



Генетика, селекція, біотехнологія

УДК 633.11:575:631.52
© 2013

О.О. Созінов,
академік НААН
і НАН України
Інститут захисту
рослин НААН

Є.В. Заїка
ННЦ
«Інститут землеробства
НААН України»

А.В. Карелов
Н.О. Козуб,

Л.А. Пилипенко,
кандидати
біологічних наук
Інститут захисту
рослин НААН

О.З. Щербина,
кандидат сільсько-
господарських наук
ННЦ
«Інститут землеробства
НААН України»

І.О. Созінов
Інститут захисту
рослин НААН

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНОГО СТАНУ ЛОКУСУ СТІЙКОСТІ ДО ХВОРОБ Lr34/Yr18/Pm38 У СОРТІВ ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ ОЗИМОЇ

За допомогою молекулярно-генетичного маркера calSBP1 ідентифіковано «стійкий» алельний стан гена Lr34/Yr18/Pm38 широкої расонеспецифічної стійкості до іржастих хвороб в 11 (39%) з 28 сортів пшениці м'якої озимої ННЦ «Інститут землеробства НААН». Стійкість, пов'язана з локусом Lr34, поширена в сортах, створених у різні періоди, що може свідчити про його широке адаптивне значення, яке не втратило актуальності й донині. Є сенс і надалі використовувати «стійкий» алельний стан гена Lr34 у зоні Полісся під час створення стійких до іржастих хвороб сортів пшениці, оскільки помірна температура й освітлення, характерні для цієї агрокліматичної зони, є оптимальними для його експресії.

Ключові слова: пшениця м'яка, іржасті гриби, нерасоспецифічна стійкість, алельний стан, кодомінантний маркер

Пошук сортів-донорів з генами стійкості до фітопатогенів є важливим і досить трудомістким етапом селекції. Для проведення ефективної селекційної роботи потрібно мати велику кількість даних про гени стійкості, а найголовніше — вміти швидко ідентифікувати їх у популяції. У польових умовах часто важко точно визначити фенотиповий вияв стійкості через вплив зовнішніх факторів. Значно прискорює цей процес використання молекулярних ДНК-маркерів, що дають змогу швидко ідентифікувати алельний стан гена в лабораторних умовах з високою точністю.

У пшениці відомо 3 види іржі: бура, стеблова та жовта, збудниками яких є гриби порядку

Uredinales. В окремі роки недобір врожаю через буру іржу становить 15–20%, через стеблову — 60–70, а через жовту — 20% і більше [1, 2]. Іржа перешкоджає утворенню в зерні глютенінових компонентів з низькою молекулярною масою, які зумовлюють високі хлібопекарські властивості, а також знижує інтенсивність процесів синтезу та відкладання крохмалю і протеїну в ендоспермі, що призводить до плюсклості зерна. За сильного ураження іржастими грибами у рослинах знижується вміст білка, клейковини, моно- та дицукрів у зерні, що негативно впливає на його якість [5].

Відомо, що джерелами різних генів стійкості є дикі родичі пшениці. Крім того, є окремі сор-

Алельний стан локусу *Lr34/Yr18/Pm38* у сортах пшениці м'якої озимої селекції ННЦ «Інститут землеробства НААН»

Сорт	Рік районування	Алельний стан локусу	Сорт	Рік районування	Алельний стан локусу
Поліська 71	1971	+/-	Копилівчанка	2003	-
Поліська 70	1974	+	Столична	2005	+
Київська 73	1974	+	Гном	2007	-
Колективна 77	1974	-	Артеміда	2008	+
Київський напівкарлик	1977	+	Аналог	2008	+
Поліська безоста	1981	+	Бенефіс	2008	+
Поліська 80	1982	+	Епілог	2009	-
Щедра Полісся	1986	-	Краєвид	2012	-
Поліська 87	1990	+/-	Ольжана		-
Поліська 92	1992	+/-	Журавка		+
Поліська 90	1994	-	Мірютинка		+/-
Поліська 1259	1995	-	Поліська 107		+/-
Поліська 29	1996	+/-	І315-12 (Іродона)		+
Поліська 95	1996	+/-	І349-12 (Кесарія)		+/-

Примітка. «+» — стійкий алельний стан; «-» — чутливий алельний стан; «+/-» — поліморфізм за виявом алельного стану.

ти пшениці, які можуть бути джерелами чи донорами стійкості, але використовуються в схрещуваннях обмежено. Особливо цінними в селекційному плані є гени, асоційовані з широкою расонеспецифічною стійкістю до кількох патогенів. Така стійкість пов'язана з полегшенням перебігом хвороби, сповільненням проникнення гаусторій патогену в клітини рослини-хазяїна, синтезом ряду захисних протеїнів та саліцилової кислоти [8].

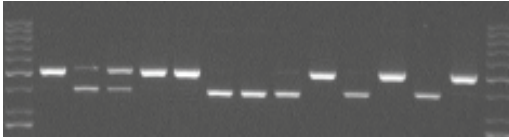
Завдяки своїй стабільності і здатності протистояти кільком патогенам *Lr34* є одним з найважливіших генів стійкості у селекції пшениці. Він включений у понад 50% сортів пшениці у всьому світі і став компонентом стійкості до хвороб під час створення високоврожайних сортів на початку зеленої революції [7].

Нами для аналізу було обрано локус *Lr34*, що у відповідному алельному стані (далі — *Lr34+*) асоціюється з расонеспецифічною стійкістю до бурої іржі (збудник — *Puccinia triticina* f. sp. *tritici*), жовтої іржі (збудник — *P. striiformis* f. sp. *tritici*), де його позначали як *Yr18* [12], борошністої роси (збудник — *Blumeria graminis* (DC.) Speer), де раніше він був відомий як *Pm38* [14], толерантністю до вірусу жовтої карликовості ячменю [11] та (ймовірно) до стеблової іржі (збудник — *P. graminis* f. sp. *tritici*) [12]. Фенотиповим виявом *Lr34*-стійкості є некроз кін-

чиків листків, пов'язаний з геном *Ltn1*, який в окремих випадках можна використовувати як фенотиповий маркер у польових умовах [11]. Вважають, що алель гена *Lr34/Yr18/Pm38* зберігає свої властивості впродовж 50 років [8]. Також, згідно з попередніми дослідженнями, цей алель трапляється і серед сортів пшениці української селекції [6].

Мета роботи — ідентифікація алельного стану маркера, який свідчить про алельний стан гена *Lr34/Yr18/Pm38*, що зумовлює стійкість до іржастих хвороб пшениці в сортах української селекції, створених у Поліській та Лісостеповій зонах України.

Матеріал і методика досліджень. Проводили ПЛР зі зразками ДНК, виділеними із зернівок 28 сортів пшениці м'якої озимої, створених у періоди роботи до 1990 р. та з 1992 по 2012 р. відділом селекції зернових культур ННЦ «Інститут землеробства НААН»: Поліська 90, Поліська 95, Колективна 77, Щедра Полісся, Поліська 71, Поліська 80, Поліська 87, Поліська 107, Журавка, Столична, Епілог, Гном, Краєвид, Артеміда, Копилівчанка, Аналог, Бенефіс, Поліська 70, Поліська безоста, Київська 73, Поліська 29, Поліська 1259, Поліська 92, Мірютинка; сорт Ольжана (у державному сорто-випробуванні); нові перспективні сорти І315-12 (Іродона), І349-12 (Кесарія). Сорт Київська на-



Електрофореграма продуктів ПЛР, отриманих зі зразками ДНК сортів пшениці м'якої озимої Інституту землеробства та праймерами, що фланкують маркер *calSBP1*: 1 – Поліська 80; 2 – Поліська 87; 3 – Поліська 107; 4 – Журавка; 5 – Столична; 6 – Епілог; 7 – Гном; 8 – Краєвид; 9 – Артеміда; 10 – Копилівчанка; 11 – Аналог; 12 – Renan (*St*-); 13 – Chinese Spring (*St*+); L – маркер молекулярних мас (50 bp DNA Ladder)

півкарликова, створений Інститутом фізіології рослин і генетики НАН України з сорту Поліська 70, також взятий для дослідження. Насіння було взяте з колекції Інституту землеробства та з Національного центру генетичних ресурсів рослин України (Харків).

ДНК виділяли за допомогою наборів Diatom™ DNA Prep 100 (торговельний представник в Україні — фірма NEOGENE®) за стандартним протоколом.

Для визначення алельного стану гена *Lr34/Yr18/Pm38* використано алель-специфічний маркер *calSBP1* (insertion site-based polymorphism marker) [6]. Це кодомінантний маркер, він міститься між локусом *Lr34*, що кодує так званий ABC-транспорт, і першим цитохромом *P450* у ділянці, яка впливає на експресію стійкості. ПЛР проводили за допомогою наборів GenPak® PCR Core (торговельний представник в Україні — фірма NEOGENE®) відповідно до рекомендацій. Результати ПЛР візуалізували способом електрофорезу у 2–2,5%-му агарозному гелі із 1×TBE буфером та фарбуванням бромистим етидієм. У разі «стійкого» алельного стану з одним із «форвард»-праймерів та єдиним «реверс»-праймером відпалювали фрагмент завдовжки 509 п.н., у разі «чутливого» алельного стану з іншим «форвард»-праймером та тим самим «реверс»-праймером — амплікони завдовжки 391 п.н. Як сорти стандарти алельних станів використовували Chinese Spring (стійкий алельний стан *St*+) та Renan (чутливий алельний стан *St*-). Маркерами мо-

лекулярних мас були GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder ready-to-use (фірма Fermentas) [6].

Результати та їх обговорення. Серед 28 зразків селекції Інституту землеробства 11 мали «стійкий» алельний стан маркера *calSBP1*, а саме: Столична, Артеміда, Аналог, Бенефіс, Поліська 70, Поліська безоста, Київська 73, Київська напівкарликова, Поліська 80, Журавка, І315-12 (таблиця, рисунок).

У 9-ти сортах алельний стан маркера відповідав «чутливому» алельному стану локусу *Lr34*: Поліська 90, Колективна 77, Щедра Полісся, Епілог, Гном, Краєвид, Копилівчанка, Ольжана, Поліська 1259. У 8-ми зразків виявлено поліморфізм за цим маркером: Поліська 95, Поліська 71, Поліська 87, Поліська 107, Поліська 29, Поліська 92, Мірютинка, І349-12. Стійкість, зумовлена *Lr34*, однаково поширена як у сортах, створених до 1990 р., так і в сортах періоду 1992–2012 рр. Наявність стійкості, пов'язаної із локусом *Lr34*, у сортах місцевої селекції свідчить про його широке адаптивне значення, яке не втратило актуальності й нині. З огляду на характер експресії стійкості за *Lr34* типом, ймовірно, що у сортах з алелем *Lr34+* мають експресуватися й інші гени, пов'язані зі стійкістю до іржастих грибів. Це, а також специфіка селекційного процесу в Інституті землеробства (а саме, використання помірних інфекційних фонів) могло б пояснити відбір генетичного матеріалу з алелем *Lr34+* у процесі селекції. Крім того, вірогідно, що у родоводі сортів з алелем *Lr34+* маркера *calSBP1* є сорт Безоста 1, який вважають джерелом *Lr34*-стійкості як для українських, так і світових сортів пшениці [4]. Аналіз запасних білків сортів селекційного центру також свідчить про наявність практично у всіх сортах алелів гліадинкодуювальних локусів, що могли бути успадкованими від сорту Безоста 1 й відібраними у селекційному процесі з огляду на їх цінні хлібопекарські властивості [3, 9]. Є сенс і надалі використовувати стійкий алельний стан гена *Lr34* у зоні Полісся під час створення стійких до іржастих хвороб сортів пшениці, оскільки помірні температура й освітлення, що характерні для цієї агрокліматичної зони, є оптимальними для його експресії [10].

Висновки

За допомогою молекулярно-генетичного маркера *calSBP1* проведено ідентифікацію

алельного стану гена *Lr34/Yr18/Pm38* у 28 сортів пшениці м'якої озимої селекції Інститу-

ту землеробства. З них 11 (39%) мали «стійкий» алельний стан локусу *Lr34*: Столична, Артеміда, Аналог, Бенефіс, Поліська 70, Поліська безоста, Київська 73, Київська напівкарликова, Поліська 80, Журавка, ІЗ15-12. У 9-ти зразках алельний стан маркера відповідає «чутливому» алельному стану локусу *Lr34* (32%), у 8-ми сортів (29%) виявлено поліморфізм за локусом *Lr34+*. Стійкість, пов'язана з

локусом *Lr34*, однаково поширена як у сортах, створених до 1990 р., так і в сортах, створених в 1992–2012 рр., що пояснюється його позитивним впливом на стійкість пшениці до іржистих хвороб і важливим адаптивним значенням. «Стійкий» алельний стан локусу *Lr34+* доцільно залучати до селекційного процесу під час створення сортів, стійких до комплексу хвороб.

Бібліографія

1. *Болезни сельскохозяйственных культур*: в 3 т./[сост. Пересыпкин В.Ф., Кирик Н.Н., Лесовой М.П. и др.; под ред. Пересыпкина В.Ф.]. — К.: Урожай, 1990. — Т. 1. — 213 с.
2. *Довідник із захисту рослин*/[Бублик Л.І., Васечко Г.І., Васильев В.П. та ін.]; за ред. М.П. Лісового — К.: Урожай, 1999. — 744 с.
3. *Заїка Є.В.* Характеристика сортів озимої м'якої пшениці селекції ННЦ «Інститут землеробства НААН» за локусами запасних білків/Заїка Є.В., Козуб Н.О., Созінов І.О., Гірко В.С., Голик Л.М.//Міжнар. наук. конф. «Селекція та генетика сільськогосподарських рослин: традиції та перспективи» (до 100-річчя Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннєзнавства та сортовивчення). — Одеса, 2012. — С. 152–153.
4. *Карелов А.В.* Ідентифікація алельного стану гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* у сортів озимої м'якої пшениці української селекції/Карелов А.В., Пирко Я.В., Козуб Н.А., Созінов І.А., Пирко Н.Н., Блюм Я.Б., Литвиненко Н.А., Лыфенко С.Ф., Колючий В.Т., Созінов А.А.//Цитология и генетика. — 2011. — Т. 45, № 5. — С. 3–10.
5. *Колючий В.Т.* Селекція, насінництво і технології вирощування зернових колосових культур у Лісостепу України/В.Т. Колючий, В.А. Власенко, Г.Ю. Борсух. — К.: Аграр. наука, 2007. — 800 с.
6. *Dakouri A.* Fine-mapping of the leaf rust *Lr34* locus in *Triticum aestivum* (L.) and characterization of large germplasm collections support the ABC transporter as essential for gene function/Dakouri A., McCallum B.D., Walichnowski A.Z., Cloutier S.//Theor Appl Genet. — 2010. — V. 121. — P. 373–384.
7. *Hoisington D.* Plant genetic resources: what can they contribute toward increased crop productivity?/Hoisington D., Khairallah M., Reeves T., Ribaut J., Skovmand B., Taba S., Warburton M.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — V. 96. — P. 5937–5943.
8. *Krattinger S. G.* A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat/[Krattinger S. G. et al]//Science 323. — P. 1360–1363. — 2009. — Supporting online material: www.sciencemag.org/cgi/content/full/1166453/DC1.
9. *Labuschagne M.T.* The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on bread-making quality in wheat/Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobelaar B.//Euphytica. — 2002. — V. 124. — P. 65–70.
10. *McIntosh R.A.* Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes/[McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F.]. — Australia: CSIRO. — 1995. — P. 74–76.
11. *Shah S.J.A.* Using leaf tip necrosis as a phenotypic marker to predict the presence of durable rust resistance gene pair *Lr34/Yr18* in wheat/Shah S.J.A., Hussain S., Ali I., Ibrahim M., Ahmad M., Farhatullah/J. Gen. Plant Pathol. — 2011. — 77. — P. 174–177.
12. *Singh R.P.* Genetic Association of Leaf Rust Resistance Gene *Lr34* with Adult Plant Resistance to Stripe Rust Resistance in Bread Wheat/Singh R.P.//Phytopathology. — 1992. — V. 82, № 8. — P. 835–838.
13. *Singh R.P.* Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to Barley Yellow Dwarf Virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat/Singh R.P.//Plant Dis. — 1993. — 77. — P. 1103–1106.
14. *Spielmeier W.* Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust co segregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat/Spielmeier W., McIntosh R.A., Kolmer J., Lagudah E.S.//Theor. Appl. Genet. — 2005. — 111. — P. 731–735.

Надійшла 23.01.2013.