

АЛЕЛЬНИЙ СТАН ГЕНА *Cre8* СТІЙКОСТІ ДО НЕМАТОДИ *HETERODERA AVENAE* WOLL. У СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Вівсяна цистова нематода (*Heterodera avenae* Woll.) є небезпечним фітопатогеном, що паразитує на різноманітних злаках. Зокрема, втрати урожаю пшениці від цього фітопатогену в умовах Північної Європи склали менше 10%, однак за більш жарких і посушливих умов, які, наприклад, властиві для хліборобських регіонів Австралії, можуть скласти більше 50% [1]. Одним із можливих наслідків змін клімату, які спостерігаються в останні роки [2], є зміни видового складу патогенів пшениці [3]. У подальшому загальне підвищення середньорічної температури може призвести й до суттєвого збільшення втрат урожаю від *H. avenae* [4].

Хімічні методи боротьби з вівсяною нематою є досить неефективними з огляду на її здатність утворювати цисти й у такому вигляді перешкодити несприятливі умови до декількох років [5, 6]. У всьому світі й, зокрема, в Австралії ефективним способом контролю розповсюдження *H. avenae* вважають використання сортів, стійких до цього фітопатогену, й впровадження в насінництво відомих, а також виявлення нових генів стійкості до вівсяної цистої нематої [5–7]. Наразі відомі 8 поширених генів (*Cre1–Cre8*) та низка нещодавно впроваджених або характерних для окремих сортів (із числовими позначеннями «9» та вище або з літерними позначеннями) [8, 9]. Молекулярно-генетичні механізми стійкості, яку забезпечують навіть широкопроваджені *Cre*-гени, досліджені слабо. Так, секвеновано гени *Cre1* та *Cre3*. Обидва ці гени мають структуру, подібну до класу R генів, які забезпечують стійкість до біотрофних фітопатогенів за надчутливим типом (ген-на-ген) [10]. Але другий ген походить від дикого родича пшениці *Aegilops tauschii* L., тому вірогідність виявити пов'язану з ним стійкість у сортів пшениці українського генофонду вкрай низька [11]. Ген *Cre1* є пшеничним геном, проте молекулярні маркери й нуклеотидна послідовність цього гена недо-

ступні в наукових публікаціях, оскільки є комерційною власністю [Е. Lahguda, персональні комунікації]. Інші гени походять від диких родичів пшениці або помірно поширені в світовому генофонді м'якої пшениці [9]. Для генів стійкості до *H. avenae* визначено найближче зчеплені з ними мікросателітні маркери, які, проте, не є надто точними [11]. Нещодавно було опубліковано молекулярно-генетичні дослідження стійкості, обумовленої геном *Cre8* [12]. Його було картовано на довгому плечі хромосоми 6В [13]. Ген було визначено в багатьох сортах пшениці і встановлено, що він забезпечує помірну нерасоспецифічну стійкість [14]. Було визначено низку маркерів, деякі з них косягують із геном [12].

Отже, метою нашого дослідження було визначення наявності поліморфізму молекулярного маркера гена *Cre8* стійкості до вівсяної цистої нематої у сортів пшениці м'якої української селекції.

Матеріали і методи

У роботі досліджували сорти пшениці озимої м'якої селекції Миронівського інституту пшениці імені В.М. Ремесла Національної академії аграрних наук України (далі – МІП), створені спільно з Інститутом фізіології рослин і генетики Національної академії наук України та Селекційно-генетичного інституту – Національного центру сортозведення НААН України (всього 24 сорти, повний перелік сортів наведено в табл.). В ролі контролю алеля стійкості використовували сорт Chinese Spring, в ролі контролю алеля чутливості – сорт Gabo [12].

Виділяли ДНК з наважок масою 20–35 мг, відібраних із розтертого матеріалу 8–10 зернівок пшениці, з використанням комерційного набору PowerPlant™ DNA Isolation Sample (NEOGEN®) за запатентованою методикою компанії-виробника [15]. Для роботи був обраний молекулярний маркер *wri15*, який косягує з

геном *Cre8* [12]. Маркер фланкують праймери *wri15_F* (5'tttactttaaatgaacatttcagcagcaatgtgac3'), *wri15_R1* (5'ccgattagatcagggcattc3') *wri15_R2* (3'cccattagatcagggcattg5'). Проводили ПЛР з використанням наборів Diatom™ DNA Prep100 (NEOGEN®), 0,5 ОД, Таq ДНК-полімерази гарячого старту (Invitrogen™), суміш dNTP у концентрації 200 мкМ (Invitrogen™), 1X реакційний буфер (pH 8,5) із 1,5 мМ MgCl₂ (Invitrogen™), зразки ДНК у кількості від 1 до 5 нг та праймери у кількості 0,5 пмоль у термоциклері-ампліфікаторі 2720 GeneAMP System. Протокол реакції такий: початкова денатурація: 8 хв., 30 циклів по 30 с, денатурація при 94 °С, відпал – при 58 °С, елонгація – при 72 °С із фінальною елонгацією при 72 °С протягом 5 хв. Продукти ПЛР із парою праймерів *wri15_F* та *wri15_R1* довжиною 350 п.н. отримували у випадку алеля стійкості, характерного для сорту *Molineux*; у випадку асоційованого з чутливістю алеля, характерного для сорту *Trident*, отримували продукти ПЛР довжиною 350 п.н. із парою праймерів *wri15_F* та *wri15_R2* [12]. Продукти ПЛР розділяли в агарозному гелі та 0,5x TBE-буфері. Спочатку наносили в лунки продукти ПЛР із парою праймерів *wri15_F* та *wri15_R2* і маркер молекулярних мас (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder), давали електрофорезу пройти 20 хв., після чого наносили в ті самі лунки продукти ПЛР із парою праймерів *wri15_F* та *wri15_R1*.

Результати та обговорення

Нами вперше були досліджені українські сорти пшениці за допомогою молекулярних маркерів гена стійкості до вівсяної цистоутворюючої нематоди. Електрофореграма результатів ПЛР наведена на рис.

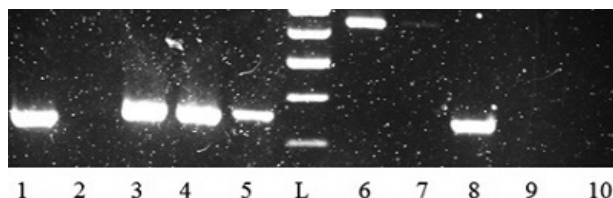


Рис. Електрофореграма продуктів ПЛР із праймерами, що фланкують маркер *wri15* гена *Cre8*: L – маркер молекулярних мас (O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); 1 – сорт Веста; 2 – Зустріч; 3 – Зорепад; 4 – Колумбія; 5 – Косовиця; 6 – Мирлена; 7 – Миронівська 66; 8 – Унікум; 9 – Миронівська 61; 10 – Крижинка

Повний перелік досліджених сортів із зазначеними алелями молекулярного маркера *wri15* та установами-оригінаторами наведено у табл.

Одержані нами дані вказують на те, що у сортів пшениці м'якої української селекції здебільшого розповсюджений алель *Trident* маркера гена *Cre8* помірної стійкості до вівсяної нематоди: у 9 з 12 досліджених сортів селекції СГІ та 8 з 12 досліджених сортів селекції МПІ та ІФРiГ було виявлено цей пов'язаний із чутливістю алель маркера. Подібні дані були також отрима-

Таблиця

Результати ПЛР із праймерами, що фланкують маркер *wri15* гена *Cre8*, для деяких сортів пшениці м'якої української селекції

Сорт	Оригіатор	Алель маркера <i>wri15</i> *	Сорт	Оригіатор	Алель маркера <i>wri15</i> *
Бунчук	СГІ	Т	Мирлена	МПІ та ІФРiГ	М
Веста	МПІ та ІФРiГ	Т	Миронівська 30	МПІ та ІФРiГ	Т
Заможність	СГІ	Т	Миронівська 61	МПІ та ІФРiГ	–
Зимоярка	МПІ та ІФРiГ	Т	Миронівська 66	МПІ та ІФРiГ	М
Зорепад	СГІ	Т	Миронівська 808	МПІ та ІФРiГ	Т
Зустріч	СГІ	–	Одеська 267	СГІ	Т
Кирія	СГІ	–	Польовик	СГІ	Т
Колумбія	МПІ та ІФРiГ	Т	Пошана	СГІ	Т
Косовиця	СГІ	Т	Славна	МПІ та ІФРiГ	Т
Крижинка	МПІ та ІФРiГ	–	Сніжана	МПІ та ІФРiГ	Т
Куяльник	СГІ	–	Супутниця	СГІ	Т
Ліона	СГІ	Т	Унікум	МПІ та ІФРiГ	Т

Примітки: * – у графі «алель маркера *wri15*» позначка «М» відповідає алелю стійкості, характерному для сорту *Molineux*, позначка «Т» відповідає алелю чутливості, характерному для сорту *Trident*, позначка «–» – нуль-алель або ампліфікація не відбулася.

ні й авторами маркера для австралійських сортів [12].

У жодного з сортів селекції СГП не було виявлено алеля стійкості типу *Molineux*. Очевидно, для цих сортів характерні інші генетичні передумови стійкості до вівсяної нематоди (наприклад, таку стійкість може забезпечувати ген *Cre1*). Лише у сортів Мирлена та Миронівська 66 селекції МП та ІФРiГ було визначено цей алель маркера (рис., табл.). Обидва ці сорти мають у родоводах лінію *Lutescens-6538*, яка, в свою чергу, походить від німецьких сортів пшениці [11]. Проте їх у родоводах сортів, у яких авторами маркера було визначено алель *Molineux*, нам знайти не вдалося [11]. Сорти, у яких нами був визначений нуль-алель маркера, не несуть стійкості до *H. avenae* за *Cre8*-типом [12].

Висновки

За допомогою маркера гена *Cre8* помірної стійкості до вівсяної нематоди було досліджено 24 сорти пшениці м'якої, створені у різних кліматичних зонах України. У сортах селекції Степової зони алеля стійкості не було виявлено, у двох сортах селекції Лісостепової зони, а саме Мирлена та Миронівська 66, було визначено алель стійкості цього гена. Отже, ці сорти можуть бути джерелом помірної стійкості до нематоди виду *H. avenae*. З огляду на зміни в кліматі й складі природного інфекційного фону варто більш повно дослідити український генофонд пшениці м'якої за допомогою маркерів генів стійкості до вівсяної нематоди.

ЛІТЕРАТУРА

1. Meagher J.W. Yield loss caused by *Heterodera avenae* in cereal crops grown in a Mediterranean climate // EPPO Bulletin. – 1982. – 12, № 4. – P. 325–331.
2. Бойченко С.Г., Волощук В.М., Дорошенко І.А. Глобальне потепління та його наслідки на території України // Український географічний журнал. – 2000. – № 2. – С. 59–68.
3. Ретьман С.В., Шевчук О.В., Горбачова Н.П. Хвороби листя і колоса // Карантин і захист рослин. – 2011. – № 4. – С. 25–27.
4. Valdeolivas, Romero M.D., Muniz M. Effect of temperature on juvenile emergence of Spanish populations of *Heterodera avenae* // Nematologia Mediterranea. – 1991. – 19, № 1. – P. 37–40.
5. Luc M., Sikora R.A., Bridge J. (eds.) Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. – Wageningen, the Netherlands: CABI, 2005. – 831 p.
6. Sharma S.B. (Ed.) The cyst nematodes. – Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1998. – 459 p.
7. Brown R.H. Ecology and control of cereal cyst nematode (*Heterodera avenae*) in Southern Australia // Journal of Nematology. – 1984. – 16, № 3. – P. 216–222.
8. Ogbonnaya F.C., Eastwood R.F., Lagudah E. Identification and utilisation of genes for cereal cyst nematode resistance (*Heterodera avenae*) resistance in wheat: the Australian experience // Proceedings of the First Workshop of the International Cereal Cyst Nematode Initiative «Cereal cyst nematodes: status, research and outlook», Antalya, Turkey, 2009. – P. 166–171.
9. Jones J., Gheysen G., Fenoll C. (Eds.) Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions. – Dordrecht, the Netherlands: Springer Press, 2011. – 557 p.
10. de Majnik J., Ogbonnaya F.C., Moullet O., Lagudah E.S. The *Cre1* and *Cre3* nematode resistance genes are located at homeologous loci in the wheat genome // MPMI. – 2003. – 16, № 12. – P. 1129–1134.
11. GRIS – Genetic resources information system for wheat and triticales [Електронний ресурс] // International Maize and Wheat Improvement Center, El Batan, Mexico. – 2016. – Режим доступу: <http://wheatpedigree.net/>
12. Jayatilake D.V., Tucker E.J., Brueggemann J., Lewis J., Garcia M., Dreisigacker S., Hayden M.J., Chalmers K., Mather D.E. Genetic mapping of the *Cre8* locus for resistance against cereal cyst nematode (*Heterodera avenae* Woll.) in wheat [Електронний ресурс] // Mol. Breeding. – 2015. – 35, № 66. – 12 p. – Режим доступу: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11032-015-0235-3#page-1>.
13. Williams K., Willsmore K., Olson S., Matic M., Kuchel H. Mapping of a novel QTL for resistance to cereal cyst nematode in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2006. – 112, № 8. – P. 1480–1486.
14. Safari E., Gororo N.N., Eastwood R.F., Lewis J., Eagles H.A., Ogbonnaya F.C. Impact of *Cre1*, *Cre8* and *Cre3* genes on cereal cyst nematode resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2005. – 110, № 3. – P. 567–572.
15. Brolaski M.N., Venugopal R.J., Stolow D. Kits and processes for removing contaminants from nucleic acids in environmental and biological samples. Application for a patent: Mo. Bio. Laboratories, Inc. – No. US7459548 B2. Declaration No. US 11/134849. Applied on 02.12.2008.

KARELOV A.V.^{1,2}, KOZUB N.A.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, PYLYPENKO L.A.¹, BLUME YA.B.²

¹ Institute of Plant Protection, NAAS,
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: sia1@i.com.ua

² Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,
Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a

ALLELIC STATE OF THE *CRE8* GENE CONFERRING RESISTANCE TO THE NEMATODE *HETERODERA AVENAE* WOLL. IN COMMON WHEAT CULTIVARS OF UKRAINIAN BREEDING

Aim. The work is devoted to discovering the presence of resistance to the cereal cyst nematode in the Ukrainian common wheat germplasm. **Methods.** The molecular-genetic marker *wri15* co-segregating with the *Cre8* gene that confers moderate resistance to *H. avenae* was used. **Results.** Common wheat cultivars developed in different climatic zones (24 in total) were studied. Two cultivars, carrying the resistant allele of the marker were detected. **Conclusions.** In the Ukrainian common wheat germplasm there are cultivars that can be the source of moderate resistance to the cereal cyst nematode. They probably inherited the resistant allele of the gene from old German cultivars. It is reasonable to keep studying Ukrainian common wheat germplasm to search for sources of resistance conferred by the *Cre8* gene.

Keywords: cereal cyst nematode, common wheat, molecular markers, *Cre8*.