N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 2, Number 308 (2015), 54 – 60

GENETIC ANALYSIS OF COMMERCIAL WHEAT VARIETIES TO SEPTORIOSIS

S. S. Baizhumanova, B. N. Sibanbayeva, A. P. Chirkin, G. A. Ismagulova

M. A. Aitkhozhin Institute of molecular biology and biochemistry, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: jansaule_1986@mail.ru

Key words: *T. aestivum* (bread wheat), septoriosis, SSR - marker, Xfcp1, Xfcp2.

Abstract. The cultivation of crops, especially wheat, is a major strategic sector of Kazakhstan agriculture. However, in recent years, one of the most dangerous wheat diseases – Septoria blotch, rapidly occurs. The pathogens of this disease are phytopathogenic fungus - *Septoria tritici* and *Septoria nodorum*. They are widespread and infect both young and adult plants of winter and spring wheat. Infection leads to slow growth, early drying of leaves, and reduction of ear length and amount of grain, also to the grain leanness.

Septorias have been controlled by using of fungicides, but isolates of *Septoria tritici* and *Septoria nodorum* often quickly get used to fungicides. The most effective method of wheat crops protecting from pathogen is a combination of breeding and chemical methods. The effect of these methods is higher, if wheat cultivars have a high resistance level. Wheat resistance to fungal diseases is regulated by numerous genes that express an immune response in the complex.

In this paper an analysis of 67 common wheat samples is considered. During this work a collection of wheat genome DNA was created. Using SSR (simple sequence repeats) molecular markers *Xfcp1 Xfcp2* loci of resistance to Septoria blotch were identified. Also allelic variants - S (sensitive)-, I (insensitive) - and Null-alleles were identified. I - allele is associated with a recessive gene tsn 1 resistance to the toxin of Septoria spp. This allele was detected in 19 DNA samples of wheat by two microsatellite markers. Statistical analysis of the results allowed us to identify promising varieties with economically important feature for further implementation in the selection.

УДК 577.29.581.19

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ УСТОЙЧИВОСТИ КОММЕРЧЕСКИХ СОРТОВ ПШЕНИЦЫ К СЕПТОРИОЗУ

С. С. Байжуманова, Б. Н. Сибанбаева, А. П. Чиркин, Г. А. Исмагулова

Институт молекулярной биологии и биохимии им. М. А. Айтхожина, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: *T. aestivum* (мягкая пшеница), септориоз, SSR - маркер, *Xfcp*1, *Xfcp*2.

Аннотация. В последнее время, в Казахстане нарастающими темпами проявляется одно из самых опасных заболеваний пшеницы – септориозная пятнистось. Возбудителем данного заболевания являются сумчатые фитопатогенные грибы рода *Septoria* spp. – *Septoria tritici* и *Septoria nodorum*. Они повсеместно распространены и поражают как всходы, так и взрослые растения озимой и яровой пшеницы.

В ходе представленной работы был проведен анализ 67 образцов мягкой пшеницы. Была создана коллекция геномной ДНК пшеницы и идентифицированы локусы устойчивости к септориозу с использованием SSR (simple sequence repeats) маркеров *Xfcp*1 и *Xfcp*2. При проведении генетического анализа, выявлены аллельные варианты - S (sensitive), I (insensitive) и Null. Аллель I, ассоциированный с рецессивным состоянием гена *tsn*1, контролирующего признак устойчивости к токсину гриба рода *Septoria* spp., был выявлен у 19-ти исследуемых линий и сортов. В результате работы, было проведено генотипирование 67 образцов пшеницы и идентифицированы сорта, имеющие локусы устойчивости к септориозу.

Для Казахстана зерновое производство является основной стратегически важной отраслью растениеводства, но проблема микробиологического загрязнения зерна продолжает расти из года в год. В последнее время с нарастающей прогрессией проявляется септориоз пшеницы. Появляясь ежегодно в различной степени с поражением от 1 до 40% растений, болезнь снижает урожай на 15-30%, а в годы эпифитотии до 40% [1]. Септориоз отмечен в Шымкентской, Жамбылской, Алматинской, Костанайской, Акмолинской областях и в северо-восточной части Восточно-Казахстанской области. По данным специалистов, в северном регионе Казахстана в 2011 году 100% посевов на площади в 3 миллиона 900 гектаров были поражены септориозом [2].

Возбудителями септориозной пятнистости листьев пшеницы являются сумчатые фитопатогенные грибы рода *Septoria* spp. - *Septoria tritici* и *Septoria nodorum*. Они повсеместно распространены и поражают как всходы, так и взрослые растения озимой и яровой пшеницы, особенно в зонах с влажным умеренным климатом. Обычно патоген заражает листья, но также может вызывать пятнистость на остях и колосковых чешуях. Симптомы заболевания обнаруживаются в виде характерных поражений, содержащих расположенные рядами пикниды, или никротических пятен на листьях. Заражение ведет к отставанию в росте, преждевременному усыханию листьев, уменьшению длины и озерненности колоса, щуплости зерна.

Стратегия контроля септориоза пшеницы в настоящее время основана на применении химических веществ. Однако изоляты *Septoria tritici* и *Septoria nodorum* довольно быстро «привыкают» к фунгицидам, в том числе и самым новым. Кроме того, некоторые фунгициды отличаются повышенной стойкостью в биологических средах, медленно разрушаются, что создаёт опасность их накопления в природных условиях, в том числе в растениях, а, следовательно, в растительных продуктах. Вследствие своей универсальности некоторые из них поражают полезные микроорганизмы, насекомых, птиц, рыб и т.д., что при систематическом применении может привести к нарушению биологического равновесия в биоценозах. Химические методы приводят к удорожанию конечной продукции.

Наиболее действенным и эффективным является сочетание селекции с химическими методами. Результативность этого способа более действенна, если сорт обладает определенным уровнем устойчивости. Устойчивость пшеницы к возбудителям септориоза является комплексной, основанной у некоторых сортов наличием отдельных доминантных или рецессивных генов, а у других - несколькими генами, имеющими аддитивный эффект [3].

Грибы рода *Septoria* spp. при заражении растений продуцируют несколько токсинов SnTox1, SnTox2, SnTox3 и PtrToxA (*Septoria nodorum* Toxin 1,2,3 и *Pyrenophora tritici-repentis* Toxin A). Гены чувствительности пшеницы к действию этих токсинов *Snn*1, *Snn*2, *Snn*3 и *Tsn*1 были установлены и определено их положение на хромосомах. В 70% случаев именно эти токсины определяют восприимчивость пшеницы к септориозу или способствуют развитию этого заболевания [11].

Для выявления устойчивости/восприимчивости пшеницы к токсину PtrToxA были разработаны 2 молекулярных маркера *Xfcp*1 и *Xfcp*2, ассоциированные с геном *Tsn*1(*Tan spot necrosis*) [8]. Эти маркеры применялись неоднократно в маркер ассоциированной селекции при выявлении образцов толерантных к септориозу.

Цель настоящего исследования – генотипирование изучаемых сортов пшеницы с использованием молекулярных маркеров устойчивости к септориозу и поиск перспективных сортов для селекции.

Материалы и методы

Материалом для исследования служили 67 образцов мягкой пшеницы из коллекции генофонда КазНИИ земледелия и растениеводства.

Геномную ДНК выделяли из листьев 14-дневных проростков пшеницы согласно протоколу набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific) [4].

Идентификация локусов устойчивости проводили с использованием SSR - маркеров *Xfcp1* и *Xfcp2,* последовательность которых представлена в таблице 1 [5].

Таблица 1 – Последовательность праймеров для генотипирования локусов устойчивости к септориозу пшеницы

Локус	Последовательность праймеров
*Xfcp*1	5' - ATA ACT CCG TCA CGA CCA CCT CCT CTC AAG- 3' 5' - CAG TCT GAA AAC GCC ATA CCC G- 3'
*Xfcp*2	5' - GTG AGC CCT GGC TGC CTA CTT ATC TCA CTC T- 3' 5' - GTA GGC ATT TGA AGA TGA GGT AGG AC - 3'

Реакционная среда для амплификации объемом 25 мкл включала 100 мкМ каждого dNTP, 2 пМ каждого праймера, 2 мМ MgCl2, 1 ед. Taq-полимеразы «Силекс» (Россия), 100 нг исследуемой ДНК. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) при следующих параметрах: начальная денатурация – 94°С в течение 4 мин; 45 циклов – 1 мин - 94°С, 1 мин – 65°С и 67°С (для *Xfcp1* и *Xfcp*2 соответственно), 2 мин – 72°С. Финальную элонгацию проводили в течение 10 мин при 72°С. Продукты реакции анализировали в 8%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в 1хТВЕ буфере по отработанному протоколу [6]. После окрашивания в бромистом этидие, гели визуализировали при УФ-свете с использованием гель-документирующей системы GelDok («BioRad», США).

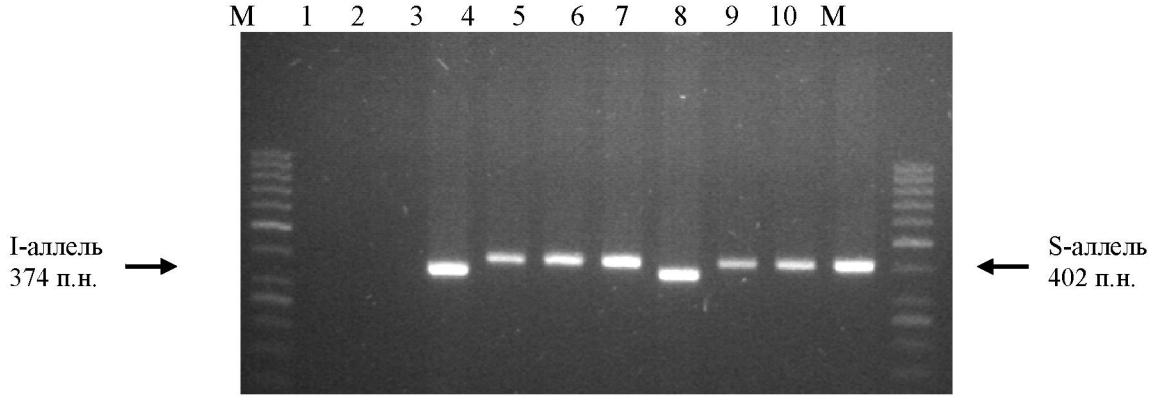
Для статистической обработки данных использовался стандартной пакет компьютерной программы Microsoft Office Exell.

Результаты и обсуждения

Согласно литературным данным, аллель I (insensitive) ассоциирован с рецессивным состоянием гена устойчивости к септориозу *tsn*1, чувствительность же, или подверженность к некрозу, связывают с S (sensitive) аллелем, ассоциированным с доминантным состоянием гена *Tsn1* [7, 8, 10].

По результатам проведения генетического анализа данных образцов, для локуса *Xfcp*1 было показано наличие трех аллельных вариантов. Первый вариант – S – аллель, 402 п.н., чувствительный к SnTox1 токсину, второй - I – аллель, 374 п.н., невосприимчивый к SnTox1, и третий вариант – Null-аллель, т.е. отсутствие локуса. Электрофоретическое разделение продуктов ПЦР с локусом *Xfcp*1 показано на рисунке 1.

Чувствительность к действию токсина, определяющаяся наличием S-аллеля, была обнаружена у 32-х исследуемых сортов и 6 изогенных линиях сорта Thatcher с частотой 0,567. В 32-х образцах был обнаружен I–аллель с частотой 0,478. Отсутствие признака (Null-аллель) с частотой встречаемости 0,086 установлено в 6-ти образцах – Стекловидная 24, Дея, Мереке 70, Жадыра, Маншук,

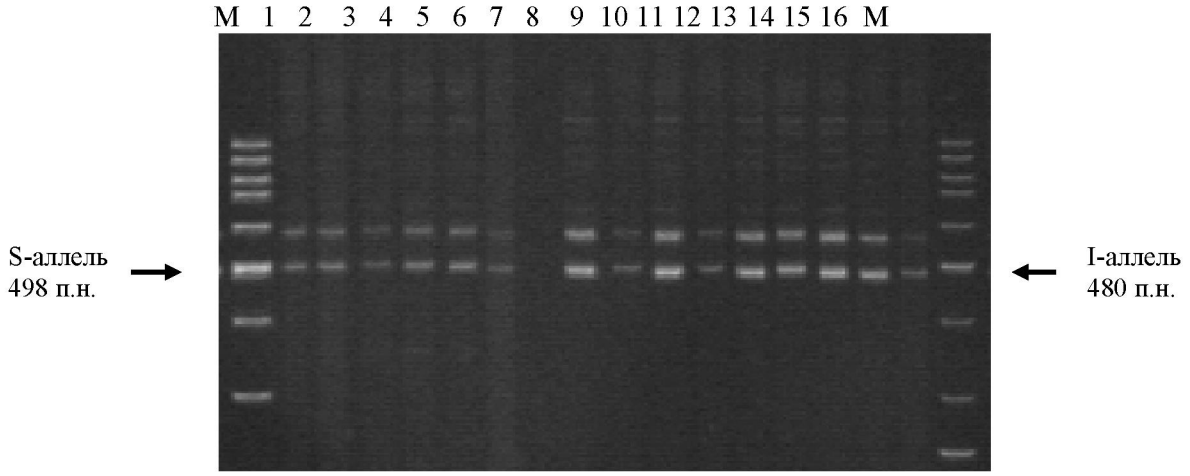


М – ДНК-маркер 50 п.н., GeneRuler™. Дорожки 1 и 2 – Null-аллель, 3 и 7 – I-аллель, 4-6, 8-10 – S-аллель

Рисунок 1 – Результат электрофоретического разделения ПЦР продуктов локуса *Xfcp*1 в 8% ПААГе

Комсомольская 56. Как было показано ранее, до конца не изучена взаимосвязь нулевого аллеля и устойчивости пшеницы к заболеванию [7]. Тем не менее, сорта, у которых обнаружены S- и Null-аллели, могут оказаться не перспективными для последующей селекционной практики.

Амплификация образцов пшеницы с помощью маркера *Xfcp*2 показала наличие двух вариантов аллелей. Первый вариант – 480 п.н. - I - аллель, ассоциированный с рецессивным геном *tsn*1, контролирующим признак устойчивости к SnTox1 токсину. Второй вариант – 498 п.н. – S-аллель, чувствительный к токсину, т.е. подвержен к некрозу растительных тканей. Результаты разделения продуктов ПЦР в ПААГ маркера *Xfcp*2 показаны на рисунке 2.



М – ДНК-маркер 1кВ , GeneRuler™. Дорожки 1-6,9,11,13 – S-аллели; 8, 10, 12, 14 и 16 – I -аллель

Рисунок 2 – Результат электрофоретического разделения ПЦР продуктов локуса *Xfcp*2 в 8 % полиакриламидном геле

По результатам статистической обработки, S-аллель маркера *Xfcp*2 был выявлен у 32-х исследуемых сортов, I-аллель - у 15 сортов и 16 изогенных линиях сорта Thatcher, с частотой встречаемости 0.463 в общем.

Из 67 исследуемых сортов в 19 образцах были обнаружены I-аллели по двум маркерам *Xfcp*1 и *Xfcp*2. Известно что I-аллель ассоциирован с устойчивостью к септориозу, поэтому эти сорта могут быть использованы для изучения его эффективности против септориозной пятнистости в дальнейшей селекционной практике.

Результаты генотипирования 50-ти коммерческих сортов с микросателлитными маркерами *Xfcp*1 и *Xfcp*2 приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Генотипирование сортов пшеницы с маркерами устойчивости к септориозу

№ п/п	Наименование сорта	Генотип	
		*Xfcp*1*	*Xfcp*2**
1	2	3	4
1	Прогресс	I	S
2	Алматы	S	S
3	Женис	I	S
4	Лютесценс 1300	I/S	S
5	Л – 196/94-6	I	I
6	Степная 15	S	S
7	Стекловидная 24	Null	I
8	MANITUOU	I	I
9	CS2D-2M	I	I