого направления – цель исследований, представленных в настоящей публикации. Основная задача перед коллективом исследователей из России и Италии сводилась к поиску путей ускоренного переноса генетических систем высокого качества клейковины в генофонд адаптированных к степным регионам России генотипов и создание на основе этого исходного материала конкурентоспособных, коммерческих сортов яровой твёрдой пшеницы. В качестве базовых генотипов были использованы три линии безенчукской селекции, в качестве доноров высокого качества клейковины (параметр индекс глютена - IG) сорта Kofa (Канада), Aureo, Achille (оба Италия). В настоящей публикации приведены результаты селекции новых генотипов с высоким качеством на основе генетической системы сорта Kofa. Беккроссирование сопровождалось отбором в расщепляющихся поколениях с применением технологии геномной селекции. Растения, несущие аллель-вариации от Кофа (блок QTlna 1A хромосоме), были оценены с помощью 100 молекулярных маркёров SSR (Single sequence Repeat), покрывающих все хромосомы геномов А и В, для отбора растений, наиболее близких генетически российской линии, использованной в качестве материнской формы при скрещивании. В результате проведённой работы получены новые генотипы, названные Таганрог (Taganrog) и Бурбон (Bourbon). Эти линии в тестовых испытаниях показали величину IG равную 85 единицам, что соответствует лучшим итальянским сортам, которые особенно ценятся при производстве макаронных изделий.

**Ключевые слова:** пшеница твёрдых сортов, генетические методы улучшения, климатические условия, характеристики зерна, качество клейковины.

DOI: 10.24411/1990-5378-2018-00064

### ВВЕДЕНИЕ

Пшеница твердых сортов (*Triticum turgidum* sbsp., *durum* Desf., известная также как *Triticum durum* Desf.) является одним из основных пи-

Шевченко Сергей Николаевич, член-корреспондент РАН, доктор сельскохозяйственных наук, директор.  
E-mail: samniish@mail.ru

Мальчиков Петр Николаевич, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник.  
E-mail: sagrs-mal@mail.ru

Мясникова Марина Германовна, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лабора-

щевых продуктов в мире. Мировые площади, занятые пшеницей, составляют 250 миллионов гектаров, из которых около 10% находятся под посевами твердой пшеницы. Её отличие от мягкой (*Triticum aestivum* L.) включает ком-

тории селекции яровой твёрдой пшеницы.

E-mail: sagrs-mal@mail.ru

Винченцо Натולי, доктор сельскохозяйственных наук, руководитель департамента генетики.

Паскуале Де Вита, доктор биологических наук.

E-mail: pasquale.devita@entec.

Марчелла Джулияни, доктор биологических наук, профессор.

плекс морфологических признаков и особенности химического состава зерна. Этот вид пшеницы имеет удлиненное, широкое, твердое с ярко-желтым цветом и повышенным содержанием белка зерно, которое используется для производства широкой гаммы продуктов. Основная масса выращиваемого зерна идет на изготовление макаронных изделий. Современная технология производства пасты требует специальных сортов, отличающихся высокими показателями твердости, стекловидности зерна, наличию в нём каротиноидных пигментов, которые придают макаронным изделиям классический желтый цвет, высоким содержанием белка и хорошим качеством клейковины, оцениваемому по индексу глютена (IG). Последний показатель очень важен для широкого применения технологии высокотемпературной сушки макаронных изделий, кардинально увеличивающей производительность и эффективность производства пасты. Эта технология производства макарон в настоящее время широко применяется в Европе, Северной Америке и Австралии. В России также применяют эту технологию особенно на предприятиях с участием иностранного капитала. Основным препятствием для её повсеместного распространения в России и странах СНГ является отсутствие сортов с требуемой генетической основой качества клейковины.

Целью настоящей работы были поиск путей ускоренного переноса генетических систем высокого качества клейковины в генофонд адаптированных к степным регионам России генотипов и создание на основе этого исходного материала конкурентоспособных, коммерческих сортов яровой твёрдой пшеницы. Реализация этой программы на первом этапе исследований включала оценку качества различных линий твёрдой пшеницы, имеющих в России и предоставленных Самарским НИИСХ в распоряжение итальянских исследователей (Crea-CI Italy, Факультет сельского хозяйства Университета г. Фоджа ) и российского предприятия Agroliga Plant Selection Center участника фонда «Сколково». Изучение качественных параметров этих селекционных линий, в частности оценка индекса глютена (IG), позволило установить, что величины этого индекса у всех генотипов значительно меньше требований стандартов наиболее премиального европейского рынка. В то же время итальянские селекционные линии, изученные в одном и том же полевом эксперименте в условиях Среднего Поволжья (Самарский НИИСХ), отличающиеся высоким качеством клейковины по IG, показали низкий уровень адаптации по урожайности, - примерно 30-40% относительно местных сортов. Эти результаты инициировали второй

этап исследований, с задачами осуществления рекомбинации генетических систем адаптивности и качества клейковины, носителями которых являются российский и итальянский селекционный материал соответственно. Для этого были отобраны три российские линии лучшие по урожайности, адаптации и устойчивости к болезням. Выбор этих линий был сделан по результатам трехлетних экспериментов в условиях Самарского НИИСХ. Они были включены в систему скрещиваний и беккроссирования с сортами Kofa, Aureo и Achille. В данной статье приведены результаты изучения потомства, полученного от скрещивания с сортом Kofa.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исходный генетический материал – источники адаптивности и высокого качества клейковины. В качестве рекуррентных родительских генотипов использованы российские сорта и новые селекционные линии (оригинатор Самарский НИИСХ), отобранные по результатам полевых экспериментов в 2016 и 2017 гг., по урожайности и адаптивности. В качестве доноров генетических систем качества клейковины использованы сорта: Kofa (Канада), Achille, Aureo (Италия). В 2016 г. были изучены 50 генотипов в том числе 6 сортов, включённых в реестр селекционных достижений, 38 селекционных линий и 6 итальянских сортов. В 2017 г. испытания были продолжены с 18 лучшими по данным изучения в 2016 году линиями, в том числе с 4-мя сортами, включёнными в реестр селекционных достижений и 6-ю новыми итальянскими линиями. Условия для формирования урожайности в годы изучения очень сильно различались. В 2016 году отмечены засуха, сильные эпифитотии фузариозной листовой пятнистости, стеблевой ржавчины, в средней степени наблюдалось распространение мучнистой росы. В 2017 году очень благоприятные условия температурного режима, большое количество осадков и незначительная патогенная нагрузка в процессе роста растений и налива зерна, способствовали формированию высокого урожая. Средняя урожайность в 2017 году (4,2т/га) была в 3 раза выше, чем в 2016 году. Оценка качества зерна в оба года проведена по содержанию белка, каротиноидных пигментов, IG, SDS микроседиментации и профилю одномерного SDS-page по электрофоретическим спектрам глютенина - *HMW* (высокомолекулярный) и *LMW* (низкомолекулярный), а также по спектру блоков глиадина.

Схема и процедуры селекции. Три лучшие линии по результатам испытаний 2016 г. были скрещены с сортом Кофа - донором блока генов

(Qtl на 1А хромосоме) по увеличению IG. После самоопыления поколения F1 было получено около 500 растений F2 по каждому отдельному скрещиванию (в трех скрещиваниях всего 1500 растений). На стадии трех листьев от каждого растения были взяты растительный материал для выделения ДНК и определения присутствия нужного блока генов (Qtl -1A). Растения, несущие аллель-вариации Кофа (блок QTL на 1А хромосоме), были оценены с помощью 100 молекулярных маркеров SSR (Single sequence Repeat), покрывающих все хромосомы геномов А и В, для отбора растений, генетически наиболее близких российской линии, использованной в качестве материнской формы при скрещивании. Отобранные растения были выращены в камере интенсивного выращивания, где с помощью регулировки температуры и времени освещения было стимулировано интенсивное кущение, каждое раскустившееся растение, было клонировано путем прореживания и высаживания на среду с интенсивным корневым развитием. Таким путем было получено по 20 клонов от каждого отобранного растения в F2. Это позволило получить достаточное количество семян для проведения тестов (фенотипирования) качества по SDS микроседиментации и SDS-page для контроля электрофоретических спектров глютеина (HMW, LMW) и глиаина. Было отобрано 10 растений по каждому скрещиванию со всеми желаемыми характеристиками. Каждое растение было повторно скрещено с российской линией и по каждому прародителю F2BC1 были отобраны только линии с аллель-вариациями от Кофа (блок генов Qtl на 1А хромосоме). Как и с растениями F2, здесь также были проведены процедуры клонирования растений и фенотипирования качества клейковины. В этом цикле также было сохранено 10 растений с необходимыми характеристиками для повторного скрещивания (BC2). Все операции генотипирования, геномной селекции, фенотипирования качества клейковины и клонирования линий, были аналогичны проведенным на предыдущих этапах (F2, F2BC1). Часть семян, отобранных растений, была оставлена для размножения. Другая часть была параллельно с размножением использована для анализа качества клейковины. При этом был добавлен анализ по %UPP (Unextract polymeric protein) - процент не извлекаемых полимерных белков. В результате в F2BC2 были отобраны 3 растения – по одному для каждого скрещивания и только потомства 2-х растений были размножены in vitro, получено 10000 растений каждой линии, которые были использованы для размножения и получения коммерческой партии семян. На рис 1 показана схема и порядок выполнения всех представленных выше работ.

Русская линия (материнская форма) x итальянская линия (отцовская форма)  
Геном RS X Геном IT + QTL

↓ 1° СКРЕЩИВАНИЕ

F1 Растение с цитоплазмой русской линии X Русская линия

(50% Русский геном и 50% итальянский геном)

↓ САМООПЫЛЕНИЕ F1  
РАСТЕНИЯ F2

Селекция растений F2 по каждому F1, носителю нужных диапазонов SDS, блоки QTLs по коэффициенту клейковины (анализ SDS в связке с коэффициентом клейковины), тест 100 SSR (Single Sequence Repeat) по отбору растений с наибольшей долей в геноме русской линии и оценка Мономерного SDS-Page по селекции нужных диапазонов.

↓ 2° СКРЕЩИВАНИЕ

F2BC1 Растения, прошедшие селекцию по блоку генов (Qtl)s, коэффициенту клейковины (SDS) и наибольшему геному русской линии с цитоплазмой: русская линия X Русская линия

(75% Русского генома и 25% итальянского генома)

Селекция растения BC1 с нужными QTLs и с геномом наиболее близким к русской линии и снова скрещенная с русской линией. Анализ SDS microsedimentaion и %UPP.

↓ 3° СКРЕЩИВАНИЕ

F2BC2 Растения с цитоплазмой: русская линия X Русская линия

90% Русского генома и 10% итальянского генома)

Селекция растения F2BC2 с нужными QTLs и с геномом (100 SSR marker), наиболее близким к русской линии, и самооплодотворение последнего. Анализ SDS microsedimentaion и %UPP

↓ 4° РАЗМНОЖЕНИЕ IN VITRO

Размножение in vitro растения F2BC2S1, растение с 95% русского генома и качественными итальянскими блоками QTLs. Получение 300.000 ростков для пересадки в делянки 2000 кв.м.

↓ 5° РАЗМНОЖЕНИЕ

Размножение в поле площадью 2000 кв.м. производством 400 кг семян.

**Схема – рис. 1.** Порядок выполнения всех работ по переносу генов качества клейковины в российский генофонд

Взятие геномной ДНК. Была осуществлена стандартная процедура взятия геномной ДНК, применяемая и повторяемая на любом образце зерновых. Взятие проведено из материалов листьев, полученных от смешивания проб 20 рас-

тений, выращенных в торфяной теплице. Фаза отбора листовых проб определялась состоянием растений, выращенных в торфяной теплице, при полном развитии 3–4-х листьев, то есть с запасом в 10 дней до крайнего срока. Сразу после сбора материал был лиофилизирован, а затем мелко перемолот с использованием ступки с добавлением стерильного кварцевого порошка. Решение о взятии ДНК из листьев, а не непосредственно из зерна, связано с более высокой чистотой извлекаемой из листового материала ДНК.

Выбор маркеров **SSR (Single Sequence Repeat)**, ассоциированных с наиболее близким блоком генов (**QTL (Quantitative Trait Loci)**), при проверке значения индекса глютена, и компонента спектра высокомолекулярного глютеина- **HMW (High Molecular Weight)**, ассоциированного с локусом **GLU-B1**.

В процессе селекции были использованы молекулярные маркеры для перевода в нужные линии основных **QTLs (Quantitative Trait Loci)**. Для выполнения данной программы было решено использовать два маркера блоков **QTLs (Quantitative Trait Loci)**, которые в большей степени ассоциированы с хорошим показателем **IG** и микроседиментации - **SDS**, то есть блоки **QTLs**, имеющиеся в сорте Кофа и обнаруженные Bubby et al. (2008), расположенные на хромосоме 1 A в интервале между двумя маркерами **SSR Barc 148** и **SNP (Single Nucleotide Polymorphism) BM140362** и на хромосоме 1 B в соответствии с блоком **Glu-b1** высокомолекулярных глютеинов (**HMW: High Molecular Weight**). В отношении блока **Qtl**, расположенного на хромосоме 1 B, работу с применением молекулярных маркеров не проводили, ограничившись оценкой наличия аллеля **HMW** от Кофа (6+8), который оказался отличным от того, который имели отобранные российские линии (аллельный вариант - 7+8). Эти два блока **Qtl** обеспечивали нам не менее 40% вариативности по **IG**.

Выбор маркеров **SSR (Single Sequence Repeat)** для характеристики генотипа линий. При характеристике генотипа использовались результаты работы Natoli. V (2008). В соответствии с методикой были, на основании информативности (**PIC: InformationContent**), отобраны 100 **SSR (Single Sequence Repeat)** маркеров с тем, чтобы ими были представлены все аллельные формы отличные от двух родителей 3371 и сорта Кофа. Кроме того, для правильной характеристики линий, 100 пар праймеров, соответствующих такому же количеству маркеров-микросателлитов (**SSR**), были отобраны также для того, чтобы обеспечить хорошее покрытие двух геномов A и B пшеницы твердых сортов. Обычно эти праймеры имеют высокую специализацию по локусам и только в немногих случаях последовательности, используемые для создания праймеров,

оказывались идентичными на уровне 2 гомеологичных геномов, допуская одновременное применение микросателлитных локусов в обоих геномах A и B. Используемые **SSRs** включают в себя i) общедоступный набор, имеющийся в базе данных GrainGenes (<http://wheat.pw.usda.gov>): **WMC (Xwmc, Gupta et al., 2002)**, **BARC (Xbarc, Song et al. 2002 и 2005)**, **CFA** и **CFD (Xcfa и Xcfd Sourdille et al. 2001; Guyomarc'h et al. 2002)** и **WMS (Xgwm)**, (Röder et al., 1998; Somers et al., 2004; Sourdille et al., 2004). В работе Natoli. V (2008), уровень полиморфизма каждого локуса **SSR**, был выражен коэффициентом полиморфизма, известным как **PIC ("Polymorphic Information Content"** или **gene diversity index**), в котором учитывается как количество аллелей, имеющихся в определенном локусе, так относительная частота каждого аллеля (Anderson et al., 1992, Kremer et al., 1998). Этот показатель рассчитывается по формуле:  $PIC = 1 - \sum p_j^2$ , где  $p_j$  – частота  $j^{\text{го}}$  аллеля в рассмотренных линиях. Коэффициент **PIC** представляет собой вероятность того, что в определенном локусе две линии, выбранные случайно из анализируемых, отличаются друг от друга. Полученное значение **PIC** по каждому локусу было сопоставлено с максимальным теоретическим значением, достижимым в зависимости от числа имеющихся аллелей. Коэффициент **PIC** достигает максимального значения, когда все аллели равномерно распределены по линиям (то есть имеют одинаковую частоту). При выборе локуса **SSR** принимался во внимание другой дополнительный коэффициент **PIC** (также рассчитываемый на основании работы Natoli. V (2008) – "число эффективных аллелей" ("effective number of alleles"), обозначаемый как **Ae**:  $Ae = 1 / (1 - PIC)$ ). Он представляет собой теоретическое число аллелей, имеющих каждая одинаковую частоту в изучаемом материале, в котором значение **PIC** равно реально наблюдаемому значению в данном локусе. Значение **Ae** всегда меньше наблюдаемого числа аллелей. Чем сильнее значение **Ae** приближается к наблюдаемому, тем выше уровень информативности и дискриминационности (возможности разделения) локуса (Kremer et al., 1998).

Количественные анализы или фенотипирование качества клейковины. **SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis**, то есть электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) использовался для анализа белковых экстрактов. Принцип, на котором основывается эта технология электрофореза, заключается в действии денатурата **SDS**; он способен интегрироваться с белками в постоянном соотношении 1,4 г **SDS** на каждый грамм белка. Сепарация происходит из-за разницы молекулярного веса, учитывая то, что соотношение

масса/заряд для каждого денатурированного белка с SDS остается постоянным.

**Коэффициент седиментации – SDS test** (Dick and Quick 1983), показывает полученный объем осаждения в определенных условиях из взвеси одного образца муки в растворе молочной кислоты и додецилсульфата натрия (SDS). Методика использует свойство резервных белков желатинировать в присутствии SDS; чем больше объем осаждения, тем выше реологическое качество муки или крупки. Количество использованного образца составляет один грамм (микроседиментация). Коэффициент четко ассоциирован с индексом глютена (IG) (J. Ross *et al. Can J. Plant* 2009). Этот тест был использован для оценки силы клейковины у родительских линий, F2, F2Bc1 и F2Bc2, где количество крупки было ограниченным.

Индекс глютена (IG, AACC Method 38-12) применялся для оценки российских линий, выращенных в 2016 г. на экспериментальном поле Самарского НИИСХ, характеризует силу внутримолекулярных и межмолекулярных связей, определяющих силу и прочность клейковины. Проведено сравнение этого показателя с уровнем SDS седиментации и электрофоретическими спектрами проламиновых экстрактов в SDS-Page, для уверенности отбора на начальных этапах селекции.

**Size exclusion fast performance liquid chromatography (SE-FPLC)** (Жидкостная хроматография с высокой степенью исключения), из каждого образца крупки, было взято две вытяжки (SDS-извлекаемые белковые полимеры и SDS-неизвлекаемые белковые полимеры) в соответствии с Morel *et al.* (2000) с поправками, описанными Tronsmo *et al.* (2002). Пропорция SDS-белковых полимеров в вытяжках из общего количества белковых полимеров (%UPP) рассчитывалась по формуле  $[F1^*/(F1^* + F1)] \times 100$ , а процент белковых мономеров от белковых полимеров рассчитывался по формуле  $(F3+F4)/(F1^*+F1+F2)$ , где F1\*= большие неизвлекаемые полимеры, с F1 по F4=иные извлекаемые белковые полимеры.

**Размножение in vitro.** Размножение in vitro производилось, начиная с семени, проросшего на агаре, содержащем основную смесь Murashige and Skoog basal (medium), с добавлением гиббереллиновой кислоты для облегчения развития стеблей, начиная с клеток зачаточного колоса. Прорастание происходило при 18°C при 8 часов освещении в сутки. После прорастания температура доводилась до 12°C без изменения времени освещения. По мере того, как формировались стебли побегов кушения, они извлекались и помещались в другой сосуд с агаром того же состава и при тех же условиях роста.

Анализ генетической схожести м при помощи маркеров **SSR (Single sequence Repeat)**. В матрицах генетической схожести (GSij) из возможных пар линий, включая два родителя скрещивания, оценивалось 100 уже отобранных маркеров SSR (Single Sequence Repeat), использованных в работе Natoli.V (2008). Идентификационный номер каждой аллели по отдельному маркеру был выражен числом от 1 до 4 (количество форм аллелей на использованные маркеры) для их анализа. Схожесть между парами линий рассчитывалась по коэффициенту схожести "Simple matching": пропорция маркеров, представляющих одни и те же аллели. Указанный коэффициент рассчитывался по следующей формуле:  $GSij = m/n$ , где m = число вариантов аллелей отдельного маркера SSR, показывающих совместимость их состояния, то есть одинаковое число вариаций в i и j (в нашем случае соответствует номеру маркера, по которому наши линии показывают ту же аллель), n = общее число сравнимых маркеров. Коэффициент различия по каждому из локусов SSR был рассчитан по формуле  $GD = 1 - \sum p_j^2$ , где p-частота j<sup>я</sup> аллели внутри популяции (Powell *et al.* 1996). Расчет генетической схожести проведён с использованием программы SIMQUAL пакета NTSYS-pc ver. 2.0 (Rohlf, 1997). На основании, полученных таким образом матриц схожести был выполнен кластерный анализ и были построены соответствующие диаграммы по методу UPGMA ("Unweighed Pair-Group Method Arithmetic Average") («Метод расчёта средней арифметической неравномерных парных групп») с использованием программы Jump8.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Предварительная агрономическая и качественная оценка российских и итальянских линий в условиях экспериментального поля Самарского НИИСХ. В 2016 г. изучались 48 генотипов в том числе 6 российских сортов, включённых в реестр селекционных достижений и 6 итальянских линий. Результаты изучения качества по IG, представленные в табл. 1., показывают низкие значения этого индекса у российских линий и сортов и подтверждают высокий уровень итальянских линий при выращивании в условиях Среднего Поволжья. Анализ диапазонов SDS-Page, касающиеся линий, испытанных в г. Самара в 2016 г., показывают, что ни одна российская линия не имеет того же профиля относительно сорта, референсного по качеству, а именно Кофа (рис. 2), что стало для нас подтверждением того, что диапазон Кофа (Glu.B1) может быть легко оценен для передачи в выбранные российские линии.

**Таблица 1.** Предварительная агрономическая и качественная оценка российских и итальянских линий в условиях экспериментального поля Самарского НИИСХ, Безенчук, 2016г.

Сорт	Урожайность Безенчук, 2016 г.		Белок (%)	Индекс желтизы (коорд. b)	Клейковина влажная (14%)	Клейко- вина сухая t.q.(%)	Клейко- вина сухая s.s. (%)	Индекс глютена (%)
	т/га	% St Б 210	Метод Infrate с ± 1,00 %	Метод Minolta ± 2,00	Метод UNI N. 10275 - 01/1994	Метод UNI N. 10275 - 01/1994	Метод UNI N. 10275 - 01/1994	Метод UNI N. 10690 - 09/199711- 15
Sp3/5	3,35	130,2	14,2	28,2	30,5	9,9	11,8	63,5
Sp3/7	2,99	116,2	14,3	27,1	26,8	8,6	10,2	64,3
Sp3/6	2,96	115,1	15,0	27,6	36,1	11,7	13,9	32,1
Sp3/3	2,73	106,2	14,6	30,8	31,0	10,4	12,3	29,9
Sp3/4	2,64	102,7	14,6	26,9	29,8	10,4	12,4	65,6
Sp3/9	2,61	101,7	13,6	26,5	27,1	9,0	10,8	18,8
Sp3/2	2,40	106,1	14,6	32,1	32,4	10,7	12,7	68,5
Sp3/8	2,09	81,3	14,0	25,3	28,4	9,5	11,3	68,4
Sp3/10	1,99	93,2	14,1	25,4	24,1	7,8	9,3	66,6
1961d-14	1,85	97,1	13,4	33,0	27,7	9,1	10,8	67,5
Sp3-1	1,82	80,3	14,5	31,8	31,7	10,5	12,5	67,5
1653d-8	1,72	101,4	14,1	28,5	30,4	9,9	11,8	52,5
1874d-2	1,72	117,3	13,6	27,1	28,2	9,0	10,7	68,3
1469d-59	1,64	112,2	15,1	30,0	31,7	10,5	12,5	63,5
1970d-1	1,64	112,0	13,9	28,2	30,7	10,3	12,2	61,4
Sp3-1	1,63	114,5	13,5	31,8	27,8	9,1	10,8	61,3
1927d-1	1,63	93,9	12,6	27,3	25,5	8,1	9,7	65,3
1970d-2	1,61	110,3	14,6	28,1	30,8	10,2	12,2	60,3
Б210	1,59	100,0	14,4	27,1	30,3	9,6	11,5	32,2
1874d-6	1,57	107,4	14,0	26,4	29,1	9,4	11,3	66,2
1874d-2	1,55	89,2	13,9	28,3	25,1	8,5	10,2	2,6
Золотая	1,53	96,3	14,8	25,6	24,7	8,4	10,0	68,6
1322a-19	1,53	107,5	13,3	31,7	28,4	9,4	11,2	60,5
Триада	15,2	90,0	14,8	21,5	16,6	6,0	7,1	68,6
2024d-3	1,50	102,6	13,8	29,3	30,3	9,8	11,7	57,3
1528d-67	1,48	101,0	13,9	25,4	25,9	8,5	10,1	61,5
1967d-21	1,46	83,7	14,1	28,3	29,1	9,5	11,4	59,5
1953d-3	1,46	99,7	13,6	23,3	25,0	8,2	9,8	64,1
БЗ	1,45	101,4	15,2	31,1	34,6	11,5	13,8	62,7
1938d-5	1,44	82,8	14,3	22,2	27,7	9,3	11,1	67,5
марина	1,33	93,1	14,4	24,5	28,4	9,3	11,1	51,5
Б209	1,33	83,4	14,5	23,5	16,4	5,6	6,7	67,5
Б209	1,31	91,6	14,6	23,1	8,8	1,0	1,2	68,5
Италия	0,63	39,4	20,0	24,2	50,0	16,4	19,4	87,9
Италия	0,55	34,3	20,7	22,1	48,0	15,9	18,9	88,5
Италия	0,49	30,7	20,0	24,3	51,1	16,4	19,5	88,5
Италия	0,48	30,4	20,0	23,6	45,2	14,8	17,6	89,6
Италия	0,31	19,7	19,9	19,6	42,9	13,9	16,5	84,6
Италия	0,29	18,6	19,8	19,6	39,4	12,8	15,2	90,5
СРЕДНЕЕ	1,60	90,9	14,9	26,3	30,3	9,9	11,8	61,7
НСРО,05	0,21							

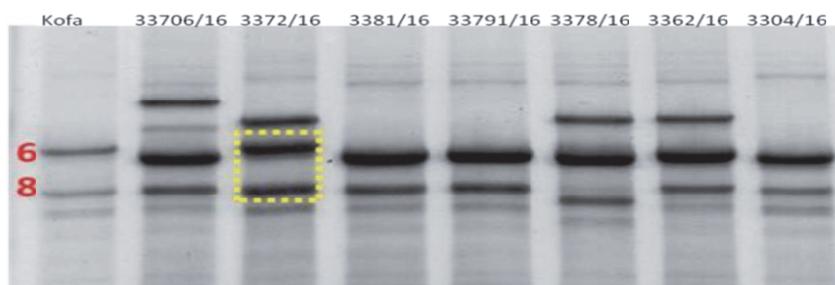


Рис. 2. Пример SDS-Page (диапазоны, обнаруженные на российских линиях), испытания в г. Безенчук, 2016 г.

Таблица 2. Агрономическая и качественная оценка российских и итальянских линий в условиях экспериментального поля Самарского НИИСХ, Безенчук, 2017 г.

Сорт	Происхождение	Урожай, т/га	Критерий Дункана	Дата колошения, июль	Устойчивость /Восприимчивость к патогенам			
					Perynophora triticirepentis, R...S,%		Blumeria graminis	Puccinia graminis
					Трубкавание	Цветение	тип/%	тип/%
Без.209	стандарт низкорослый (генRht1B1b)	3,13	ab	05	R	MR (10)	4/5.	4/5.
Без.210	основной стандарт среднерослый (RhtAnh)	4,96	jk	03-04	R/MR	R/MR	4/5.	4/5.
Без.золотистая	скороспелый стандарт среднерослый (RhtAnh)	4,45	f-j	01	R	R	4/10.	4/7,5.
Золотая	Позднеспелый стандарт	4,36	g-k	08	R	R	R	4/3.
GSD-399	Италия	4,28	e-j	04	R	R(5)	R	4/5.
GSD-30	Италия	4,37	g-j	04	R	R	R	4/5.
CANNAVARO	Италия	3,77	b-f	06	R	R	4/5.	4/15.
PIETRAFITIA	Италия	2,68	a	04	S(40)	S(50)	R	4/3.
QULRATO	Италия	3,22	a-c	03	S(30)	S(40)	R	4/3.
TORREBIANA	Италия	3,30	a-c	04	MR/MS(20)	MR/MS(20)	R	4/10.
1591D-21 (Триада)	Без. 209/646D-37 (Rht1B1b)	4,37	g-j	05	R	R	R	4/5.
1916D-14	Марина/Без золотист	4,82	h-k	04	R	R	4/10.	4/5.
1970D-2	495D-7/Без.золотистая	3,87	c-f	05	R	R(5)	4/25.	4/5.
SP-3/2	Безенчук. Нива /653d-58	5,17	k	03	R	R	4/10.	4/5.
1469D-59 (Taganrog)	495D6/Марина	4,89	i-k	04	R	R	R	4/5.
1874D-2	Безен.207/Безен. нива	3,85	c-f	03	R	R	4/5.	4/5.
SP-3/8	1694D-4/653D-58	4,09	d-g	06	R	R	4/5.	4/5.
m=5,32%								
HCP0,05		0,61						

В то же время по урожайности все российские линии и сорта значительно превосходили итальянские сорта.

К лучшим линиям, подтвердившим высокий уровень адаптивности в 2017 году (табл. 2), с неплохим уровнем качества и хорошим выходом зерна отнесены: 1591Д-21 – Триада, SP3/2, 1469Д-59 (табл. 3).

Эти линии были включены в качестве материнских компонентов в гибридизацию с сортом Кофа для получения рекомбинантов, несущих блок QTL на хромосоме 1А и электрофоретические компоненты глютеинового блока GluB-1 от сорта Кофа и коадаптированный блок генов приспособленности к условиям Среднего Поволжья от линий местной селекции.

Анализ генетической схожести по маркерам **SSR (Single Sequence Repeat)**. Анализ схожести растений в популяциях F<sub>2</sub>, полученных от скрещивания с тремя отобранными российскими линиями, показал, что уже в F<sub>2</sub> возможно выделить линии с нужным блоком QTL от сорта Кофа и необходимой аллелью электрофоретического спектра блока компонентов глютеина Glu-B1,

также соответствующим сорту Кофа, которые по другим маркерам генетически наиболее схожие с российской линией, использованной в качестве материнского родителя (таб.4 А ; В; Рис.3. А; В).

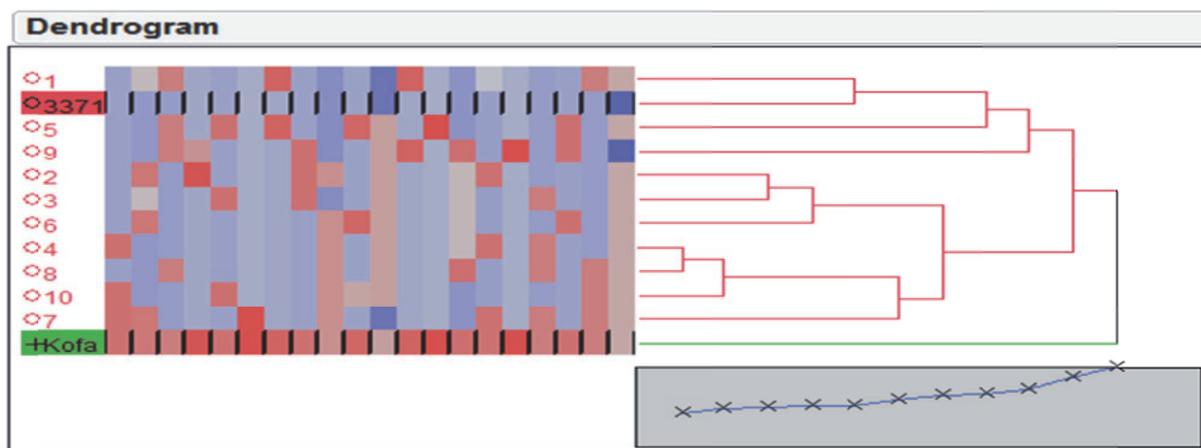
Эта технология подтвердила целесообразность её применения для достижения цели – получения рекомбинантов генов качества и адаптивности. После второго повторного скрещивания и выделения линии (07) генетически очень схожей с российской линией, анализ генетической схожести показал, что цель была достигнута (Рис.3 В). Оценка фенотипа подтверждает эту схожесть, действительно, выбранная линия неотличима от российской линии 3371 (1469Д-59), использованной для сопоставления. Это же было сделано в отношении скрещивания с российской линией 3379 (SP-3/2) (данные не приводятся). Анализ качества по **SDS седиментации SE-FPLC (Size exclusion fast performance liquid chromatography** -Экспресс-хроматография с высокой степенью исключения). Две линии F<sub>2</sub>BC<sub>2</sub>, идентифицированные в процессе селекционной работы с двумя популяциями, полученными от скрещивания сорта Кофа с ли-

**Таблица 3.** Идентифицированные в сортах и линиях безенчукской селекции аллели локусов Glu A-3 и Glu B-1, Безенчук, 2016 г.

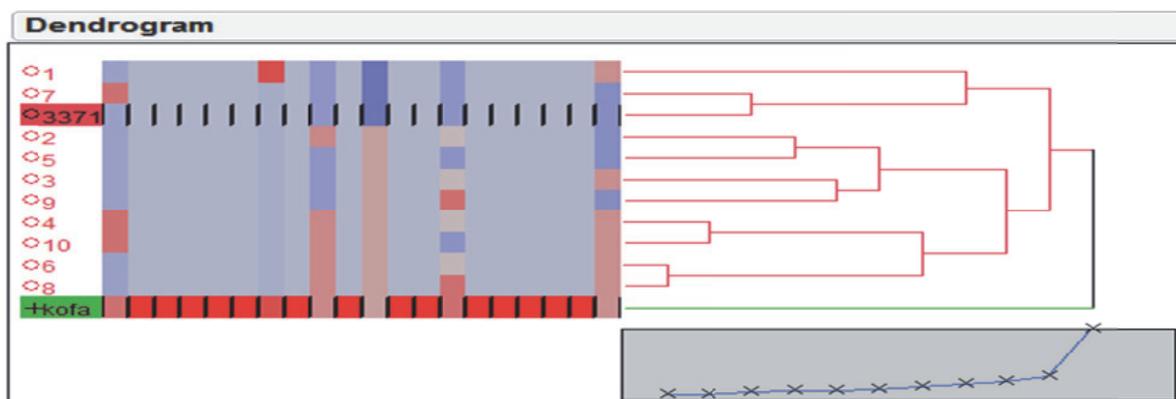
Сорт	Происхождение	Аллели локусов	
		GluA-3	GluB-1
1528D-67	Памяти Чеховича / Безенчукская нива	N	6+8
SP-3/4	653D-58/B207	N	7+8
1469D-59	495D-6/Марина	N	7+8
1916D-2	Марина/653D-44	N	7+8
SP-3/8	1694D-4/653D-58	N	7+8
1591D-21	B209/646D-37	N	7+8
Золотая	B205/837D-22	N	7+8
Без. 209	Г942/Г1434	N	7+8
1970D-1	495D-7/653D-44	1	7+8
1970D-2	495D-7/653D-44	1	7+8
SP-3/10	B209/1464D-4	1	7+8
1874D-2	B207/BN	2*	6+8
1429D-10	ICARO/B202	2*	7+8
1322A-19	PD44/SZ//D2005/3/451D-5	2*	7+8
1967D-1	495D-22/1464D-4	2*	7+8
1938D-5	Донская элегия/653D-58	2*	7+8
SP-3/5	653D-58/B207	2*	7+8
SP-3/7	653D-58/B207	2*	7+8
1927D-1	653D-58/B207	2*	7+8
SP-3/1	BN/653D-58	2*	7+8
SP-3/2	BN/653D-58	2*	7+8
1916D-14	Marina/BZ	2*	7+8
<b>Кофа</b>	Стандарт (донор качества)	N	6+8

**Таблица 4 .** А) Расстояние популяции F2; В) Расстояние популяции F2BC2

А				В			
номер кластера	расстояние	основная линия	ассоциированная линия	номер кластера	расстояние	основная линия	ассоциированная линия
11	2,951495	4	8	11	0,84699	6	8
10	3,30205	4	10	10	0,84699	4	10
9	3,426896	2	3	9	1,436141	7	1469D-59 (код3371)
8	3,564303	2	6	8	1,597099	2	5
7	3,573413	1	1469D-59 (код 3371)	7	1,613414	3	9
6	4,034812	4	7	6	1,815022	2	3
5	4,43412	2	4	5	2,357919	4	6
4	4,550319	1	5	4	2,757134	1	7
3	4,906437	1	9	3	3,2999606	2	4
2	5,93352	1	2	2	4,391424	1	2
1	6,873258	1	Кофа	1	12,85216	1	Кофа



А



В

**Рис. 3.** А – Дендрограмма популяции F2; ; В – Дендрограмма популяции F2BC2

ниями 3371 и 3379, и имеющие блок Qtl Кофа по хромосоме 1А, по IG, компонентам глютеина в локусе Glu-B1 также от Кофа, были изучены через **SE-FPLC (Size exclusion fast performance**

**liquid chromatography)** и SDS седиментации. Полученные значения показали очень хороший уровень качества клейковины, даже выше, чем у сорта Кофа (табл.5).

Таблица 5. SE-FPLC (Size exclusion fast performance liquid chromatography)

Образец	F1*	F1	F2	F3	F4	Total	% F1*	F1 %	% F2	% F3	% F4	F1*+ F1	F3+ F4	F1*+ F1 +F2	Mon/pol	UPP %
Кофа	40,3	103,0	42,3	109,6	147,6	442,7	9,1	23,3	9,6	24,8	33,3	143,2	257,2	185,5	1,4	28,1
07 (genotip) 3371	22,1	40,2	33,9	60,2	117,8	274,1	8,1	14,7	12,4	22,0	43,0	62,2	178,0	96,1	1,9	35,5
01 (genotip) 3369	36,0	40,7	51,1	87,7	177,2	392,6	9,2	10,4	13,0	22,3	45,1	76,7	264,9	127,8	2,1	47,0

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bubcivsky et al.* QTL analysis of pasta quality using a composite microsatellite and SNP map of durum wheat *Theor Appl Genet* (2008) 117:1361–1377
2. *Dick and Quick*. A Modified Screening Test for Rapid Estimation of Gluten Strength in Early-Generation Durum Wheat Breeding Lines. *Cereal Chem* 1983. 60: 315 – 318.
3. *Gianibelli et al.* Relationships between biochemical parameters and quality characteristics of durum wheats. 1995: Pages 146-152 in: *Wheat Structure, Biochemistry and Functionality*. J. P. Schofield, ed. RACI: Melbourne.
4. *Kremer et al.* Measures of polymorphism within and among populations. In: *Molecular tools for screening biodiversity. Plants and animals*. 1998. Karp A., Isaac P., and Ingram D. S. (Eds.) Chapman & Hall London. Pp. 302-311.
5. *Natoli V.* Ph.D Tesis. 2008: Isolation in the wheat of durum varieties of genes involved in the mechanisms of adaptation of water stress in the Mediterranean environment
6. *Morel et al.* Effects of temperature, sonication time, and power settings on sizedistribution and extractability of total wheat flour proteins as determined by size-exclusion high-performance liquid chromatography. *Cereal Chem* 2000:77:685–691 (2000).
7. *Röder et al.*, A microsatellite map of wheat. *Genetics* 1998:149: 2007-2023.
8. *Rohlf*. 1997:NTSYS-pc version 2.0. Exter Press, Setauket, NY. USA.
9. *Ross J. et al.* Gluten index compared with SDS-sedimentation volume for early generation selection for gluten strength in durum wheat Ca. *J. Plant* 2009
10. *Somers et al.* A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum L.*). 2004. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1105-1114.
11. *Sourdille et al.* Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum L.*) *Funct. Integr. Genomics*. 2004: 4- 12-25.
12. *Tronsmo et al.* A study of how size distribution of gluten proteins, surface properties of gluten and dough mixing properties relate to baking properties of wheat flours. *J. Cereal Sci.* 2002: 35:201–214 (2002).

**GENETIC METHODS OF IMPROVING WHEAT QUALITY OF DURUM CULTIVARS  
ADAPTED TO CLIMATE CONDITIONS OF RUSSIA WITH SPECIAL ACCENT  
ON COMMERCIAL CHARACTERISTICS OF GRAIN**

© 2018 S.N. Shevchenko<sup>1</sup>, P.N. Malchikov<sup>1</sup>, M.G. Myasnikova<sup>1</sup>,  
Vincenzo Natoli<sup>2</sup>, Pasquale De Vita<sup>3</sup>, Marcella Giuliani<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Samara Research Scientific Institute of Agriculture, Bezenchuk, Samara Region, Russia

<sup>2</sup> Limited Liability Company “Agroliga Center for Plant Breeding”, participator of the Skolkovo Foundation, Moscow, Russia

<sup>3</sup> CREA - CI, Italy

<sup>4</sup> University of Foggia, Faculty of Agriculture, Italy

Economic reforms carried out in Russia in the 90 years of the 20th century led to a significant reduction in the acreage under durum wheat and a significant drop in consumption of processed products. A large number of pasta and grouts were produced at that time from inexpensive soft wheat. The quality, nutritional and dietary value of these products is considerably inferior to products to those from durum wheat. In the same period, the import of high-quality pasta has increased, mainly from Italy. At the same time, the climate and fertile soils of the steppe regions of Russia allow producing enough grain to meet domestic needs and export it to the countries of the European Union where the grain of durum wheat is the only import product that is not taxed and has a premium price. Despite these conditions, high competition and requirements for grain quality complicate the access of domestic producers to

the EU market. The main obstacle in this case are the European requirements for the quality of gluten, which significantly differ from the standards of the Russian standard, in accordance with which the cultivars of durum wheat are created in Russia. In connection with this contradiction (the good climate and production opportunities on the one hand and the lack of adapted cultivars of required quality on the other), the current selection and genetic direction should be recognized as the creation of domestic varieties with high quality gluten, satisfying the requirements of the European market. The practical implementation of this direction is the aim of the studies presented in this publication. The main task before the team of researchers from Russia and Italy was to find ways to accelerate the transfer of high-quality gluten-quality genetic systems to the genotype of genotypes adapted to the prairie regions of Russia and the creation of competitive commercial cultivars of spring durum wheat on the basis of this source material. As the basic genotypes, three lines of Bezenchuk selection were used, as donors of high quality gluten (index gluten - IG) of Kofa (Canada), Aureo, Achille (both Italy). In this publication the results of selection of new genotypes with high quality are shown on the basis of the genetic system of Kofa cultivar. Backcrossing was accompanied by selection in segregation generations using genomic selection technology. Plants containing allele variants from Kofa (QTL block on the 1A chromosome) were evaluated using 100 SSR (Single sequence Repeat) molecular markers covering all the chromosomes of genomes A and B to select the plants closest to the genetically Russian line used as the maternal form when crossing. The result of the work is the creation of new genotypes under the names Taganrog and Bourbon. These lines in the testing trial showed an IG of 85 units, which corresponds to the best Italian cultivars, which are especially appreciated in the production of pasta.

*Keywords:* durum wheat, genetic methods of improving, climate conditions, characteristics of grain, quality of gluten.

DOI: 10.24411/1990-5378-2018-00064

---

*Sergey Shevchenko, Corresponding Member of RAS, Doctor of Agricultural Science, Director of Scientist of Samara Research Scientific Institute of Agriculture.*

*E-mail: samniish@mail.ru*

*Petr Malchikov, Doctor of Agricultural Science, Major of Scientist of Samara Research Scientific Institute of Agriculture. E-mail: sagrs-mal@mail.ru*

*Marina Myasnikova, PhD, Senior Scientist of Laboratory of Breeding of Durum Spring Wheat.*

*E-mail: sagrs-mal@mail.ru*

*Vincenzo Natoli, Doctor of Agricultural Science, Head of the Genetic Department*

*Pasquale De Vita, Doctor of Biological Sciences. E-mail: pasquale.devita@entec.*

*Marcella Giuliani, Doctor of Biological Sciences, Professor.*