

СКРИНИНГ ОБРАЗЦОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ НА НАЛИЧИЕ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ *LR17A*

А. Ю. Мышастая, техник-исследователь лаборатории маркерной селекции, ORCID ID: 0000-0002-1432-7616;
Н. Н. Вожжова, кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, зав. лабораторией маркерной селекции, ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

Д. М. Марченко, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, зав. отделом селекции и семеноводства озимой пшеницы, ORCID ID: 0000-0002-5251-3903;

Е. В. Ионова, доктор сельскохозяйственных наук, зав. центра фундаментальных научных исследований, ORCID ID: 0000-0002-2840-6219

ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской»,

347740, Ростовская обл., г. Зерноград, Научный городок, 3; e-mail: vniizk30@ru

Рассмотрены вопросы идентификации гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a* в селекционных и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской». Установлено, что из 717 изученных генотипов функциональный аллель гена зафиксирован у 49 линий. Нефункциональный аллель выявлен у 30 линий. Определено 206 образцов с нетипичными аллелями гена *Lr17a*. В работе использовали: СТАВ-метод (выделение ДНК); метод ПЦР (определение генов устойчивости к основным болезням озимой пшеницы); метод электрофореза на агарозных гелях. Целью исследования являлся скрининг коллекционного и селекционного материала озимой мягкой пшеницы на наличие гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a*. В результате проведенных исследований выявленные образцы с функциональным аллелем гена *Lr17a* предлагается использовать в селекционных программах для пирамидирования с другими генами.

Ключевые слова: скрининг, озимая мягкая пшеница, ген, устойчивость, бурая ржавчина, *Lr17a*.



SCREENING OF WINTER SOFT WHEAT SAMPLES ON PRESENCE OF BROWN RUST RESISTANCE GENE *LR17A*

A. Yu. Myshastaya, technician-researcher of the laboratory of marker breeding, ORCID ID: 0000-0002-1432-7616;
N. N. Vozhzhova, Candidate of Agricultural Sciences, senior researcher, head of the laboratory of marker breeding, ORCID ID: 0000-0002-2046-4000;

D. M. Marchenko, Candidate of Agricultural Sciences, leading researcher, head of the department for winter wheat breeding and seed production, ORCID ID: 0000-0002-5251-3903;

E. V. Ionova, Doctor of Agricultural Sciences, head of the center of fundamental researches, ORCID ID: 0000-0002-2840-6219

Agricultural Research Center "Donskoy",

347740, Rostov region, Zernograd, Nauchny Gorodok, 3; e-mail: vniizk30@mail.ru

The current paper considers the identification of the *Lr17a* brown rust resistance gene in the selection and collection samples of winter soft wheat developed by the FSBSI "Agricultural Research Center "Donskoy". It has been determined that 49 lines out of the 717 studied genotypes possess a functional gene allele. A non-functional allele has been identified in 30 lines. 206 samples were identified with atypical alleles of the *Lr17a* gene. During the study there were used a CTAB method (a DNA isolation), PCR method (identification of resistance genes to the main winter wheat diseases) and an electrophoresis method on agarose gel. The purpose of the study was to screen collection and breeding material of winter soft wheat on presence of brown rust resistance gene *Lr17a*. As a result of the study, the identified samples with a functional allele of the *Lr17a* gene have been proposed to be used in breeding programs for pyramidation with other genes.

Keywords: screening, winter soft wheat, gene, resistance, brown rust, *Lr17a*.

Введение. Бурая ржавчина является одним из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний озимой мягкой пшеницы. Она может наносить серьезный экономический ущерб и заметно ухудшать качество зерна (Сюков и др., 2018).

Для предотвращения эпифитотий необходимо при создании сортов пшеницы иметь разнообразный селекционный материал, несущий как отдельные гены устойчивости, так и их пирамиды. Одним из наиболее эффективных методов получения такого материала является скрещивание перспективных, приспособленных к местным условиям среды образцов с растениями-донорами генов устойчивости к бурой ржавчине.

Дальнейшее использование полученных генетически устойчивых сортов позволит минимизировать проявление бурой ржавчины в посевах озимой мягкой пшеницы и снизить пестицидную нагрузку.

Согласно данным R. A. McIntosh et al. (2017), в настоящее время известно около 100 Lr-генов. Большинство из этих генов недолго являются эффективными

из-за появления вирулентных рас *Puccinia triticina*, преодолевающих их устойчивость.

В различных источниках научной литературы имеется информация о генах устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины, выявленных как при помощи иммунологических лабораторных методов, так и с помощью молекулярных маркеров (Сапахова и др., 2014; Гульязева и Садовая, 2014; Вожжова, 2018).

По данным исследований, проведенных в Западной Сибири, линии яровой мягкой пшеницы, содержащие ген *Lr17a*, остаются практически свободными от инфекции (Skolotneva et al., 2018).

Повышенная устойчивость к бурой ржавчине при высоких температурах может обеспечиваться этим геном (Dyck et al., 1968). Считается, что многие из известных Lr-генов проявляют свою эффективность только в комплексе с другими генами (Кохметова и др., 2014). Для эффективного пирамидирования генов устойчивости к бурой ржавчине необходимы знания об их источниках.

Целью исследования являлся скрининг коллекционного и селекционного материала озимой мягкой пшеницы ФГБНУ «АНЦ «Донской» на наличие гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a*.

Материалы и методы исследований. Объектом исследования послужили 717 коллекционных и селекционных образцов озимой мягкой пшеницы ФГБНУ «АНЦ «Донской». В качестве контроля использовали почти изогенную линию сорта Thatcher, несущую ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a*. Выделение ДНК пшеницы проводили СТАВ-буфером методом М. G. Murray (1980) с некоторыми модификациями.

Для идентификации гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a* использовали молекулярный SSR-маркер Xgwm 614 (праймер F – 5' – gat cac atg cat gcg tca tg – 3'; праймер R – 5' – ttt tac cgt tcc gcc ctt – 3').

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь объемом 25 мкл следующего состава: геномная ДНК – 2 мкл; 10xPCR буфер – 2,5 мкл; MgCl₂ (25mM) – 1 мкл; смесь dNTPs (10mM) – 2,5 мкл; по 1,25 мкл каждого праймера (1 μmol); Taq-полимераза (5 U) – 0,25 мкл; деионизированная вода – 14,25 мкл.

Аmplification проводили прибором Bio-Rad T-100 по следующим условиям: начальная денатурация – 94 °C – 3 мин, 45 циклов (94 °C – 1 мин, 60 °C – 1 мин, 72 °C – 2 мин); элонгация – 72 °C – 10 мин (BremenKamp-Barrett et al., 2008).

Визуализацию продуктов амплификации выполняли на 2% агарозном геле методом горизонтального электрофореза в TBE-буфере (Анисимова и др., 2010).

Агарозный гель после прохождения электрофореза окрашивали бромистым этидием, затем продукты ПЦР визуализировали с помощью прибора Bio-Rad GelDoc XR+ с программным обеспечением BioRad ImageLab 5.1.

Размер ампликонов на агарозном геле определяли маркером молекулярного веса Thermo Scientific GeneRuler 50+ bp (50-1000 bp).

Результаты и их обсуждение. По литературным данным, о наличии функционального аллеля гена *Lr17a* свидетельствует молекулярный размер ампликона 144 пары нуклеотидов, а о наличии нефункционального аллеля – размер ампликона 173/175 пар нуклеотидов (BremenKamp-Barrett, 2008).

Анализ 717 коллекционных и селекционных образцов озимой мягкой пшеницы выявил наличие функционального (6,83%) и нефункционального (4,18%) аллелей гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a*.

На представленном фрагменте одного из рабочих гелей (рис. 1) идентифицировано наличие гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr17a* у образцов 3, 5, 7, 9 (коллекционные образцы, созданные в ФГБНУ «АНЦ «Донской»), 11, 12, 13, 14, 15 и 16 (коллекционные образцы из других учреждений).

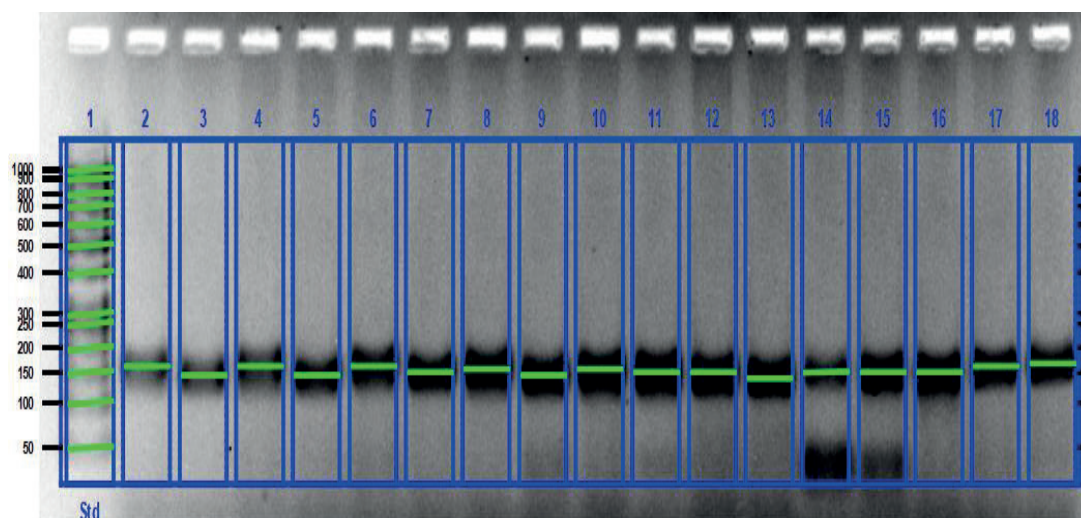


Рис. 1. Электрофореграмма скрининга коллекционных образцов озимой мягкой пшеницы по гену *Lr17a* на агарозном геле. Продукты амплификации с маркером Xgwm 614: 1 – маркер молекулярного веса Thermo Scientific GeneRuler 50+ bp (50-1000 bp); 2 – 2008/02; 3 – 1048/04; 4 – 1744/04; 5 – 401/05; 6 – 631/05; 7 – 1026/06; 8 – 1621/03; 9 – 1217/12; 10 – 567/13; 11 – Ljiana; 12 – Актер; 13 – PYN/BAV; 14 – Muck; 15 – Flame; 16 – Светлая; 17 – Панноникус; 18 – Сталинградка 60

Fig. 1. Electrophoregram of screening of winter soft wheat collection samples on the gene *Lr17a* on agarose gel. Amplification products with marker Xgwm 614: 1 – molecular weight marker “Thermo Scientific GeneRuler 50+ bp (50-1000 bp)”; 2 – “2008/02”; 3 – “1048/04”; 4 – “1744/04”; 5 – “401/05”; 6 – “631/05”; 7 – “1026/06”; 8 – “1621/03”; 9 – “1217/12”; 10 – “567/13”; 11 – “Ljiana”; 12 – “Aker”; 13 – “PYN/BAV”; 14 – “Muck”; 15 – “Flame”; 16 – “Svetlaja”; 17 – “Pannonikus”; 18 – “Stalingradka 60”

Следует отметить, что у части образцов были зафиксированы нетипичные аллели: образцы 8 и 10 имеют ампликон размером 155 пар нуклеотидов, образцы 1, 4, 6 и 17 – размером 161 п. н., а образец 18 – размером 167 п. н. Их необходимо дополнительно изучить для выявления значимости и возможной области применения.

Всего в результате скрининга изученных генотипов озимой мягкой пшеницы было идентифицировано: 206 образцов с нетипичными аллелями *Lr17a* (28,73%), 30 образцов с нефункциональным аллелем (4,18%) и 49 (6,83%) образцов озимой мягкой

пшеницы, несущих аллель гена *Lr17a* размером 144 п. н., таких как 1048/04, 401/05, 1026/06, 1217/12, Ljiana и др.

Выводы

1. Идентифицировано 49 образцов озимой мягкой пшеницы с геном *Lr17a*, таких как 1048/04, 401/05, 1026/06, 1217/12, Ljiana и др.

2. Выявленные образцы озимой мягкой пшеницы с функциональным аллелем гена *Lr17a* рекомендуются использовать в качестве источников для пирамидирования с другими генами в селекционных программах на устойчивость к болезням.

Библиографические ссылки

1. Вожжова Н. Н. Идентификация гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в сортах и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы Аграрного научного центра «Донской» // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018. Т. 22, № 3. С. 329–332. DOI: 10.18699/VJ18.368.
2. Гултыяева Е. И., Садовая А. С. Селекция мягкой пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в России // Защита и карантин растений. 2014. № 10. С. 24–26.
3. Кохметова А. М., Сапахова З. Б., Маденова А. К., Есенбекова Г. Т. Идентификация носителей генов устойчивости к желтой *Yr5*, *Yr10*, *Yr15* и бурой ржавчине *Lr26*, *Lr34* на основе молекулярного скрининга образцов пшеницы // Биотехнология. Теория и Практика. 2014. № 1. С. 71–78. DOI: 11134/btp.1.2014.10.
4. Сапахова З. Б., Кохметова А. М., Моргунов А. И., Елешев Р. Е. Идентификация носителей генов устойчивости к бурой ржавчине на основе молекулярного скрининга образцов пшеницы // Издәнистер, нәтижелер. Исследования, результаты. 2014. № 3. С. 184–194.
5. Сюков В. В., Менибаев А. И., Зуева А. А. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к листовой бурой ржавчине в Самарском НИИСХ // Известия Самарского научного центра РАН. 2018. № 2-3. С. 533–535.
6. BremenKamp-Barrett B., Faris J. D., Fellers J. P. Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr17a* in wheat // Crop Sci. 2008. Vol. 48. Pp. 1124–1128. DOI: 10.2135/cropsci2007.07.0379.
7. Dyck P. L., Samborski D. J. Host-parasite interactions involving two genes for leaf rust resistance in wheat // Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symp. Canberra, 1968. Pp. 245–250.
8. McIntosh A., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement [Electronic resource]. Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
9. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. Pp. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
10. Skolotneva E. S., Leonova I. N., Bukatich E. Y., Boiko N. I., Piskarev V. V., Salina E. A. Effectiveness of leaf rust resistance genes against *Puccinia triticina* populations in Western Siberia during 2008–2017 // J Plant Dis Prot. 2018. Vol. 125. Pp. 549–555. DOI: 10.1007/s41348-018-0191-3.

References

1. Vozhzhova N. N. Identifikatsiya gena ustojchivosti k buroj rzhavchine *Lr34* v sortah i kollekcionnyh obrazcah ozimoy myagkoj pshenicy Agrarnogo nauchnogo centra "Donskoj" [Identification of the *Lr34* brown rust resistance gene in winter soft wheat varieties and collection samples developed by the "Agricultural Research Center "Donskoy"] // Vavilovskij zhurnal genetiki i selekcii. 2018. T. 22, № 3. S. 329–332. DOI: 10.18699/VJ18.368.
2. Gul'tyaeva E. I., Sadovaya A. S. Selekcija myagkoj pshenicy na ustojchivost' k buroj rzhavchine v Rossii [Soft wheat breeding for brown rust resistance in Russia] // Zashchita i karantin rastenij. 2014. № 10. S. 24–26.
3. Kohmetova A. M., Sapahova Z. B., Madenova A. K., Esenbekova G. T. Identifikatsiya nositelej genov ustojchivosti k zheltoj *Yr5*, *Yr10*, *Yr15* i buroj rzhavchine *Lr26*, *Lr34* na osnove molekulyarnogo skringinga obrazcov pshenicy [Identification of resistance genes carriers for yellow *Yr5*, *Yr10*, *Yr15* and brown rust *Lr26*, *Lr34* based on molecular screening of wheat samples] // Biotekhnologiya. Teoriya i Praktika. 2014. № 1. S. 71–78. DOI: 11134/btp.1.2014.10.
4. Sapahova Z. B., Kohmetova A. M., Morgunov A. I., Eleshev R. E. Identifikatsiya nositelej genov ustojchivosti k buroj rzhavchine na osnove molekulyarnogo skringinga obrazcov pshenicy [Identification of brown rust resistance genes carriers based on molecular screening of wheat samples] // Izdenister, nәtizheler. Issledovaniya, rezul'taty. 2014. № 3. S. 184–194.
5. Syukov V. V., Menibaev A. I., Zueva A. A. Selekcija yarvoj myagkoj pshenicy na ustojchivost' k listovoj buroj rzhavchine v Samarskom NIISKH [Spring soft wheat breeding on leaf brown rust resistance in the Samara Research Institute of Agriculture] // Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra RAN. 2018. № 2-3. S. 533–535.
6. BremenKamp-Barrett B., Faris J. D., Fellers J. P. (2008) Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr17a* in wheat // Crop Sci. Vol. 48. Pp. 1124–1128. DOI: 10.2135/cropsci2007.07.0379.
7. Dyck P. L., Samborski D. J. Host-parasite interactions involving two genes for leaf rust resistance in wheat // Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symp. Canberra. 1968. Pp. 245–250.
8. McIntosh A., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat: 2017 supplement [Electronic resource] // Available at: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>.
9. Murray M. G., Thompson W. F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // Nucleic Acids Res. 1980. Vol. 8. Pp. 4321–4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321.
10. Skolotneva E. S., Leonova I. N., Bukatich E. Y., Boiko N. I., Piskarev V. V., Salina E. A. Effectiveness of leaf rust resistance genes against *Puccinia triticina* populations in Western Siberia during 2008–2017 // J Plant Dis Prot. 2018. Vol. 125. Pp. 549–555. DOI: 10.1007/s41348-018-0191-3.

Критерии авторства. Авторы статьи подтверждают, что имеют на статью равные права и несут равную ответственность за плагиат.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.