

БИОЛОГИЯ

УДК 577.21:631.524.86:632.4:633.111

Т. В. ДОЛМАТОВИЧ, А. А. БУЛОЙЧИК

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ В СОРТАХ ЯРОВОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM* L.)

(Представлено академиком Л. В. Хотылёвой)

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 13.04.2015

Введение. В условиях Беларуси одним из вредоносных и распространенных заболеваний пшеницы является бурая ржавчина. Возбудитель болезни – биотрофный грибной патоген *Puccinia triticina* Erikss. Поражение посевов бурой ржавчиной приводит к значительным потерям урожая, а также к ухудшению качественных показателей зерна. Проблема устойчивости мягкой пшеницы к возбудителю бурой ржавчины в Беларуси приобретает большое значение. Это связано с изменением климата и недостаточной изученностью разрешенных к выращиванию сортов пшеницы на наличие генов устойчивости. Одной из причин массового развития этой болезни является возделывание сортов пшеницы однотипных по устойчивости и появление новых вирулентных рас патогена, что неизбежно приводит к быстрой потере их иммунитета. Химические средства защиты пшеницы от бурой ржавчины являются мало эффективными, так как возбудитель данного заболевания способен давать несколько генераций в течение вегетационного периода растений, распространяться ветром на значительные расстояния и адаптироваться к фунгицидам. В связи с этим наиболее экономически выгодным и экологически чистым средством борьбы является выведение и возделывание устойчивых к болезням сортов.

Применение молекулярных маркеров дает возможность идентифицировать гены устойчивости в сортах, гибридах и селекционных линиях, что ускоряет отбор целевых генотипов и повышает эффективность селекционного процесса. Идентификация генотипов с помощью молекулярно-генетических маркеров особенно значима при выявлении высокоэффективных генов, вирулентность к которым в природных популяциях патогена практически отсутствует, и генов «возрастной» устойчивости, эффективность которых проявляется на более поздних этапах онтогенеза пшеницы [1].

По состоянию на 2015 г., согласно каталогу McIntosh с соавт. [2], идентифицировано 86 генов устойчивости и аллелей к бурой ржавчине. К настоящему времени различные типы ДНК маркеров разработаны более чем для тридцати из них. Конечно, предпочтение для нужд MAS селекции отдается ген-специфическим маркерам, но, учитывая то небольшое число клонированных *Lr*-генов (*Lr1*, *Lr10*, *Lr21*, *Lr34*), в большинстве случаев используются диагностические маркеры, сцепленные с генами устойчивости.

Цель работы – скрининг сортов, районированных на территории Республики Беларусь, на присутствие генов устойчивости к бурой ржавчине и выделение среди них источников генов устойчивости к этому заболеванию.

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 22 сортах мягкой яровой пшеницы, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь по состоянию на 2013 год, в том числе 10 сортов белорусской селекции, 5 – польской, 6 – немецкой, 1 сорт из Сербии.

Экстракцию ДНК осуществляли из десяти индивидуальных проростков для каждого сорта по методу Plaschke с соавт. [3]. Праймеры к генам устойчивости отбирали из литературных ис-

точников [1; 4–9]. Перечень изученных генов устойчивости к бурой ржавчине и данные об использованных маркерах приведены в табл. 1. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере BioRad, используя режим и условия, как описано в [10]. Положительным контролем служили изогенные линии пшеницы и сорта, в которых гены устойчивости идентифицированы, в качестве отрицательного контроля – сорта, в которых гены устойчивости не выявлены. Анализ полученных фрагментов амплификации проводили в 2 %-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRulertm 100bp DNA Ladder Plus (ThermoScientific).

Таблица 1. Характеристика маркеров, использованных для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине

Идентифицируемый Lr-ген	Локализация на хромосоме	Источник гена	Название маркера (праймера)	Длина фрагмента амплификации
<i>Lr1</i>	5DL	<i>Triticum aestivum</i>	RGA567-5	510 п. н.
<i>Lr9</i>	6BL	<i>Aegilops umbellulata</i>	SCS5 ₅₅₀	550 п. н.
<i>Lr10</i>	1AS	<i>Triticum aestivum</i>	F12245/Lr10-6/r2	310 п. н.
<i>Lr19</i>	7DL	<i>Thinopyrum elongatum</i>	SCS ₂₆₅ ; SCS ₂₅₃	737 п. н. 512 п. н.
<i>Lr19</i>	7DL	<i>Thinopyrum elongatum</i>	AG15	811 п. н. 1073 п. н.
<i>Lr20</i>	7AL	<i>Triticum aestivum</i>	STS648-L/R	638 п. н.
<i>Lr21</i>	5DS	<i>Aegilops tauschii</i>	D14LN-RN	669/757 п. н. 774 п. н.
<i>Lr22a</i>	2DS	<i>Aegilops squarrosa</i>	GWM296	131–178 п. н.
<i>Lr24</i>	3DL	<i>Thinopyrum elongatum</i>	SCS1302 ₆₁₅	613 п. н.
<i>Lr24</i>	3DL	<i>Thinopyrum elongatum</i>	SCS1326 ₆₀₇	607 п. н.
<i>Lr24</i>	3DL	<i>Thinopyrum elongatum</i>	SCS73 ₇₁₉	719 п. н.
<i>Lr25</i>	4BS	<i>Secale cereale</i>	Lr25F20/R19	1800 п. н.
<i>Lr26</i>	1BL	<i>Secale cereale</i>	Iag95	260 п. н. 360 п. н.
<i>Lr26</i>	1BL	<i>Secale cereale</i>	IB-267	200–300 п. н.
<i>Lr26</i>	1BL	<i>Secale cereale</i>	P6M12-P	1050 п. н.
<i>Lr28</i>	4AL	<i>Aegilops speltoides</i>	SCS421570	570 п. н.
<i>Lr29</i>	7DS	<i>Thinopyrum elongatum</i>	29F24/29R24	900 п. н.
<i>Lr34</i>	7DS	<i>Triticum aestivum</i>	L34SPF/L34DINT13R2	751 п. н.
<i>Lr34</i>	7DS	<i>Triticum aestivum</i>	L34DINT9F/ Lr34MINUS	523 п. н.
<i>Lr35</i>	2BL	<i>Aegilops speltoides</i>	BCD260F1/35R2	900 п. н.
<i>Lr37</i>	2AS	<i>Aegilops ventricosa</i>	VENTRIUP/ LN2	262 п. н.
<i>Lr42</i>	1DS	<i>Aegilops tauschii</i>	CFD15	178 п. н. 220 п. н.
<i>Lr46</i>	1BL	<i>Triticum aestivum</i>	WMC44	250 п. н. 280 п. н.
<i>Lr47</i>	7AS	<i>Aegilops speltoides</i>	PS10L/10R	282 п. н.
<i>Lr48</i>	2BL	<i>Triticum aestivum</i>	WMC175	219 п. н. 233 п. н.

Разделение и анализ микросателлитных последовательностей, полученных в результате ПЦР, выполняли на автоматическом лазерном флуоресцентном секвенаторе (ALFexpress II) (Pharmacia) с использованием коротких гель-кассет. Разделение продуктов амплификации проводили в 6 %-ном полиакриламидном геле. Каждая дорожка акриламидного геля помимо образца содержала в качестве стандарта фрагменты ДНК с уже известным размером. Расчет анализируемых фрагментов амплификации производили относительно этих стандартов с использованием программного обеспечения Fragment Analyser 1.2 (Pharmacia).

Результаты и их обсуждение. Исследование районированных сортов мягкой яровой пшеницы проводили с помощью 25 маркеров (табл. 1) к 19 генам устойчивости к бурой ржавчине: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr42*, *Lr46*, *Lr47* и *Lr48*. Большинство изученных нами *Lr*-генов относится к ювенильным (или проростковым), за исключением *Lr22a*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr46* и *Lr48*, которые являются возрастными.

В результате проведенных исследований в сортах, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь, выявлены только гены устойчивости *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* и *Lr20* (табл. 2).

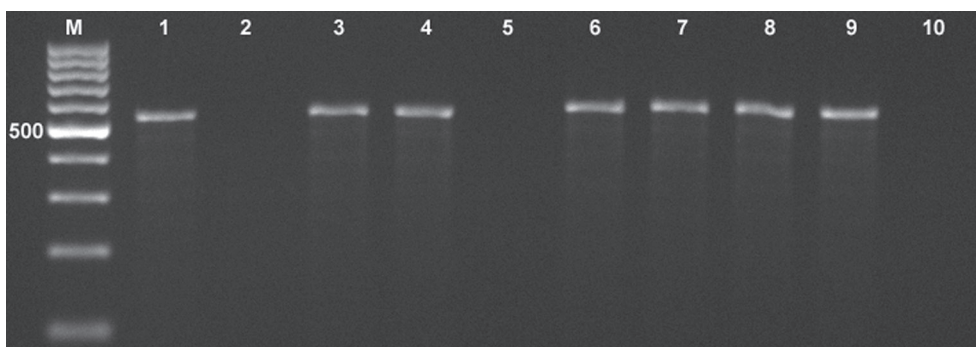
Таблица 2. ПЦР-детекция локусов, сцепленных с генами устойчивости к бурой ржавчине в сортах мягкой яровой пшеницы, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь на 2013 год

Название сорта	Происхождение	<i>Lr</i> -гены
Munk	Германия	<i>Lr1</i>
Vanti	Польша	<i>Lr20</i>
Виза	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Ростань	Республика Беларусь	–
Quattro	Германия	<i>Lr20</i>
Fasan	Германия	<i>Lr1</i> + <i>Lr20</i>
Дарья	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Triso	Германия	<i>Lr20</i>
Рассвет	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Koksa	Польша	<i>Lr1</i>
Тома	Республика Беларусь	–
Korynta	Польша	<i>Lr20</i>
Bombona	Польша	<i>Lr20</i>
Сабина	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Василиса	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Венера	Сербия	<i>Lr1</i> + <i>Lr10</i>
Любава	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Ласка	Республика Беларусь	<i>Lr20</i>
Verbena	Польша	<i>Lr1</i>
Melissos	Германия	–
Сударыня	Республика Беларусь	–
Ethos	Германия	–

Примечание. Локусов, сцепленных с генами *Lr19*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr42*, *Lr46*, *Lr47* и *Lr48* не выявлено.

Для большинства сортов, районированных на территории Республики Беларусь характерно присутствие гена устойчивости *Lr20* (табл. 2, рисунок). Ген *Lr20* относится к собственно пшеничным и тесно сцеплен с генами устойчивости к стеблевой ржавчине (*Sr15*) и мучнистой росе (*Pm1*). Для скрининга локуса устойчивости *Lr20–Pm1* в селекционном материале использовали STS маркер STS638 [9]. Частота рекомбинации между маркером и локусом *Lr20–Pm1* составляет 7,1 сМ, поэтому эффективность диагностики гена *Lr20* с помощью данного маркера в сортах и линиях не всегда достаточно точная. Фрагмент амплификации, сцепленный с локусом *Lr20–Pm1*, выявлен у сортов польской селекции (Vanti, Bombona, Korynta), немецкой селекции (Quattro, Fasan, Triso), а также белорусской селекции (Василиса, Виза, Дарья, Ласка, Любава, Рассвет, Сабина). В настоящее время ген устойчивости *Lr20* полностью преодолен белорусской популяцией бурой ржавчины [11].

Фрагмент амплификации, соответствующий гену *Lr1* выявлен у сортов Fasan, Munk (Германия), Verbena, Koksa (Польша) и сорта Венера (Сербия).



Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации в 1,5 %-ном агарозном геле, полученные с помощью ПЦР со SCAR маркером STS638 к гену устойчивости к бурой ржавчине *Lr20*: М – маркер молекулярного веса (100bp DNA Ladder; Thermo Scientific); лунка 1 – изогенная линия мягкой пшеницы Thatcher*6/Timmo (Тс + *Lr20*) (положительный контроль); сорта мягкой яровой пшеницы: 2 – Ростань, 3 – Дарья, 4 – Рассвет, 5 – Тома, 6 – Сабина, 7 – Василиса, 8 – Любава, 9 – Ласка, 10 – Сударыня

В настоящее время ген *Lr1*, также как и гены устойчивости *Lr10* и *Lr20* утратил свою эффективность к белорусской популяции бурой ржавчины [11], поэтому рекомендуется его использование в сочетании с другими генами или локусами.

Комбинация генов *Lr1* и *Lr10* выявлена у сорта Венера, а комбинация *Lr1* и *Lr20* у сорта Fasan (Германия).

В сортах, районированных на территории Республики Беларусь, нами не выявлены гены возрастной устойчивости *Lr22a*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr46* и *Lr48*. Среди изученных сортов не оказалось и эффективных генов с расоспецифической устойчивостью.

Заключение. Проведен скрининг 19 генов устойчивости к бурой ржавчине у 22 сортов мягкой яровой пшеницы, внесенных в Государственный реестр Республики Беларусь. Ген *Lr1* обнаружен у сортов Munk, Fasan (Германия), Koksa, Verbena (Польша); ген *Lr10* – у сорта Василиса (Беларусь); фрагмент, сцепленный с геном *Lr20*, – у сортов польской селекции (Vanti, Vombona, Korunta), немецкой селекции (Quattro, Fasan, Triso), а также белорусской селекции (Василиса, Виза, Дарья, Ласка, Любава, Рассвет, Сабина). Не обнаружены локусы, сцепленные с генами устойчивости *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr42*, *Lr46*, *Lr47*, *Lr48*.

Таким образом, установлено, что в селекционном процессе мягкой яровой пшеницы в Республике Беларусь ограничено задействован потенциал мирового генофонда, и, как следствие, отсутствуют гены, широко и успешно используемые селекционерами других регионов. Показана возможность и необходимость использования маркеров для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине *Lr1*, *Lr9*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr42*, *Lr46* и *Lr48* в маркер-сопутствующей селекции.

Литература

1. McIntosh R. A., Yamazaki Y., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. 2014. – Mode of access: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>. – Date of access: 25.03.2015.
2. Vida G., Ga M., Uhrin A. et al. // Euphytica. 2009. Vol. 170. P. 67–76.
3. Plaschke J., Börner A., Xie D. X. et al. // Theoretical and Applied Genetics. 1993. Vol. 85, N 8. P. 1049–1054.
4. Qiu Ji-Wen, Schürch A. C., Yahiaoui N. et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2007. Vol. 115, N 2. P. 159–168.
5. Gupta S. K., Charpe A., Prabhu K. V., Haqu Q. M. R. // Theoretical and Applied Genetics. 2006. Vol. 113, N 6. P. 1027–1036.
6. Prabhu K. V., Gupta S. K., Charpe A., Koul S. // Plant Breeding. 2004. Vol. 123. P. 417–420.
7. Gupta S. K., Charpe A., Koul S. et al. // Euphytica. 2006. Vol. 150, N 1–2. P. 233–240.
8. Mago R., Miah H., Lawrence G. J. et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2005. Vol. 112, N 1. P. 41–50.
9. Neu C., Stein N., Keller B. // Genome. 2002. Vol. 45. P. 737–744.

10. Долматович Т. В., Булойчик А. А. ДНК-технология идентификации генов устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины: Методические рекомендации / Мин-во сельского хозяйства и продовольствия Респ. Беларусь, Нац. акад. наук Беларуси, ГНУ «Ин-т генетики и цитологии НАН Беларуси». Минск, 2013. – 64 с.

11. Булойчик А. А., Борзяк В. С., Волуевич Е. А. // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45, № 5. С. 436–442.

T. V. DOLMATOVICH, A. A. BULOICHIK

A.Buloichik@igc.bas-net.by; T.Dolmatovich@igc.bas-net.by

**MOLECULAR IDENTIFICATION OF LEAF RUST RESISTANCE GENES IN COMMON
WHEAT VARIETIES (*TRITICUM AESTIVUM* L.)**

Summary

The leaf rust resistance genes *Lr1* was revealed in cultivars Fasan, Koksa, Munk, Verbena; the gene *Lr10* – in cultivar Vasilisa; the locus linked with the gene *Lr20* – in cultivars Banti, Bombona, Korynta, Quattro, Fasan, Triso, Vasilisa, Viza, Darja, Laska, Lubava, Passvet, Sabina. The loci linked with the gene resistance genes *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr21*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37*, *Lr42*, *Lr46*, *Lr47* and *Lr48* were not identified in the investigated varieties.