

Захист і карантин рослин 2014. Вип. 60.
УДК 575+577.1 : 633.1

А.В. КАРЕЛОВ, науковий співробітник
Н.О. КОЗУБ, кандидат біологічних наук
І.О. СОЗІНОВ, старший науковий співробітник
О.О. СОЗІНОВ, професор, доктор сільськогосподарських наук,
академік НААН і НАН
Інститут захисту рослин НААН

Я.Б. БЛЮМ, професор, доктор біологічних наук, академік НАН
ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН»

АЛЕЛЬНИЙ СТАН МАРКЕРІВ ГЕНА, АСОЦІЙОВАНОГО ІЗ ЧУТЛИВІСТЮ ДО ТОКСИНУ А *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* І *STAGONOSPORA NODORUM*, СЕРЕД СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ СТЕПОВОЇ ЗОНИ УКРАЇНИ

Досліджено 92 сорти м'якої пшениці (*T. aestivum* L.) української селекції з використанням молекулярно-генетичних маркерів *Xfcr623* та *Xfcr394* гена *Tsn1*, асоційованого із чутливістю (нечутливістю) до токсину А *P. tritici-repentis* та *S. nodorum*. Було визначено, що частота асоційованого з нечутливістю алеля маркера *Xfcr394* становить 94,8%, маркера *Xfcr623* — близько 72%. Оціночна точність маркера *Xfcr394* — близько 87%.

**пшениця м'яка, молекулярний маркер, хост-селективний токсин,
Pyrenophora tritici-repentis, *Stagonospora nodorum***

Pyrenophora tritici-repentis (Died.) — шкідливий і достатньо поширений в світі фітопатоген пшениці (р. *Triticum* L.), збудник жовтої плямистості [7]. Цей некротрофний грибний патоген є причиною зменшення рівня фотосинтезу на одиницю площі листа, що призводить до зменшення кількості зернин на колос. Це може бути причиною втрат урожаю чутливих сортів на 5—10%, а за сприятливих умов — більше ніж на 50% і до значного зниження якості урожаю [10, 15].

Розділення на раси представників цих грибів проводять за здатністю викликати некроз у сорту пшениці 'Glenlea' та (або) хлороз у ліній пшениці '6В365' та '6В662'. Є три основних хост-специфічних токсини, які виділяють гриби виду *P. tritici-repentis*, а саме: PtrToxA (спричиняє некроз в сорті пшениці 'Glenlea'), PtrToxB (призводить

до хлорозу в лінії пшениці '6В662'), PtrToxC (призводить до хлорозу в лінії пшениці '6В365') [16, 17].

PtrToxA є одним із добре вивчених хост-селективних токсинів і характерний для рас 1, 2, 7 та 8 *P. tritici-repentis* [17, 19]. Це білок молекулярною масою 13,2 kDa і довжиною 117 амінокислотних залишків, який має стабілізовану дисульфідними містками глобулярну структуру [19].

Stagonospora nodorum (Berk.) E. Castell. & Germano є також небезпечним фітопатогеном м'якої (*Triticum aestivum* L.) й твердої (*T. turgidum* L.) пшениці, збудник одного з різновидів септоріозу. Він пошкоджує надземну частину рослини та може спричиняти як втрати урожаю до 50% серед чутливих сортів, а за дощової погоди у фазі дозрівання зерна — повну втрату врожаю, так і загальне зниження якості зерна [12]. Було показано, що *S. nodorum* також продукує власний токсин А (SnToxA), який є функціонально ідентичним із PtrToxA і забезпечує половину або менше вірулентності *S. nodorum* [11].

Чутливість рослин пшениці до PtrToxA та SnToxA визначається єдиним домінантним геном *Tsn1* [14]. Було доведено, що експресія гена *Tsn1* є необхідною для проникнення токсину PtrToxA в клітини, хоча білок TSN1 безпосередньо не взаємодіє ні з ToxA, ні з пластоціаніном, ні з ферментом ToxAВР1 хлоропластів [14].

Ген *Tsn1* картували на довгому плечі хромосоми 5В [8]. Маркери *Xfcp393* та *Xfcp394* заявлено як діагностичні для визначення нечутливості до PtrToxA та SnToxA, хоча згідно літературних джерел для сортів 'Cheyenne', 'Jagger', 'TAM105', 'Forno', 'Norstar', 'Ben' і 'Langdon' спостерігається рекомбінація між маркером та геном [9]. Маркер *Xfcp394* локалізовано на відстані 200 тис. п.н. від ймовірного гена *Tsn1* на фізичній карті локусу [6]. Нещодавно секвенували ген-кандидат *Tsn1*. Виявилось, що він кодує білок, який містить елементи, характерні для продуктів R-генів, а саме домени S/TPK (серин/треонінова протеїн-кіназа), NBS (сайт зв'язування нуклеотидів) та LRR (багатий на лейцин повтор), має загальну довжину 10581 п.н., 8 екзонів, 7 інтронів та вбудований транспозон у положенні 1444...4273 (послідовність за № GU259653 в GeneBank) [6]. На основі отриманого сиквенсу було запропоновано маркер *Xfcp623* для діагностики аallelних станів гена. Цей маркер знаходиться в 5 інтроні локусу в положенні 4901...5280 (було отримане шляхом «вирівнювання» запропонованих праймерів із послідовністю № GU259653 в GeneBank) [6].

Метою досліджень був аналіз сортів м'якої пшениці, створених в умовах Півдня України, за допомогою молекулярних маркерів *Xfcp394* та *Xfcp623* гена *Tsn1* чутливості до PtrToxA та SnToxA некротрофних видів грибів *P. tritici-repentis* та *S. nodorum*.

Методика досліджень. Проаналізували зразки ДНК, виділені з зе-

рен 92 сортів пшениці, створених у Селекційно-генетичному інституті Національному центрі сортовивчення НААН України, м. Одеса (далі СГІ). Перелік сортів наведено у таблиці. Окрім цього додатково проводили дослідження ДНК сорту Безоста 1, як попередника бага-

Алельні стани маркерів $Xfcp623$ [1] та $Xfcp394$ [4] зі зразками ДНК відповідних сортів пшениці

№ п.п	Назва сорту	$fcp623$	$fcp394$	№ п.п	Назва сорту	$fcp623$	$fcp394$
1	Альбатрос одеський	tr	tr	26	Заможність	Ts	tr
2	Антонівка	tr	tr	27	Запорука	Ts	tr
3	Безмежна	tr	tr	28	Застава	Ts	- ²
4	Благодарка	Ts	tr	29	Звитяга	tr	- ²
5	Борвій	tr	tr	30	Землячка	tr	0 ¹
6	Бунчук	tr	tr	31	Зиск	tr	- ²
7	Ватажок	tr	tr	32	Зміна	Ts	tr
8	Юнат одеський	tr	- ²	33	Знахідка одеська	tr	tr
9	Вдала	tr	tr	34	Зорепад	tr	tr
10	Вихованка	tr	- ²	35	Зустріч	tr	tr
11	Вікторія	tr	tr	36	Істина	Ts	tr
12	Годувальниця	tr	tr	37	Кирия	Ts	п.м. ³
13	Голубка одеська	tr	tr	38	Княгиня Ольга	tr	tr
14	Господиня	tr	tr	39	Косовиця	Ts	tr
15	Гурт	tr	tr	40	Красень	tr	- ²
16	Дальницька	Ts	tr	41	Красуня	tr	- ²
17	Доброполька	Ts	tr	42	Куяльник	tr	tr
18	Доброчин	Ts	tr	43	Лада	tr	- ²
19	Дюк	Ts	tr	44	Лановий	tr	- ²
20	Епоха	tr	tr	45	Ластівка	tr	tr
21	Єдність	tr	Ts	46	Лебідка	tr	tr
22	Жайвір	tr	tr	47	Леля	tr	tr
23	Журавка	tr	tr	48	Ліона	tr	tr
24	Заграва одеська	tr	tr	49	Литанівка	tr	tr
25	Задумка	tr	- ²	50	Ліра	tr	- ²

Закінчення табл.

№ п.п	Назва сорту	<i>fcр623</i>	<i>fcр394</i>
51	Лузанівка	tr	- ²
52	Любава	tr	- ²
53	Місія одеська	tr	tr
54	Небокрай	tr	tr
55	Никонія	tr	tr
56	Одеська 162	Ts	- ²
57	Одеська 265	Ts	- ²
58	Одеська 267	tr	tr
59	Одеська 51	Ts	- ²
60	Одеська 95	Ts	- ²
61	Одеська напівкарликова	Ts	- ²
62	Одеська червоноколоса	tr	tr
63	Оксамитна	tr	tr
64	Ольвія	Ts	- ²
65	Отаман	tr	tr
66	Панна	tr	- ²
67	Пилипівка	tr	- ²
68	Писанка	tr	tr
69	Повага	tr	tr
70	Подяка	tr	tr
71	Поклик	tr	- ²

№ п.п	Назва сорту	<i>fcр623</i>	<i>fcр394</i>
72	Польовик	tr	tr
73	Пошана	Ts	п.м. ³
74	Прибой	Ts	- ²
75	Прима	tr	- ²
76	Промінь	Ts	- ²
77	Розмай	tr	- ²
78	Селена	Ts	- ²
79	Селянка	Ts	tr
80	Сирена	Ts	tr
81	Скарбниця	tr	tr
82	Скарбниця	tr	- ²
83	Служениця	tr	tr
84	Струмок	tr	- ²
85	Супутниця	tr	tr
86	Тіра	tr	- ²
87	Турунчук	Ts	tr
88	Ужинок	tr	tr
89	Українка	tr	tr
90	Фантазія	tr	- ²
91	Федорівка	tr	- ²
92	Ювілейна 75	Ts	- ²

Примітки: ¹ — так званий “нуль-алель”, асоційований із відсутністю чутливості до PttToxA та SnToxA;

² — дослідження за маркером для сортів не проводили

³ — “поліморфізм”, в результаті ПЛР отримали фрагменти, що відповідають обом алельним станам маркера

трьох сучасних українських сортів пшениці (в таблицях не наведено). В якості контролю алеля “tr” маркерів *Xfcр394* та *Xfcр623* (алельний стан гена *tsn1*, асоційований з нечутливістю до токсинів А) використали сорт ‘Chinese Spring’, алеля “Ts” (*Tsn1*, асоційований з чутливістю до токсинів А) — сорт ‘Катерва’. Сорти-контролі були люб’язно надані Національним центром генетичних ресурсів рослин України

НААН (Харків). Виділяли ДНК із 5-ти насінин рослин кожного сорту шляхом розтирання матеріалу в керамічній ступці з наступним відбором наважки 25—35 мкг та використанням наборів Diatom™ DNA Prep100 (дистриб'ютор в Україні — фірма NEOGENE®) за стандартною методикою. ПЛР проводили на ампліфікаторі 2720 GeneAMP System з допомогою наборів GenPak® PCR Core (дистриб'ютор в Україні — фірма NEOGENE®) за методикою виробника. Для визначення аельного стану маркера *Xfcp394* використовували пару праймерів *Xfcp394-F* (5'-GTAGCCTGCAGGTACAAACTGGA-3') та *Xfcp394-R* (5'-CAGTGTTAAGAAGTGTGTTCTGGTC-3'), із якими отримували ПЛР продукти довжиною 383 п.н. у випадку "tr" аеля і 328 п.н. — у випадку "Ts" аеля; крім цього рідкісним для даного маркера є 0-аель (далі — "0"), який також асоціюють із нечутливістю до токсину [6, 9]. Маркер *Xfcp623* фланкують праймери *Xfcp623-F* (5'-СТАТТСГ-ТААТСГТГССТССГ-3') та *Xfcp623-R* (5'-ССТТСТСТСАССГС-ТАТСТСАТС-3'), він домінуючий, із алелем "Ts" асоціюється наявність ампліконів довжиною 379 п.н., амплікони у випадку нечутливості відсутні [6]. Умови ПЛР відповідали джерелам літератури [6, 9].

Результати ПЛР візуалізували шляхом електрофорезу на 2% агарозному гелі із додаванням в якості фарбника бромистого етидію із подальшим використанням системи для гель-документації VISION Gel.

Результати досліджень і їх обговорення. Проаналізували ДНК, виділену з 92 сортів селекції СГІ за допомогою двох маркерів, кожен із яких вважається діагностичним: *Xfcp394*, локалізованого на відстані близько 200 тис. п.н. та *Xfcp623*, локалізованого в 5 інтроні гена. Результати наведено в таблиці.

Частота аеля нечутливості до токсину А «tr» маркера *Xfcp394*, локалізованого на відстані 200 тис. п.н. від вірогідного гена *Tsn1* є надзвичайно високою і становить 94,8% (враховуючи поліморфні сорти). Із ДНК сортів Пошана, Єдність і Кирия були отримані амплікони, характерні для аеля «tr», асоційованого з чутливістю до токсину А. Частота аеля «tr», визначеного за допомогою маркера *Xfcp623*, локалізованого в 5 інтроні вірогідного гена *Tsn1*, є нижчою і становить близько 72% (66 сортів із 92 досліджених). Оціночна точність маркера *Xfcp394* становить близько 87% (саме такий відсоток збігів між даними цього маркера й маркера *Xfcp623* для сортів, досліджених за допомогою обох маркерів).

Ми порівняли отримані дані з опублікованими результатами досліджень польової стійкості (чутливості) українських сортів пшениці до жовтої плямистості в різних регіонах України. Згідно досліджень на Півдні України (Степова зона) сорти Альбатрос, Землячка, Ватажок, є високостійкими, а сорти Жайвір, Куяльник, Леля, Зустріч, Супутниця, Зміна, Доброчин — чутливими до жовтої плямистості

[18]. Згідно з дослідженнями на полях Інституту рослинництва імені В.Я. Юр'єва НААН (лісостепова зона) протягом 2001—2008 рр. стійкими проти жовтої плямистості були сорти Знахідка одеська, Супутниця; чутливим — сорт Запорука [2]. Із них у сортів Альбатрос одеський, Землячка, Ватажок, Знахідка одеська, Жайвір, Куяльник, Супутниця, Зустріч, Леля нами був визначений алель «tr» маркера *Xfcp623*, для сортів Запорука, Доброчин, Зміна — алель «Ts» цього маркера та алель «tr» маркера *Xfcp394* для всіх наведених сортів. Вірогідно, в описаних випадках, як за умов штучного зараження, так і при дослідженні на природних інфекційних фонах, використовували суміш рас збудника жовтої плямистості або расу, що не є продуцентом лише одного токсину. Тому реакція в польових умовах зумовлювалась не лише взаємодією токсину А із рослинами пшениці, що несуть чи не несуть функціональний алель *Tsn1*. Використання для інокуляції в полі суміші рас, серед яких і раса 8, підтверджується дослідженнями расового складу на території європейської частини Росії: відзначається, що всі раси окрім 5 і 4 присутні як в кліматичних умовах Краснодарського краю, так і на півночі [3]. Оскільки для сортів Запорука, Доброчин, Зміна дані по чутливості до токсину А згідно маркера *Xfcp623* збігаються з відсутністю польової стійкості, слід вважати цей маркер більш точним.

Згідно з попередніми дослідженнями у 37 сортів серед тих, що несуть “tr” алель маркера *Xfcp623*, були також визначені відповідні алелі косегрегуючих маркерів гена *Lr34*, асоційованого зі стійкістю проти бурої, стеблової та жовтої іржі, борошнистої роси та жовтої карликовості ячменю [1, 5]. Отже, ці сорти можуть бути джерелом комплексної стійкості як проти ToxA-продукуючих рас *P. tritici-repentis* та *S. nodorum*, так і проти іржастих грибів.

ВИСНОВОК

Дослідили 93 сорти пшениці м'якої селекції СГІ. Визначили, що частота асоційованого з нечутливістю алеля маркера *Xfcp394* становить 94,8%, маркера *Xfcp623* — близько 72. Оціночна точність маркера *Xfcp394* становить близько 87%. Більш вдалим для діагностичного визначення нечутливості до токсинів А без достовірної інформації про походження (родовід) досліджуваного матеріалу слід вважати маркер *Xfcp623*. Частина досліджених сортів можуть бути джерелом комплексної стійкості як проти ToxA-продукуючих рас *P. tritici-repentis* та *S. nodorum*, так і проти іржастих грибів.

БІБЛЮГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. *Идентификация аллельного состояния гена устойчивости к бурой ржавчине Lr34 у сортов озимой мягкой пшеницы украинской селекции* / А.В. Карелов, Я.В. Пирко, Н.А. Козуб и др. // *Цитология и генетика*. — 2011. — Т. 45, №5. — С. 3—10.

2. *Леонов О.Ю.* Моніторинг стійкості до піренофорозу серед сучасних сортів та ліній пшениці м'якої / О.Ю. Леонов // Вісник ЦНЗ АПВ Харківської області. 2011. — Вип. 10. — С. 133—143.

3. *Михайлова Л.А.* Структура популяції *Pyrenophora tritici-repentis* из европейской части России по признаку вирулентности / Л.А. Михайлова, И.Г. Тернюк, Н.В. Мироненко // Микология и Фитопатология. — 2007. — Т. 41, № 3. — С. 269—275.

4. *Одностальченко Е.В.* Устойчивость пшеницы к возбудителю желто-бурой пятнистости листьев в условиях юга украины / Е.В. Одностальченко // «Біологія: від молекули до біосфери»: матеріали VII Міжнародної конференції молодих учених 20—23 листопада 2012. — Харків.: 2012. — С. 294.

5. *Характеристика* українських сортів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) за допомогою новітніх молекулярних маркерів генів помірної стійкості проти іржастих грибів / А.В. Карелов, Н.О. Козуб, І.О. Созінов та ін. // Захист і карантин рослин. — 2013. — Вип. 59. — С. 128—137.

6. *A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens* / J.D. Faris, Z. Zhang, H. Lu et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. — 2010. — Vol. 107, No. 30. — P. 13544—13549.

7. *An epidemic of tan spot of wheat in Nebraska* / J.E. Watkins, G.N. Odvody, M.G. Boosalis, J.E. Partridge // Plant Dis. Rep. — 1978. — Vol. 62. — P. 132—134.

8. *Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from Pyrenophora tritici-repentis* / J.D. Faris, J.A. Anderson, L.J. Francl, J.G. Jordah // Phytopathology. — 1996. — Vol. 86. — P. 459—463.

9. *Development, identification, and validation of markers for marker-assisted selection against the Stagonospora nodorum toxin sensitivity genes Tsn1 and Snn2 in wheat* / Z. Zhang, T.L. Friesen, K.J. Simons et al. // Mol Breeding. — 2009. — Vol. 23. — P. 35—49.

10. *Discoloration of wheat kernels by Pyrenophora tritici-repentis* / M.R. Fernandez, R.M. DePauw, J.M. Clarke, S.L. Fox // Canadian Journal of Plant Pathology. — 1998. — Vol. 20, Iss. 4. — P. 380—383.

11. *Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer* / T.L. Friesen, E.H. Stukenbrock, Z.H. Liu, S.W. Meinhardt et al. // Nat. Genet. — 2006. — Vol. 38. — P. 953—956.

12. *Eyal, Z. Integrated control of Septoria disease of wheat.* / Z. Eyal // Plant Dis. — 1981. — Vol. 65. — P. 763—768.

13. *Friesen T.L. Molecular mapping of resistance to Pyrenophora tritici-repentis race 5 and sensitivity to Ptr ToxB in wheat* / T.L. Friesen, J.D. Faris // Theor. Appl. Genet. — 2004. — Vol. 109. — P. 464—471.

14. Manning V.A. Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein / V.A. Manning, L.K. Hardison, L.M. Ciuffetti // MPMI. — 2007. — Vol. 20, No. 2. — P. 168—177.

15. Shabeer A. Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat / A. Shabeer, W.W. Bockus // Plant Dis. — 1988. — Vol. 72. — P. 599—602.

16. Strelkov S.E. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis* / S.E. Strelkov, L. Lamari, G.M. Ballance // MPMI. — 1999. — Vol. 12, No. 8. — P. 728—732.

17. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat / L. Lamari, S.E. Strelkov, A. Yahyaoui et al. // Phytopathology. — 2003. — Vol. 93. — P. 391—396.

18. The *Tsn1-ToxA* interaction in the wheat-*Stagonospora nodorum* pathosystem parallels that of the wheat-tan spot system / Z.H. Liu, T.L. Friesen, H. Ling et al. // Genome. — 2006. — Vol. 49. — P. 1265—1273.

19. Tuori R.P. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis* / R.P. Tuori, T.J. Wolpert, L.M. Ciuffetti // Mol Plant Microbe Interact. — 1995. — Vol. 8, No 1. P. — 41—48.

Карелов А.В., Козуб Н.А., Созинов И.А., Созинов А.А., Блюм Я.Б.
Аллельное состояние молекулярно-генетических маркеров генов, ассоциированных с чувствительностью к токсину А *Pyrenophora tritici-repentis* и *Stagonospora nodorum* среди украинских сортов мягкой пшеницы

*Исследовано 92 сорта мягкой пшеницы украинской селекции (*T. aestivum* L.) с использованием молекулярно-генетических маркеров *Xfcp623* и *Xfcp394* гена *Tsn1*, ассоциированного с чувствительностью (нечувствительностью) к токсину *P. tritici-repentis* и *S. nodorum*. Было определено, что частота ассоциированной с нечувствительностью аллели маркера *Xfcp394* составляет 94,8%, маркера *Xfcp623* — около 72%. Оценочная точность маркера *Xfcp394* составляет около 87%.*

Karelov A.V., Kozub N.O., Sozinov I.O., Sozinov O.O., Blume Ya.B.
Allelic state of the molecular genetic markers for genes associated with sensitivity to *Pyrenophora tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum* toxins A among Ukrainian common wheat cultivars

*Ninety two cultivars of common wheat (*T. aestivum* L.) of Ukrainian breeding were studied using molecular genetic markers *Xfcp623* and *Xfcp394* of the *Tsn1* gene associated with sensitivity (insensitivity) to the *P. tritici-repentis* and *S. nodorum* toxins A. The frequency of associated with insensitivity allele of the marker *Xfcp394* was determined to be 94,8%, the marker *Xfcp623* — near 72%. The estimated accuracy of the marker made up near 87%.*