

Я.В. Пірко**ДЕТЕКЦІЯ ГЕТЕРОГЕННОСТІ СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ
ЗА ДОПОМОГОЮ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МАРКЕРУ *CSSFR5*,
ЩО АСОЦІОУЄТЬСЯ З ГЕНОМ СТІЙКОСТІ ДО БУРОЇ ІРЖІ (*Lr34*)***Triticum aestivum* L., молекулярно-генетичні маркери, ген *Lr34*, поліморфізм, гетерогенність сортів**Вступ**

Важко уявити сучасний селекційний процес без застосування генетичних маркерів. Серед них найбільшу популярність отримали ДНК-маркери, які використовуються для генотипування сортів та маркування у них певних ознак, зокрема стійкості до хвороб [3, 7, 8, 16, 17]. Відомо, що хвороби, викликані різного роду грибними патогенами, призводять до досить значних втрат врожаїв пшениці. Не є виключенням цього і бура іржа, яка викликається *Puccinia triticina* Erikss [18]. Одним з підходів у селекції стійких до бурої іржі сортів є пошук та маркування генів, що відповідають за їхню стійкість до цього патогену. Серед них перспективним виявився ген *Lr34* [6, 14, 15]. На відміну від більшості генів, що забезпечують резистентність до іржі й інших шкідливих грибів лише протягом декількох років, ген *Lr34* надає «дорослу» (adult plant resistance, APR) родову неспецифічну резистентність до бурої іржі і зберігає свою ефективність протягом багатьох сезонів [12]. Встановлено, що у пшениці *Lr34* може бути представлений двома алелями: *Lr34(+)* – алель, що надає сортам стійкість до бурої іржі; *Lr34(-)* – алель, характерний для «чутливих» сортів. Враховуючи цю обставину, було розроблено кодомінантний маркер *cssfr5* для визначення наявності та визначення алельного стану гена *Lr34* [12]. Ця маркерна система базується на детекції поліморфного стану одного з екзонів гена *Lr34* за допомогою проведення мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [12]. В той же час, під час скринінгових досліджень сортів пшениці на наявність та визначення алельного стану локусу *Lr34* вдалося помітити ще одну властивість цієї маркерної системи. За допомогою неї в окремих випадках можна виявити гетерогенність сортів, хоча про таку раніше ніде не повідомлялося. Тобто, якщо в процесі аналізу виявиться, що у сорту детектуються одночасно обидва алеля за геном стійкості до бурої іржі *Lr34*, то можна припустити, що відбулося або «засмічення» сорту чужорідним генетичним матеріалом, або він є гетерогенним за своєю природою (може бути представлений декількома лініями (біотипами)).

Мета досліджень – виявити сорти, у яких детектуються одночасно *Lr34(+)* та *Lr34(-)* алелі під час скринінгових досліджень сортів м'якої озимої пшениці української селекції за допомогою маркеру *cssfr5*.

Матеріали та методи досліджень

Аналізували сорти озимої м'якої пшениці, що були створені у Селекційно-генетичному інституті НААН України (в подальшому СГІ), Миронівському інституті пшениці ім. В.М. Ремесла НААН України (МІП) та Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРГ). В якості контролю використовували сорти 'Thatcher *Lr34(+)*' (RL6058) (позитивний контроль) та 'Thatcher *Lr34(-)*' (негативний контроль). У цілому було проаналізовано більше ніж 80 сортів [1]. ДНК виділяли з 3–5-денних проростків за допомогою ЦТАБ (броміду цетилтриметиламонію) методу [9], при цьому для екстракції ДНК використовували 10–15 проростків кожного сорту як окремо, так і їх суміш. З метою встановлення алельного стану гена *Lr34* у досліджуваних сортах використовували молекулярний маркер *cssfr5* [12]. Для цього проводили мультиплексну ПЛР з праймерами, наведеними у таблиці.

Таблиця. Характеристика молекулярно-генетичного маркера *cssfr5*, що застосовується для детекції алельного стану гена стійкості пшениці до бурі іржі *Lr34* за допомогою ПЛР

Маркер	Праймери	Довжина ампліконів (п.н.)	Потенційна властивість сорту
<i>cssfr5</i>	F: L34SPF–5'GGGAGCATATTTTTTCCATCATG3' R: L34DINT13R2– 5'ACTTTCCTGAAAATAATACAAGCA3'	(+)751	стійкі
	F: L34DINT9F–5'TTGATGAAACCAGTTTTTTTTCTA3' R: L34MINUSR–5'TATGCCATTTAAACATAATCATGAA3'	(-)523	чутливі

Праймери були синтезовані на синтезаторі 3400 DNA Synthesizer (Applied Biosystems, США) у Центрі колективного користування приладами Державної установи «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України». Вихідна концентрація праймерів була наступною: L34DINT9F – 20,5 нМ, L34MINUSR – 30,9 нМ, L34SPF – 34 нМ, L34DINT13R2 – 18,3 нМ. Для проведення ПЛР на один зразок об'ємом 25 мкл брали 2 мкл ДНК (100 нг), 2,5 мкл 10х ПЛР-буфера з MgCl₂ та KCl, по 1 мкл L34DINT9F і L34DINT13R2 праймерів, по 0,5 мкл L34SPF і L34MINUSR праймерів, 0,5 мкл дНТФ (із розрахунку кінцевої концентрації 25 мМ) та 0,5 мкл ДНК-полімерази з активністю 1000 од. (Fermentas, Литва), всі інші реактиви – компанії «Хелікон» (Helicon), Росія. Ампліфікацію здійснювали за наступним температурним режимом. Початкову денатурацію ДНК проводили при температурі 94°C протягом 3 хв. У подальшому здійснювали 45 циклів у режимі: денатурація – 94°C (30 сек.), віджиг праймерів – 55°C (30 сек.), елонгація – 72°C (45 сек.), заключна елонгація – 72°C (4 хв.). Під час ПЛР у зразків пшениці *Lr34(-)/Lr34(-)* відбувалася ампліфікація фрагменту довжиною 523 п.н., а у *Lr34(+)/Lr34(+)* утворювався фрагмент довжиною 751 п.н. [12]. Відповідно, у зразків пшениці, що мали одночасно алелі *Lr34(+)* та *Lr34(-)*, ампліфікувалися одразу два фрагменти – 523 п.н. та 751 п.н.

Отримані під час ПЛР продукти реакції аналізували за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозному гелі. Для візуалізації ДНК в агарозному гелі під дією ультрафіолетового світла застосовували бромистий етидій. З метою визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use, 100-3000 bp; «Fermentas», Литва).

Результати досліджень та їх обговорення

В результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу більше ніж 80 сортів пшениці української селекції вдалося виявити 3 сорти, у яких алелі *Lr34(+)* та *Lr34(-)* детектувалися одночасно (рис. 1, рис. 2). До них належать сорти: 'Сирена СГІ', 'Миронівська 30', 'Доброчин СГІ'. Слід зазначити, що в нашій попередній публікації [1] згадується про гетерогенність тільки сорту 'Миронівська 30'. Сорти 'Сирена СГІ' та 'Доброчин СГІ' мали алель *Lr34(-)* і були віднесені до потенційно нестійких сортів. В той же час, із збільшенням вибірки рослин, що аналізували (10 і більше проростків рослин), вдалося виявити, що ці два сорти також мали одночасно два алелі *Lr34(+)* та *Lr34(-)*, що може бути наслідком або елементарного «засмічення» сортів чужорідним генетичним матеріалом, або гетерогенності сорту (суміші біотипів, що містять різні алелі).

Згідно наявної інформації [10, 11], сорт 'Миронівський 30' та його батьківська форма 'Миронівська 27' відносяться до стійких до бурі іржі сортів. Це вказує на те, що сорт 'Миронівський 30' повинен мати алель *Lr34(+)*. В той же час у публікації, що присвячена виявленню гена стійкості *Lr34* сортів м'якої пшениці за допомогою мікросателітного маркера *Xgwm 295*, сорт 'Миронівський 30' наводять як *Lr34(-)* сорт [3]. Сорт 'Сирена СГІ' у каталозі СГІ наведено як стійкий до бурі іржі сорт [2]. Тому, більш ймовірним є те, що цей сорт та сорт 'Доброчин СГІ' за своєю природою є гетерогенними.

На користь цього також свідчить виявлена гетерогенність цих двох сортів за гліадинами (неопубліковані персональні дані Н.О. Козуб, Інститут захисту рослин НААНУ). Слід зазначити, що випадки існування генетичної гетерогенності сортів були зареєстровані іншими дослідниками. Наприклад, генетичну гетерогенність сортів, але за мікросателітними маркерами, вдалося виявити під час дослідження локусу *Xgwm 261*, що маркує ген карликовості RHT8 у гексаплоїдній пшениці в болгарській та бельгійській колекціях [19]. До речі, частота такої гетерогенності виявилася дуже низькою (лише 2 випадки з 174 проаналізованих сортів). У той же час багато індійських генотипів пшениці виявилися «гетерозиготними» за *Lr34* геном [13]. У дослідженні генетичного різноманіття районуваних у Росії сортів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) за генами, що кодують запасні білки, було встановлено, що більш ніж 50% з них характеризуються внутрішньосортовою гетерогенністю щодо гліадину. Досліджені сорти містили від 2 до 8 біотипів, що різняться за алейним складом гліадинкодуючих локусів. Це може свідчити про досить високий рівень генетичної мінливості, яка властива для російських сортів озимої пшениці [4]. Значний поліморфізм було відмічено за різноманітними мікросателітними локусами при дослідженні молекулярно-генетичного поліморфізму українських сортів озимої м'якої пшениці [5].

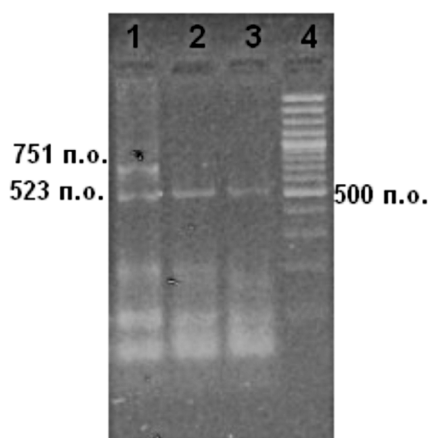


Рис.1 Результати аналізу деяких сортів пшениці з використанням молекулярного маркера *cssfr5*.

Зразки 1–3 – сорти пшениці ('Миронівська 30', 'Антоновка СГП', 'Заможність СГП'), 4 – ДНК-маркер – (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder). Сорт 'Миронівська 30' («гетерозигота») представлений одночасно двома аелями *Lr34(+)* – 751 п.о. та *Lr34(-)* – 523 п.о.; сорти 'Антоновка СГП' та 'Заможність СГП' – одним аелем *Lr34(-)* – 523 п.о.

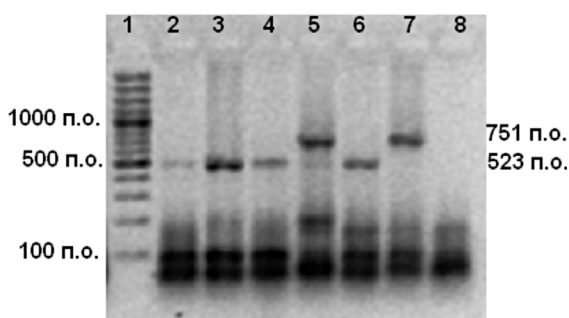


Рис.2 Результати аналізу сорту пшениці 'Миронівська 30' з використанням молекулярного маркера *cssfr5*.

1– ДНК-маркер – (O'GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder). Зразки 2–7 – окремі проростки сорту пшениці 'Миронівська 30'. Зразок 8 – умовний контроль (без додавання ДНК). Аель *Lr34(+)* – 751 п.о., *Lr34(-)* – 523 п.о.

Зокрема у сортів селекції СГП їх частка становить більш ніж 80% [5]. Таким чином, можна стверджувати, що наявність гетерогенності у сучасних сортів пшениці не є рідкістю. Слід одразу зазначити, що ця гетерогенність не обов'язково є наслідком «засмічення». У більшості випадків вона виникає як суміш ліній (біотипів). До речі, деякі дослідники вважають [5], що присутність у сортів декількох біотипів певною мірою забезпечує їм більшу стійкість до несприятливих зовнішніх умов. В той же час, згідно вимог Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (UPOV), членом якого є Україна, всі сорти повинні бути гомогенними [5], а чистота сортів повинна постійно контролюватися, зокрема з використанням молекулярно-генетичних маркерів (білків, ДНК-маркерів). Таким чином, у випадку застосування молекулярного маркера *cssfr5* дослідник має подвійну користь. По-перше, він може встановити наявність та визначити алейний стан гена *Lr34*, а по-друге, – отримати інформацію стосовно гетерогенності сорту.

Заключення

У результаті проведених досліджень локусу *Lr34*, який відповідає за стійкість пшениці до бурої іржи, більш ніж 80 сортів озимої м'якої пшениці миронівської та одеської селекції, у сортів 'Миронівська 30', 'Доброчин СГ' та 'Сирена СГ' детектувалося одночасно два алеля *Lr34(+)* та *Lr34(-)*. Це може вказувати на гетерогенність вищезазначених сортів, яка є наслідком або «за-смічення», або суміші біотипів. Таким чином, молекулярно-генетичний маркер *cssfr5* може бути застосований не тільки для виявлення та встановлення алельного стану локусу *Lr34*, але й для визначення однорідності сорту.

1. Карелов А.В. 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. Каталог сортів та гібридів зернових, зернобобових, олійних, кормових культур Селекційно-генетичного інституту (озима м'яка пшениця, озима тверда пшениця, ярий та озимий ячмінь, кукурудза, соняшник, горох) [Селекційно-генетичний інститут – Національний центр насіннезнавства та сортовивчення (СГ – НЦНС)]. – Одеса, ЗАТ «Селена». – 2011. – 127с.
3. Радченко А.М. Определение гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в сортах мягкой пшеницы с использованием микросателлитного маркера / А.М. Радченко, Е.Н. Тищенко // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 41–45.
4. Фисенко А.В. Изучение генетического разнообразия мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) по генам запасных белков: автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук: спец. 03.00.15 «Генетика» / А.В. Фисенко. – М., 2008. – 26 с.
5. Чеботар С.В. Молекулярно-генетичний поліморфізм українських сортів озимої м'якої пшениці / С.В.Чеботар // Збірник наукових праць СГ – НЦНС. – 2011. – Вип. 17 (57) – С. 17–29.
6. Dyck P.L. Inheritance of leaf rust and stem rust resistance in 'Roblin' wheat / P.L.Dyck // Genome. – 1993. – Vol. 36. – P. 289–293.
7. Evans S. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens / S.Evans, E.Lagudah, S.Krattinger [et al.] // Theor. Appl. Genetics. – 2009. – Vol. 119 – P. 889–898.
8. Gupta V. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *Lr15* in bread wheat / V.Gupta, R.Khan, A.Rajwade [et al.] // 11-th International Wheat Genetics Symposium 2008. – Sydney University Press. – 2008. – P. 724–726.
9. Выделение геномной ДНК из растений [http://molbiol.ru/protocol/14_05.html].
10. Сорт Мироновская 30 [http://ukragroexport.com.ua/up38.html].
11. Сорт Мироновская 27 [http://www.agrisoft.ru/agro_kulture_psh_oz.php].
12. Lagudah E. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens / E.Lagudah, S.Krattinger, S.Herrera-Foessel [et al.] // Theor. Appl. Genetics. – 2009. – Vol. 119. – P. 889–898.
13. Priyamvada STS marker based tracking of slow rusting *Lr34* gene in Indian wheat genotypes / Priyamvada, R.Tiwari, M. Saharan [et al.] // Indian J. Biotechnol. – 2009. – Vol. 8. – P. 207–213.
14. Singh R.P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat / P.R.Singh // Phytopathology. – 1992. – Vol. 82. – P. 835–838.
15. 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 / P.R. Singh // Plant Dis. – 1993. – Vol. 77. – P. 1103–1106.
16. Suenaga K. Microsatellite markers for genes *Lr34/Yr18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat / K.Suenaga, R.Singh, J.Huerta-Espino [et al.] // Phytopathology. – 2003. – Vol. 93. – P. 881–890.
17. Urbanovich O.Yu. Identification of leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using molecular markers / O.Yu.Urbanovich, S.Malyshev, T.Dolmatovich [et al.] // Genetika. – 2006. – Vol. 42. – P. 675–683.
18. www.fao.org
19. Zheleva D. Allele distribution at microsatellite locus Xgwm 261 marking the dwarfing gene *Rht 8* in hexaploid wheat from Bulgarian and Belgian gene bank collections and its application in breeding programs / D. Zheleva, E. Todorovska, J.-M. Jacquemin [et al.] // Biotechnology & Biotechnological Equipment – 2006. – Vol. 20. – P. 45–56.

УДК 577.123:633.11:632.4

ДЕТЕКЦІЯ ГЕТЕРОГЕННОСТІ СОРТІВ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ ЗА ДОПОМОГОЮ
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОГО МАРКЕРУ *CSSFR5*, ЩО АСОЦІЮЄТЬСЯ
З ГЕНОМ СТІЙКОСТІ ДО БУРОЇ ІРЖІ (*LR 34*)

Я.В. Пірко

Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України

Молекулярно-генетичний маркер *cssfr5*, що асоціюється з геном стійкості до бурої іржі (*Lr34*), використано для детекції гетерогенності українських сортів м'якої пшениці. З понад 80 досліджених сортів у трьох був встановлений внутрішньосортовий поліморфізм, тобто одночасна наявність алелей *Lr34(+)* та *Lr34(-)*. Це може бути ознакою гетерогенності цих сортів, або наслідком їх «засмічення». Пропонується використання маркеру *cssfr5* не тільки для виявлення та встановлення алельного стану гена *Lr34*, але й для детекції однорідності сортів.

UDC 577.123:633.11:632.4

DETECTION OF HETEROGENEITY OF SOFT WHEAT VARIETIES WITH MOLECULAR GENETIC
MARKER *CSSFR5*, ASSOCIATED WITH THE GENE OF RESISTANCE TO LEAF RUST (*LR 34*)

Ya. V. Pirko

Institute of Food Biotechnology and Genomics of the National Academy of Sciences of Ukraine

Molecular genetic marker *cssfr5*, associated with the gene of resistance to leaf rust (*Lr34*) have been used for detection of heterogeneity of Ukrainian soft wheat varieties. The intravarietal polymorphism, i.e. the simultaneous presence of alleles *Lr34 (+)* and *Lr34 (-)*, have been found in three of more than 80 varieties. This fact may be an indication of heterogeneity of these varieties, or the consequence of their 'contamination'. It is proposed to use marker *cssfr5* not only to identify and establish allelic state of gene *Lr34*, but also to detect the homogeneity of the varieties.