

А. А. Токубаева¹, К. К. Шулембаева¹, Б. О. Бекманов²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

²«Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан)

Идентификация генов устойчивости

мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к бурой ржавчине с помощью молекулярных маркеров

Аннотация

С помощью молекулярных STS-маркеров рTAG621, J13, Lrk10, Gb, J09 был проведен скрининг сорто-образцов *Triticum aestivum*, имеющих по результатам фитопатологического теста гены устойчивости к бурой ржавчине Lr1, Lr9, Lr10, Lr19 и Lr24. У 36 сортообразцов по специфическим продуктам амплификации ДНК было обнаружено наличие гена Lr1, у 19 сортообразцов - Lr10, у 3 сортообразцов - Lr9, у дикого вида *Tr. kiharae* - Lr19, а ген Lr24 был найден у интрогрессивной линии л-345, дикого вида *Ae. kotschyi* и *Tr.*

kiharae. В дальнейших исследованиях планируется провести идентификацию сортообразцов местной селекции в широком спектре, защищенных эффективными генами устойчивости к бурой ржавчине, с помощью молекулярных маркеров.

Ключевые слова: бурая ржавчина, STS маркеры, устойчивость, ген, пшеница.

Кілт сөздер: қоңыр тат ауруы, STS маркерлер, төзімділік, ген, бидай.

Keywords: leaf rust (Lr), STS markers, resistance, gene, wheat.

Бурая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erics.) – одна из основных вредоносных болезней мягкой пшеницы в большинстве регионов ее возделывания [1]. По статистическим данным базы FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nation, www.fao.org) во всем мире потери урожая из-за болезни составляет примерно 10% от основной продовольственной культуры. Кроме потери урожайности, она приводит также к снижению качества зерна [2]. Использование эффективных генов устойчивости в селекции злаковых культур – один из наиболее экономически выгодных и экономически безопасных методов борьбы с болезнями [3]. К настоящему времени описано более 58 Lr-генов, локализованных на разных хромосомах пшеницы. Часть из них была обнаружена непосредственно в геноме *Triticum aestivum* L. [4, 5].

Традиционные методы выявления вирулентных генов трудоемки и требуют больших затрат времени. Развитие ДНК-технологий значительно ускорило определение устойчивых Lr-генов у пшеницы и позволило перейти к массовой оценке генетического материала. По данным MAS (Marker assisted selection) – новый подход, основанный на молекулярно маркерной технологии, используемый для повышения глобального производства сельскохозяйственных культур и для улучшения генома растений, в настоящее время является ценным инструментом в отборе сортов по хозяйственно ценным признакам [6]. Lr-гены можно идентифицировать с помощью молекулярных маркеров, таких как STS (sequence-tagged site), SSR (simple sequence repeat), RAPD (Random Amp-lified Polymorphic DNA), SCAR (sequence-characterized amplified regions), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence), RGA (resistance gene analog polymorphisms). В данной статье обсуждаются результаты работы, проведенной с помощью молекулярных маркеров для идентификации генов Lr1, Lr9, Lr10, Lr19, Lr24 у местных сортов пшеницы и коллекции мировой селекции.

Материалы и методы исследований

Объектом исследования служили 41 местный сорт мягкой пшеницы различного происхождения, 4 египетских сорта и 5 диких видов (*Tr. timopheevii*, *Tr. dicoccum*, *Tr. kiharae*, *Ae. ventricosa*, *Ae. kotschyi*), любезно представленных сотрудниками Казахского научно-исследовательского института Земледелия и растениеводства и Хоуссамом Э.М. Эль-Вакилем (Университет Александрия, Египет), а также интрогрессивные линии – л-344, л-345.

Метод выделения ДНК проводили по методике Edwards и соавторы [7]. Идентификацию Lr-генов осуществляли с использованием ПЦР-праймеров, маркирующих отдельные гены.

Праймеры были выбраны на основании литературных данных. Нуклеотидные последовательности праймеров предоставлены в таблице 1. ПЦР вели в условиях рекомендуемых авторами (таблица 2). В качестве компонентов реакционной смеси для ПЦР использовался PCR Master mix (“Fermentas”). Продукты амплификации разделяли в 1,4%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документируют с помощью фотографирования после окрашивания бромистым этидием. В качестве маркера молекулярной массы использовали GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus («ThermoScientific», Литва), в качестве положительного контроля – изогенную линию сорта Thatcher, содержащую гены Lr1, Lr9, Lr10, Lr19, Lr24, отрицательным контролем был использован сорт Thatcher.

Таблица 1 – Специфические праймеры STS-маркеров генов устойчивости пшеницы к бурой ржавчине

Ген	Локализация на хромосоме	Последовательности праймеров (5'-3')	Источник гена	Литературный источник
Lr1	5DL	F: CCT TGC CAG CCC AAA AG R: GGG TCA CGT ACT ACT ATA	Triticum aestivum	[8]
Lr9	6BL	F: TCC TTT TAT TCC GCA CGC CGG R: CCA CAC TAC CCC AAA GAG ACG	Aegilops umbellulata	[9]
Lr10	1AS	F: GTG TAA TGC ATG CAG GTT CC R: AGG TGT GAG TGA GTT ATG TT	Triticum aestivum	[10]
Lr19	7DL	F: CAT CCT TGG GGA CCT C R: CCA GCT CGC ATA CAT CCA	Thinopyrum sp.	[11]
Lr24	3DL	F: TCT AGT CTG TAC ATG GGG GC R: TGG CAC ATG AAC TCC ATA CG	Agropyron elongatum	[12]

Таблица 2 – Условия ПЦР с праймерами, маркирующими Lr-гены

Ген	Название маркера	Программа полимеразной цепной реакции	Размер фрагмента (bp)
Lr1	pTAG62 1-3 pTAG62 1-5	94°C 5 min., 30 cycles (92°C 1 min., 55°C 1 min., 72°C 2 min.), 72°C 10 min.	560 bp
Lr9	J13-1 J13-2	94°C 6 min., 45 cycles (92°C 1 min., 62°C 1 min., 72°C 2 min.), 72°C 4 min.	1000 bp
Lr10	Lrk10D1 Lrk10D2	94°C 5 min., 35 cycles (94°C 45 sec., 57°C 45 sec., 72°C 30 sec.), 72°C 3 min.	310 bp

Lr19	GbF GbR	94°C 6 min., 45 cycles (92°C 30 sec., 60°C 30 sec., 72°C 1 min.), 72°C 5 min.	130 bp
Lr24	J09-1 J09-2	94°C 4 min., 40 cycles (92°C 1 min., 60°C 1 min., 72°C 2 min.), 72°C 5 min.	310 bp

Исследование было проведено в лаборатории молекулярной генетики «Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК.

Результаты исследований и их обсуждение

У изученных 47 сортообразцов мягкой пшеницы из 5 диких видов были обнаружены следующие гены устойчивости к бурой ржавчине: Lr1, Lr9, Lr10, Lr19, Lr24.

Для маркирования гена Lr1 был использован STS маркер рTAG621, который амплифицирует специфический продукт длиной 560 пн. Фрагмент длиной 560 пн. содержится у большинства изученных нами сортообразцов, таких как Надежда, Алмалы, Карашаш, Богарная 52, Нуреке, Казах-станская 126, Ажар, Алия. Однако этот фрагмент был обнаружен и у восприимчивого сорта Thatcher, сцепленного с геном Lr1 (рисунок 1). Результаты нашего исследования согласуются с данными Chelkowski и соавт. [13], Ling H-Q и соавт. [14] и Urbanovich и соавт. [3]. Ген Lr1 получил широкое распространение в сортах мягкой пшеницы по всему миру. Этот ген не является высокоэффективным против современных рас патогена, но в селекционных программах может быть успешно использован в комбинации с другими Lr-генами.

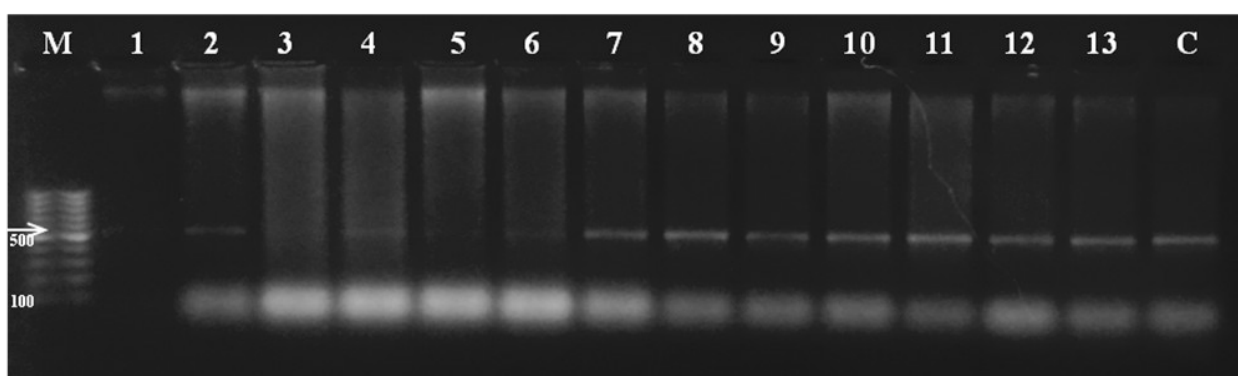


Рисунок 1 – Продукты амплификации ДНК с использованием праймера рTAG621 к гену Lr1.

М – маркер, С – контроль, 1 - Кокбидай; 2 - 24/20989; 3 - Казахстанская 4; 4 – Богарная 52; 5 - К-2780;

6 - Карашаш; 7 - Алмалы; 8 - Алия; 9 - Ажар; 10 - Егемен 20; 11 - Казахстанская 3; 12 - СИМ 79/279; 13 - Thatcher.

Ген Lr9 идентифицирован у линии 24/20989, сорта пшеницы Егемен 20 и у интрогрессивной линии л-344 с использованием STS маркер J13-1/J13-2. (таблица 3). Ген Lr9 является высокоэффективным против возбудителей бурой ржавчины на территории стран Европы и СНГ. Распространение его в коммерческих сортах ограничено, так как транслокация, в составе которой он внесен в геном *T. aestivum*, может приводить к снижению урожайности [15].

Таблица 3 – Идентификация Lr-генов в сортообразцах и диких видах пшеницы

№	Название сортообразцов	Происхождение, страна	Lr1	Lr9	Lr10	Lr19	Lr24
1	2	3	4	5	6	7	8
1	24/20989	KZ	+	+	+	-	-
2	К 4	KZ	+	-	+	-	-
3	Богарная 52	KZ	+	-	+	-	-
4	Кондитерская	KZ	+	-	+	-	-
5	Нуреке	KZ	+	-	+	-	-
6	Ажар	KZ	+	-	+	-	-
7	л-344	KZ	+	+	+	-	-
8	л-345	KZ	+	-	-	-	+
9	МК 3677	KZ	+	-	+	-	-
10	16/20978	KZ	+	-	-	-	-
11	К 88	KZ	+	-	-	-	-
12	Казахстанская 126	KZ	+	-	-	-	-
13	Clement	US	-	-	-	-	-
14	Compare	US	-	-	-	-	-
15	Geiza-168	EGY	-	-	-	-	-
16	<i>Tr. timopheevii</i>	KZ	+	-	-	-	-
17	<i>Tr. dicoccum</i>	KZ	+	-	-	-	-

18	Tr. kiharae	KZ	-	-	-	+	+
19	Ae. ventricosa	EG	+	-	+	-	-
20	Ae. kotschyi	EG	-	-	-	-	+
21	Карашаш	KZ	+	-	-	-	-
22	Надежда	KZ	+	-	-	-	-
23	Алмалы	KZ	+	-	-	-	-
24	Алия	KZ	+	-	+	-	-
25	Кокбидай	KZ	-	-	-	-	-
26	Lemhi	US	-	-	-	-	-
27	Moro	US	-	-	-	-	-
28	Rie Besel 47/51	US	-	-	-	-	-
29	Gemeiza-10	EGY	+	-	+	-	-
30	Sakha-93	EGY	+	-	-	-	-

Продолжение табл. 3

1	2	3	4	5	6	7	8
31	Sids-1	EGY	+	-	+	-	-
32	Безостая 1	KZ	+	-	-	-	-
33	Одесская 120	KZ	+	-	-	-	-
34	Фараби 159	KZ	+	-	-	-	-
35	Ания	KZ	+	-	-	-	-
36	Майра	KZ	+	-	-	-	-
37	Юбилейная 75	KZ	+	-	-	-	-
38	Tres	US	+	-	-	-	-
39	Lee	US	-	-	+	-	-
40	Stephens	US	-	-	-	-	-
41	Иммунная	KZ	-	-	-	-	-
42	Казахстанская 3	KZ	+	-	-	-	-
43	СИМ 79/279	KZ	+	-	+	-	-
44	Стекловидная	KZ	+	-	-	-	-

45	к - 1448	KZ	+	-	+	-	-
46	Егемен 20	KZ	+	+	-	-	-
47	Анар	KZ	+	-	-	-	-
48	К-2780	KZ	-	-	+	-	-
49	Казахстанская 4	KZ	-	-	+	-	-
50	N 18	KZ	-	-	+	-	-
51	Сапалы	KZ	+	-	+	-	-
52	Tatcher	US	+	-	-	-	-
Примечание: (-) – отсутствие, (+) – присутствие маркера.							

Ген Lr10 тестирован с помощью ПЦР с праймерами Lrk10D1 и Lrk10D2 у 19 сортообразцов – к-24/20989, К 4, Богарная 52, Кондитерская, Нуреке, Ажар, л-344, МК 3677, *Ae. ventricosa*, Алия, Gemeiza-10, Sids-1, Lee, СИМ - 79/279, к – 1448, К-2780, Казахстанская 4, N 18, Сапалы (рис. 1). В результате был амплифицирован фрагмент длиной 282 пн. По литературным данным, ген Lr10 был идентифицирован в геноме *T. aestivum* L. и картирован в коротком плече хромосомы 1A [16]. Впервые этот ген был выделен и описан Schachermayr с соавторами [10].

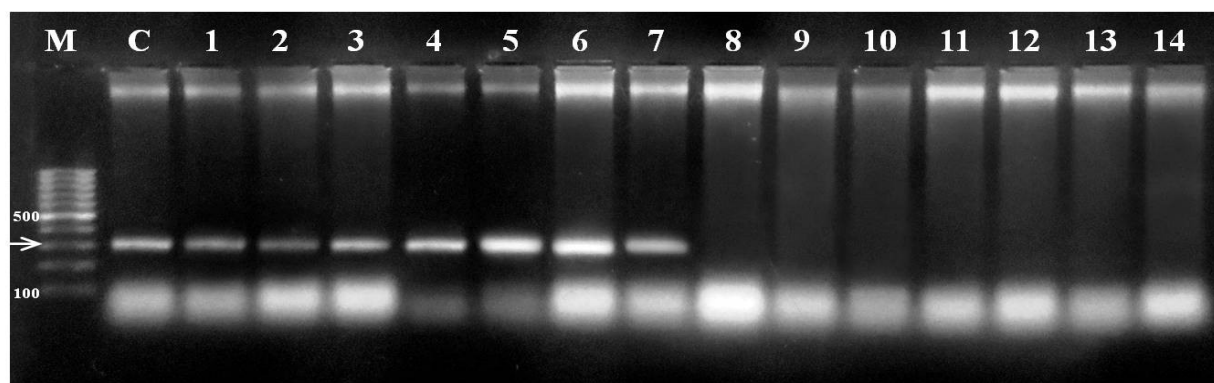


Рисунок 2 – Продукты амплификации ДНК с использованием праймеров Lrk10D1, Lrk10D2, сцепленных с геном Lr10.

М - маркер; С - контроль; 1 - 24/20989; 2 - К 4; 3 - Богарная 52; 4 - Кондитерская; 5 - Нуреке; 6 - Ажар; 7 - МК 3677;

8 - 16/20978; 9 - К 88; 10 - Казахстанская 126; 11 - Clement; 12 - Compare; 13 - Geiza-168; 14 - Thatcher

По данным исследования CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) пока-зано, что сочетание 4-5 генов устойчивости приводит к высокому уровню вирулентности, равной с иммунитетом [17]. У исследуемых нами образцов пшеницы часто встречаются комбинации генов Lr10+Lr1, а у линий к-24/20989 и интрогрессивной линии л-344 выявлены сочетание генов Lr1+Lr9+Lr10. У изучаемых нами сортообразцов с такими комбинациями генов, степень поражения бурой ржавчиной не превышал 10-20%.

Маркеры GbF и GbR, тесно сцепленные с геном Lr19, амплифицировали специфический фрагмент длиной 130 пн. Этот маркер выявлен только у дикого вида пшеницы *Tr. kiharae* (таблица 3). В исследуемых нами образцах пшеницы был обнаружен очень низкий уровень распространения гена Lr19.

Ген Lr24 идентифицирован у нтрогрессивной линии л-345, дикого вида *Ae. kotschy* и *Tr. Kiharae* с использованием праймеров J09/1, J09/2. При этом выявлен специфический фрагмент 310 bp. Ген Lr24 представляет особую ценность для селекции, так как обеспечивает высокий уровень устойчивости к поражению пшеницы бурой ржавчиной. Высокая устойчивость сортов была отмечена при комбинации генов Lr24 с Lr9 [15] и Lr24 с Lr19 [18]. Последняя комбинация генов была обнаружена и в наших результатах исследования с *Tr. kiharae*.

Заключение. Использование STS маркеров значительно ускорило идентификацию генотипа устойчивости образцов мягкой пшеницы. Полимеразная цепная реакция с использованием прайме-ров рTAG621-1, рTAG621-2; J13-1, J13-2; Lrk10D1, Lrk10D2; GbF, GbR; J09-1, J09-2 у 52 образцов мягкой пшеницы позволила идентифицировать ряд генов устойчивости к бурой ржавчине. С использованием праймеров рTAG621-1, рTAG621-2 был идентифицирован ген Lr1 у 36 сортообраз-цов пшеницы, а с помощью праймеров Lrk10D1, Lrk10D2 обнаружен ген Lr10 у 19 сортообразцов пшеницы. STS маркеры J13-1, J13-2, тесно сцепленные с геном Lr9, амплифицировали специфический продукт 1000 п.н. у л-344, сорта Егемен 20 и у линии 24/20989. Маркеры GbF, GbR, тесно сцепленные с геном Lr19, амплифицировали специфический фрагмент 130 п.н. у дикого вида *Tr. kiharae*. С помощью STS-праймеров J09-1/J09-2, разработанных для идентификации гена Lr24, гены устойчивости Lr24 были обнаружены у л-345, в диком виде *Ae. kotschy* и *Tr. kiharae*.

Таким образом, с использованием молекулярных маркеров, впервые у большинства сортов местной селекции были идентифицированы гены устойчивости к бурой ржавчине – Lr1, Lr10, и лишь у некоторых образцов – Lr9. Среди изученных высокоэффективных генов устойчивости, таких как Lr19, был обнаружен у дикого виде *Tr. kiharae*, а Lr24 у интрогрессивной линии л-345 и дикого вида *Ae. kotschy* и *Tr. kiharae*. В дальнейших исследованиях планируется изучить широкий спектр сортообразцов местной селекции и эффективных Lr генов изогенных линий сорта Thatcher.

Литература

- Oelke L.M., Kolmer J.A. Characterization of leaf rust resistance in hard red spring wheat cultivars // *Plant Disease*. – 2004. – 88(10). – P. 1127-1133.
- Cloutier S., McCallum B.D., Loutre C., Banks T.W., Wicker T., Feuillet C. et al. Leaf rust resistance gene Lr1, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large psr567 gene family // *Plant Molecular Biology*. – 2007. – 65. – P. 93-106.
- Urbanovich O.Yu., Malyshev S.V., Dolmatovich T.V., Kartel N.A. Identification of leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using molecular marker // *Russian Journal of Genetics*. – 2006. – 42(5). – P. 546-554.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Rogers W.J., Morris C.F., Devos K.M. Catalogue of gene symbols for wheat. – 2010. – <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/download.jsp>.
- Riar A.K., Kaur S., Dhaliwal H.S., Singh K., Chhuneja P. Introgression of a leaf rust resistance gene from *Aegilops caudata* to bread wheat // *Journal of Genetics*. – 2012. – 91(2). – P. 155-161.
- Landjeva S., Korzun V., Burner A. Molecular markers: actual and potential contributions to wheat genome characterization and breeding // *Euphytica*. – 2007. – 156. – P. 271-296.
- Edwards K., Jonstone C., Thompson C. A Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // *Nucl. Acids Res*. – 1991. – 19(6). – P. 1349.
- Feuillet C., Messmer M., Schachermayr G., Keller B. Genetic and physical characterization of the Lr1 leaf rust resistance locus in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Mol. Gen. Genet*. – 1995. – 248. – P. 553-562.
- Schachermayr G., Siedler H, Gale M.D. Identification and Localization of Molecular Markers Linked to the Lr9 Leaf Rust Resistance Gene of Wheat // *Theor. Appl. Genet*. - 1994. - 88. - P. 110-115.
- Schachermayr G., Feuillet C., Keller B. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene Lr10 in diverse genetic backgrounds // *Mol. Breed*. – 1997. – 3. – P. 65–74.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Koebner R.M.D. AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat // *Theor. Appl. Genet*. –2001. – 103. – P. 618-624.
- Schachermayr G., Messmer M.M., Feuillet C. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene Lr24 in wheat // *Theor. Appl. Genet*. – 1995. – 90. – P. 982–990.
- Chelkowski J., Golka L., Stepień L. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher // *J. Appl. Genet*. – 2003. – 44(3). – P. 323-338.
- Ling H-Q., Qiu J., Singh R.P. et al. Identification and genetic characterization of an *Aegilops tauschii* ortholog of the wheat leaf rust disease resistance gene Lr1 // *Theor Appl Genet*. – 2004. – 109. – P. 1133–1138.

Gupta S.K., Charpe A., Koul S., Prabhu K.V., Haq Q.M.R. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf rust-resistance gene, Lr9, for marker-assisted selection in bread wheat // *Genome*. – 2005. – 48. – P. 823–830.

Dyck P.L. and Samborski D.J. Genetics of resistance to leaf rust in common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakoff and Centenario // *Can. J. Genet. Cytol.* – 1968. – 10. – P. 7–17.

Singh R.P., William H.M., Huerta-Espino J., Rosewarne G. Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies. "New directions for a diverse planet". Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 Sep – 1 Oct. Brisbane, Australia. Published on CDROM. – 2004. – www.cropscience.org.au

Šliková S., Gregová E., Bartoš P., Hanzalová A., Hudcovicová M., Kraic J. Development of wheat genotypes possessing a combination of leaf rust resistance genes Lr19 and Lr24 // *Plant Soil Environ.* – 2004. – 50(10). – P. 434–438.

Резюме

А.А. Токубаева, К.К. Шулембаева, Б.О. Бекманов

молекулалық маркерлер көмегімен жұмсақ бидайда (*Triticum aestivum* L.)

қоңыр татқа төзімді гендерді идентификациялау

pTAG621, J13, Lrk10, Gb, J09 молекулалық STS-маркерлері көмегімен *Triticum aestivum* сортүлгілерінде қоңыр татқа төзімді Lr1, Lr9, Lr10, Lr19 және Lr24 гендеріне скрининг жүргізілді. ДНҚ амплификация нәтижесінде спецификалық өнімдері бойынша Lr1 гені – 36 сортүлгілерінде, Lr10 гені – 19 сортүлгілерінде, Lr9 гені – 3 сортүлгілерінде, Lr19 гені жабайы түр - *Tr. kiharae*, ал Lr24 гені – интрогрессивті линия л-345 және жабайы түрлер *Ae. kotschyi* мен *Tr. kiharae* анықталды.

Кілт сөздер: қоңыр тат ауруы, STS маркерлер, төзімділік, ген, бидай.

Summary

A. A. Tokubayeva, K. K. Shulembaeva

Identification of leaf rust resistance genes

for soft wheat (*Triticum aestivum* L.) by using molecular markers

With assistance of pTAG621, J13, Lrk10, Gb, J09 STS markers, the screening of *Triticum aestivum* L. specimens was carried to leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr10, Lr19 and Lr24. Amplified PCR products of 36 specimens have indicated the presence of Lr1 gene, 19 specimens - Lr10 gene, 3 specimens - Lr9 gene, in wild species *Tr. kiharae* - Lr19 gene, introgressive line I-345 and wild species *Ae. kotschyi*, *Tr. kiharae* - Lr24 gene.

Keywords: leaf rust (Lr), STS markers, resistance, gene, wheat.

Поступила 24.06.2013 г.