

¹З.Б. Сапахова, ^{1,2}А.М. Кохметова, ³А.И. Моргун, ¹Р.Е. Елешев

¹Казахский Национальный Аграрный университет, Алматы

²Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы

³СИММУТ, Р.К. 39 Етек, 06511, Анкара, Турция

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО СКРИНИНГА ОБРАЗЦОВ ПШЕНИЦЫ

Аннотация

Бурая ржавчина является опасным заболеванием пшеницы. В настоящем исследовании внимание было обращено на часть эффективных генов устойчивости к бурой ржавчине – *Lr9*, *Lr10*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr68* а также комплекс генов *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Yr17/Sr31*, *Lr35/Sr39* и *Lr34/Yr18*. В результате молекулярного скрининга установлено, что линия L286 является носителем пяти эффективных *Lr*-генов (*Lr22a*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr68*), включающие APR-гены возрастной устойчивости (*Lr22a*, *Lr34* и *Lr68*), а у линии L372 идентифицировано 4 гена (*Lr24*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*) и у сорта Жетысу идентифицирован 1 *Lr*-ген (*Lr22a*). Полученные результаты используются в Казахстане для создания устойчивых к бурой ржавчине сортов пшеницы с применением MAS-селекции.

Ключевые слова: пшеница, бурая ржавчина, гены устойчивости, *Lr*-гены, молекулярные маркеры.

Введение Основным критерием высокого уровня продовольственной безопасности является устойчивое воспроизводство зерна, масла и других сельскохозяйственных продуктов. Регион Центральной Азии является одним из важнейших мировых производителей пшеницы, которая выращивается на площади 15 млн. га. На этой территории в последние годы получила распространение бурая ржавчина пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, которая наносит серьезный экономический ущерб, снижая и качество зерна. В связи с этим, одной из главных задач агропромышленного комплекса Казахстана является повышение урожайности и качества стратегически важных сельскохозяйственных культур. Использование генетически устойчивых сортов является наиболее эффективным, экономически и экологически надежным методом контроля болезней, позволяющим снизить или элиминировать применение фунгицидов и свести к минимуму потери урожая от ржавчины [1].

В научной литературе имеется обширная информация о генах устойчивости пшеницы к возбудителю бурой ржавчины. К настоящему времени в каталоге генов пшеницы имеется информация о 68 *Lr*-генах [2]. Однако одной из основных проблем недолгой эффективности большинства *Lr*-генов является появление вирулентных рас патогена, которые способны преодолеть устойчивость. Вследствие этого многие из известных *Lr*-генов устойчивости становятся неэффективными [3].

В каталоге 36 *Lr*-генов интрогрессированы в вид *Triticum aestivum* от других видов злаков. Ген *Lr9* перенесен Sears в мягкую пшеницу от *Aegilops umbellulata* в 1961 г. [4]. Ген *Lr9* локализован в хромосоме 6В и имеется у сортов Transfer, Abe, Arthur 71, Riley 67, Oasis. В Казахстане в популяции возбудителя бурой ржавчины вирулентность к этому гену отсутствует или встречается очень редко. Агрессивных к нему рас и биотипов нет, ген высокоэффективен [3]. Ген *Lr10* изолирован у гексаплоидной пшеницы и расположен на хромосоме 1AS. Он кодирует белок типа CC-NBS-LRR с N-терминал доменом. При

экспрессии в трансгенных растениях пшеницы, *Lr10* обеспечивает повышенную устойчивость к бурой ржавчине. *Lr10* имеет сходство с RPM1 в *Arabidopsis thaliana* и и устойчив к генам аналогам в рисе и ячмене, но не тесно связаны с другими *Lr*-генами пшеницы [5]. Источником генов *Lr19*, *Lr24*, *Lr29* явился пырей *Agropyron elongatum* (*Thinopyrom elongatum*). Очень редко появляющиеся вирулентные патотипы пока агрессивностью не обладают и угрозы для носителей этого гена не представляют [6,7,8]. Ген устойчивости *Lr22a* интрогрессирован от *Aegilops tauschii* на 2DS хромосому мягкой пшеницы. Ген *Lr22a* обеспечивает возрастную устойчивость (APR) к бурой ржавчине [9]. Источником гена *Lr26* является рожь *Secale cereale* [10]. Ген *Lr26* интрогрессирован в хромосому 1B. Ген *Lr32* трансформирован от *Aegilops tauschii* на 3DS хромосому гексаплоидной пшеницы, что обеспечивает устойчивость к бурой ржавчине на уровне проростков [11]. Небольшая группа генов устойчивости к бурой ржавчине, такие как *Lr34* и *Lr46*, известна как «slow rusting genes» [12]. Они обеспечивают длительную и неспецифическую устойчивость взрослых растений, но их эффект более ограничен, чем у расаспецифических генов. Наблюдался плеiotропный эффект между *Lr46* и *Yr29*, также «slow rusting gene» к желтой ржавчине. Ген *Lr34* расположен на коротком плече хромосомы 7D, недалеко от локуса Xgwm295. *Lr34* тесно связан с локусом некроза листа (LTN), также возможно, что фенотип LTN может иметь плеiotропный эффект самого *Lr34* [12]. Ген *Lr35* происходит от *Aegilops speltoides*. Ген *Lr35* интрогрессирован 2В хромосому пшеницы. *Lr35* был переведен в гексаплоидную пшеницу сорта Marquis от *Aegilops speltoides*. Ген расположен на сегменте 2S хромосом *A. speltoides* и транслоцировался к 2В хромосомы пшеницы. Транслоцируемый сегмент является носителем гена против стеблевой ржавчины *Sr39* и adult-plant гиперчувствительный геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr35* [13]. Источником гена *Lr37* является *Aegilops ventricosa*. Этот ген идентифицирован Барианой и Макинтошем в 1991 г. и локализован в 2AS хромосоме. Носители этого гена поражаются в ювенильной фазе растений, но проявляют возрастную устойчивость. Длинный хромосомный фрагмент (25-38 сМ), содержащий три гена устойчивости к ржавчине был транслоцирован между короткими плечами 2NS хромосомы от *Triticum ventricosum* в 2AS хромосомы мягкой пшеницы. Этот сегмент включает три гена устойчивости к болезням: *Lr37*, *Yr17* и *Sr38* устойчивости к бурой, желтой и стеблевой ржавчине, соответственно. Фрагмент 2NS впервые интрогрессирован у сорта пшеницы VPM1, а затем он был переведен в другие коммерческие сорта, как Madsen и Thatcher [14]. Группа ученых из СИММИТ в сорте пшеницы Parula идентифицировали APR-ген *Lr68* у Parula(FKN/3/2*Frontana//Кения350AD. 9C.2/Gabo55 /4/Bluebird/Chanate), и он локализован на длинном плече хромосомы 7B. Ранее был назван как *LrP*. Выявлены молекулярные маркеры, фланкирующие ген *Lr68*, которые могут быть использованы в маркерной селекции. Сорт Parula создан учеными СИММИТ в 1981 году, который объединяет также APR-генов устойчивости как *Lr34* и *Lr46*. Возможно, происхождение *Lr68* гена является бразильский сорт Frontana [15].

Однако на большое количество идентифицированных *Lr*-генов одной из основных проблем их недолгой эффективности является появление вирулентных рас патогена, которые способны преодолеть устойчивость. Вследствие этого многие из известных генов устойчивости становятся неэффективными. Особая опасность бурой ржавчины обусловлена способностью патогена к мутации и быстрой смене генераций, что ускоряет расообразовательный процесс [16]. Тем не менее, четыре гена устойчивости, *Lr34/Yr18*, *Lr46/Yr29*, *Sr2/Yr30*, *Lr68* и *Lr67/Yr46*, обеспечивают частичную, но длительную устойчивость [17]. Эти гены способствуют замедленному типу развития ржавчины и являются эффективными ко всем расам патогена. Дополнительное действие этого типа гена приводит к повышению устойчивости до уровня иммунности. Поэтому необходимо

продолжать поиск источников новых доноров устойчивости к бурой ржавчине пшеницы.

Поэтому необходим поиск источников новых генов устойчивости к ржавчине пшеницы. Для того чтобы с большей надежностью контролировать болезнеустойчивость, очень важно иметь в распоряжении молекулярные маркеры, сопряженные с этим признаком. В настоящем исследовании внимание было обращено на часть эффективных генов устойчивости к бурой ржавчине – *Lr9*, *Lr10*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr68* а также комплекс генов *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Yr17/Sr31*, *Lr35/Sr39* и *Lr34/Yr18*, которые идентифицировали в процессе молекулярного скрининга гермоплазмы пшеницы.

Материалы и методы

Материалами исследований являются сорта и перспективные линии мягкой озимой пшеницы; Жетысу, L286 Алмалы/Обрий, L372 Алматинская полукарликовая /Прогресс. Анализ устойчивости образцов пшеницы к видам ржавчины проводили на полевом стационаре Казахского НИИ земледелия и растениеводства. Оценку развития болезни желтой и бурой ржавчиной проводили в фазу молочно-восковой спелости по принятой в СИММУТ методике, определяя инфекционный тип (в баллах) и степень поражения (%) [18]. Коллекции образцов пшеницы высевали во всех фитопатологических опытах на делянках площадью 1 м² в трехкратной повторности. Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из проростков пшеницы на основе СТАВ метода выделения геномной ДНК, с использованием 5–дневных проростков по методике C.R.Riede, J.A.Anderson, [19]. Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в соответствии с протоколом X.M.Chen et al. [20]. В качестве положительного контроля при идентификации генов использованы образцы пшеницы, в которых гены устойчивости идентифицированы, а в качестве отрицательного контроля – ddH₂O или образцы, в которых гены устойчивости не выявлены. Амплификация проведена в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия), программы амплификации выбраны в зависимости от идентифицируемого *Lr*-гена устойчивости (Таблица 1–2). Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 10 мкл и содержал 1,0 мкл 10× буфер, 1,0 мкл 2,5 mM dNTP, 0,2 мкл 10 микромоль каждого праймера, 0,2 мкл 5 Unit Taq-полимеразы, 6,4 мкл MQ-H₂O, 1 мкл 20 нг/мкл ДНК. Для выявления носителей генов устойчивости *Lr9*, *Lr10*, *Lr19/Sr25*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr34/Yr18*, *Lr35/Sr39*, *Lr37/Yr17/Sr38*, *Lr68* использованы SSR, STS, SCAR, CAPS маркеры J13, F1.2245Lr10-6/r2, GbF/R, WMS296, J91/2, iag95, Lr29F/R18, Xbarc135, csLV34, Sr39#50, VENTRIUP/LN2, csGS, соответственно. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 %-м агарозном или 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) в TBE-буфере (45 mM трис-борат, 1mM EDTA, pH-8) [20].

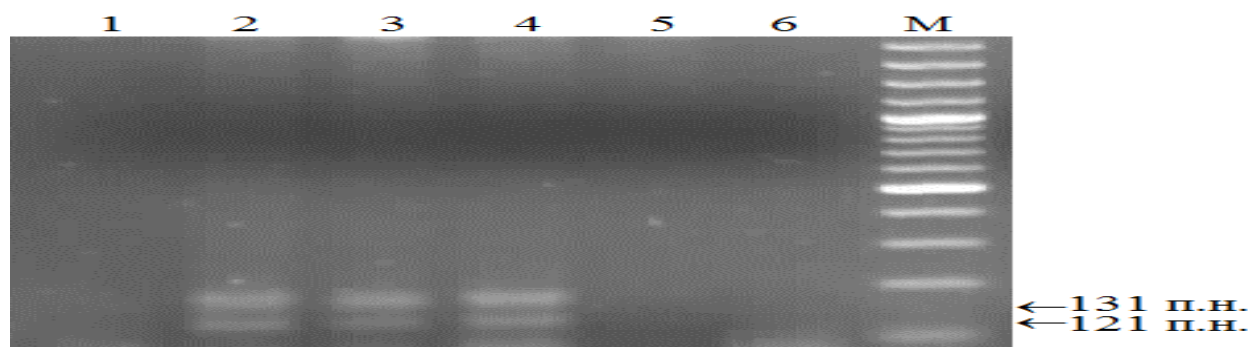
Таблица 1 – Источники гена, локализация в хромосоме и последовательность праймеров к *Lr*-генам устойчивости

<i>Lr</i> -гены	Источники гена	Название маркера	Тип маркера	Локализация	Последовательность	Литература
<i>Lr9</i>	<i>Aegilops umbellulata</i>	J13	STS	6B	5'- TCC TTT TAT TCC GCA CGC CGG -3' 5'- CCA CAC TAC CCC AAA GAG ACG -3'	Schachermayr G. et al. 1994 [4]
<i>Lr10</i>	<i>Triticum aestivum</i>	F1.2245Lr10-6/r2	STS	1AS	5'- GTG TAA TGC ATG CAG GTT CC -3' 5'- AGG TGT GAG TGA GTT ATG TT -3'	Feuillet C., 2003 [5]
<i>Lr19</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	Gb	STS	7EL	5'- 5'- CAT CCT TGG GGA CCT C -3' 5'- CCA GCT CGC ATA CAT CCA -3'	Prins R. et al. 2001 [6]
<i>Lr22a</i>	<i>Aegilops tauschii</i>	WMS296	SSR	2DS	5'- AAT TCA ACC TAC CAA TCT CTG -3' 5'- GCC TAA TAA ACT GAA AAC GAG -3'	Hiebert C.W. et al., 2007 [9]
<i>Lr24</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	J9	STS	3DL	5'- TCT AGT CTG TAC ATG GGG GC -3' 5'- TGG CAC ATG AAC TCC ATA CG -3'	Schachermayr G. et al. 1995 [7]
<i>Lr26</i>	<i>Secale cereale</i>	iag95	SCAR	1B	5'- CTC TGT GGA TAG TTA CTT GAT CGA -3' 5'- CCT AGA ACA TGC ATG GCT GTT ACA -3'	Mago R. et al. 2002 [10]
<i>Lr29</i>	<i>Agropyron elongatum</i>	<i>Lr29F/R18</i>	SCAR	7DS	5'- GTG ACC TCA GGC AAT GCA -3' 5'- GTG ACC TCA GAA CCG ATG -3'	Procunier J. et al, 1995 [8]
<i>Lr32</i>	<i>Aegilops tauschii</i>	Xbarc135	SSR	3DS	5'- ATC GCC ATC TCC TCT ACC A -3' 5'- GCG AAC CCA TGT GCT AAG T -3'	Thomas J. et al., 2010 [11]
<i>Lr34</i>	<i>Triticum aestivum</i>	csLV34	STS	7DS	5'- GTT GGT TAA GAC TGG TGA TGG -3' 5'- TGC TTG CTA TTG CTG AAT AGT -3'	Lagudah E. et al, 2006 [12]
<i>Lr35</i>	<i>Aegilops speltoides</i>	Sr39#50	STS	2B	5'- TAG CAA GGA CCA AGC AAT CTT -3' 5'- CCA ATG AGG AGA TCA AAA CAA CC -3'	Mago R. et al., 2009 [13]
<i>Lr37</i>	<i>Triticum ventricosum</i>	VENTRIUP/LN2	CAPS	2AS	5'- AGG GGC TAC TGA CCA AGG CT -3' 5'- TGC AGC TAC AGC AGT ATG TAC ACA AAA -3'	Helguera M. et al., 2003 [14]
<i>Lr68</i>	<i>Triticum aestivum</i>	csGS	STS	7BL	5'- AAG ATT GTT CAC AGA TCC ATG TCA -3' 5'- GAG TAT TCC GGC TCA AAA AGG -3'	Herrera-Foessel S.A. et al., 2012 [15]

Таблица 2 – Протоколы для проведения полимеразной цепной реакции с использованием праймеров к соответствующим *Lr*-генам устойчивости

Праймер	Начальная денатурация (°C, мин)	Количество циклов	Денатурация (°C, сек)	Отжиг (°C, сек)	Экстенция (°C, сек)	Последняя экстенция (°C, мин)
J13	94 (5)	35	94 (60)	58 (60)	72 (120)	72 (5)
F1.2245Lr10-6/r2	94 (3)	35	94 (45)	60 (45)	72 (30)	72 (3)
Gb	94 (4)	40	92 (30)	60 (30)	72 (60)	72 (5)
WMS296	94 (2)	30	94 (60)	55 (60)	73(50)	73 (5)
J9	94 (4)	40	92 (60)	60 (60)	72 (120)	72 (5)
SCM9	95 (3)	30	94 (45)	60 (60)	72 (90)	72 (5)
<i>Lr29F/R18</i>	94 (3)	35	94 (60)	60 (60)	72 (60)	72 (10)
Xbarc135	94 (2)	30	95 (60)	51 (50)	73 (60)	73 (5)
csLV34	94 (10)	30	94 (30)	60 (30)	72 (30)	72 (7)
<i>Sr39#50</i>	95 (10)	7	94 (30)	65 (30)	72 (40)	
		35	94 (30)	58 (30)	72 (40)	20 (60)
VENTRIUP/LN2	94 (4)	35	94 (45)	65 (30)	72 (60)	72 (10)
csGS	93 (1)	30	93 (30)	60 (60)	72 (60)	72 (5)

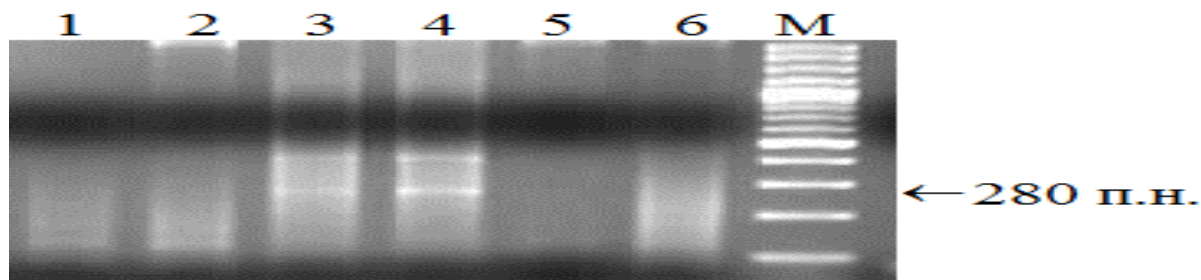
Результаты исследований Известно, что ген возрастной устойчивости APR ген *Lr22a* локализован на хромосоме 2DS, источником гена является *Aegilops tauschii*, тестерней линией является ТС*6/RL5404 (RL6044). Для идентификации носителей гена *Lr22a* проводили ПЦР, с использованием SSR маркера WMS296 [9]. В качестве положительного контроля при идентификации носителей генов использована изогенная линия сорта Тэтчер (RL6044), в которой идентифицирован ген устойчивости *Lr22a*, а в качестве отрицательного контроля – ddH₂O. В результате ПЦР-анализа фрагмент ДНК, характерный для носителей гена *Lr22a* размером 121 и 131 п.н., формировался у сорта Жетысу и линии L286 (Рисунок 1).



1 – отрицательный контроль (ddH₂O), 2 – *Lr22a* (положительный контроль), 3 – Жетысу, 4 – L286, 5-6 – L372, M – Маркер молекулярного веса (Gene-Ruler 100 bp DNA Ladder). Праймер WMS296, 2% агарозный гель.

Рисунок 1 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу WMS296, сцепленному с геном *Lr22a*

Ген *Lr24* локализован на хромосоме 3 DL, источником гена является *Agropyron elongatum*, тестерной линией является сорт Thatcher TC*6/Agent (RL6064). Для идентификации носителей гена *Lr24* проводили ПЦР амплификацию с использованием праймеров STS J91/2 [7]. В качестве положительного контроля при идентификации носителей Lr-генов использованы изогенные линии сорта Thatcher и российский сорт Лавина, в которых идентифицирован ген устойчивости *Lr24*. В качестве отрицательного контроля – ddH₂O. В результате ПЦР-анализа показано, что фрагмент ДНК, характерный для носителей гена *Lr24* размером 280 п.н. формировался у линии L372 (Рисунок 2).

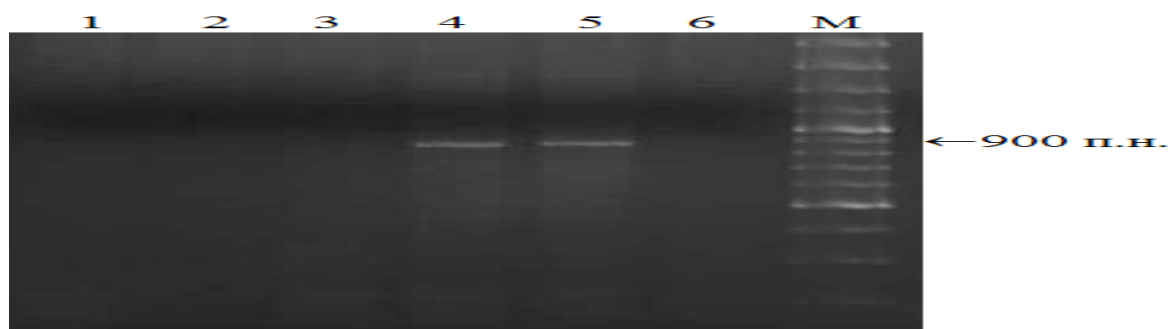


Продукты характерного фрагмента амплификации отсутствовали у сорта Жетысу и линии L286.

1 – Жетысу, 2 – L286, 3 – L372, 4 – Лавина, 5 – отрицательный контроль (ddH₂O), 6 – Chinese 166, M – Маркер молекулярного веса (Gene-Ruler, 100 bp DNA Ladder). Праймер STS J91/2, 2% агарозный гель.

Рисунок 2 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу J9, сцепленному с геном *Lr24*

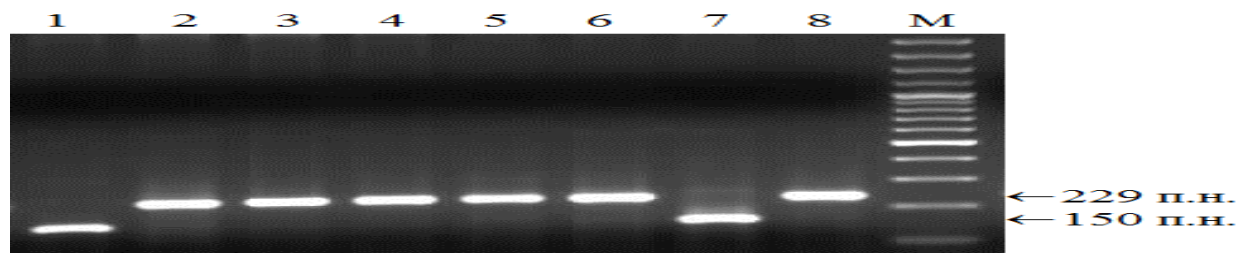
Для поиска гена *Lr29* использованы праймеры SCAR маркера *Lr29F/R18*. Ген *Lr29* локализован на хромосоме 7 DS, источником гена является *Agropyron elongatum*, тестерной линией является TC*6/CS7AG#11 RL6080 [8]. На рисунке 3 представлены результаты электрофореза продуктов ПЦР, отражающие наличие или отсутствие в исследуемых образцах гена *Lr29*. ПЦР-анализ показал что фрагмент ДНК, характерный для носителей гена *Lr29* размером 900 п.н. формировался у линий L286 и L372. Продукты характерного фрагмента амплификации отсутствовали у сорта Жетысу.



1 – отрицательный контроль (ddH₂O), 2 – TC*6/CS7AG#11 (RL6080), 3 – Анза, 4 – L372, 5– L286, 6–Жетысу, M–Маркер молекулярного веса (Gene-Ruler, 100 bp DNA Ladder). Праймер для *Lr29F/R18*, 2% агарозный гель.

Рисунок 3 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу *Lr29F/R18*, сцепленному с геном *Lr29*

Ген *Lr34* локализован на хромосоме 7DS, тестером является линия TC*6/PI58548 RL6058. Ген *Lr34* сцеплен с APR геном устойчивости к желтой ржавчине *Yr18* [175]. Для идентификации носителей гена *Lr34* проводили с использованием STS маркера csLV34

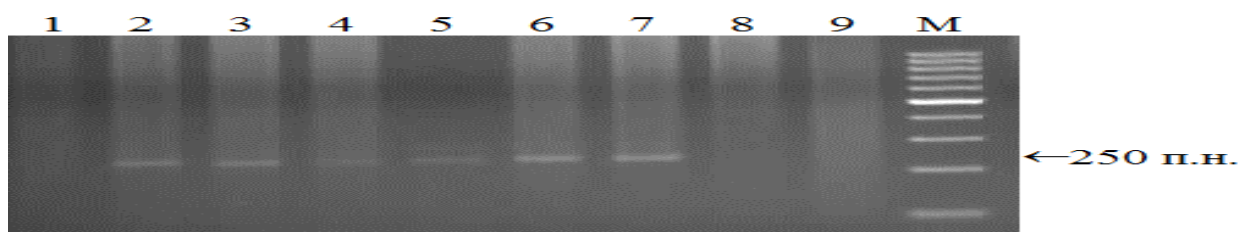


[12]. В качестве положительного контроля при идентификации носителей генов использована изогенная линия сорта Thatcher (RL6058), в котором идентифицирован ген устойчивости *Lr34* сцепленный с геном *Yr18*. На рисунке 4 показаны результаты ПЦР-анализа потенциальных носителей генов *Lr34/Yr18* с использованием маркера csLV34. На электрофореграмме показано, что линия L286 и изогенная линия сорта Thatcher RL6058 формировали продукта амплификации размером 150 п.н., что указывает на наличие у них генов *Lr34/Yr18*.

1 – Изогенная линия *Lr34* TC*6/PI58548 (RL6058), положительный контроль, 2-5 – Avocet S, отрицательный контроль, 6– Жетысу, 7 – L286, 8 – L372, М– Маркер молекулярного веса (Gene–Ruler, 100 bp DNA Ladder). Праймер csLV34, 2% агарозный гель.

Рисунок 4 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу csLV34, сцепленному с геном *Lr34/Yr18*

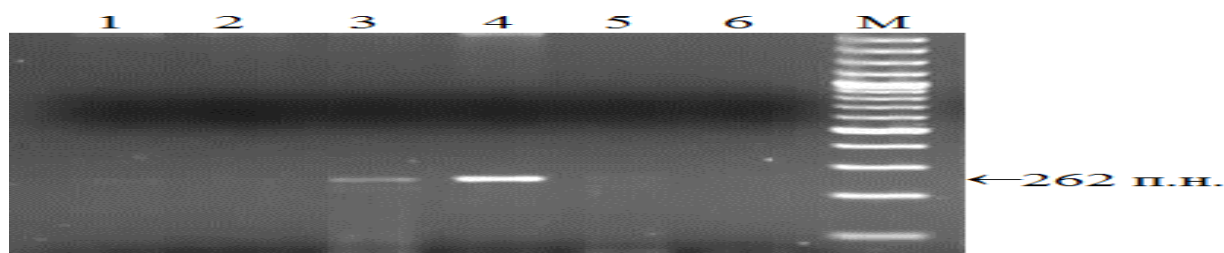
Ген *Lr35* сцеплен с геном устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr39* и локализован на хромосоме 2В, источником гена является *Aegilops speltoides* L., тестерной линией является сорт Thatcher RL5711. Гены устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине *Lr35/Sr39* трансформированы от *Aegilops speltoides* L. [13]. Для идентификации носителей гена *Lr35* проводили ПЦР амплификацию с использованием праймеров STS *Sr39#50*. В качестве положительного контроля при идентификации носителей Lr-генов использованы изогенные линии *Sr39* RL5711 Kerber. В качестве отрицательного контроля – ddH₂O. В результате ПЦР-анализа показано, что фрагмент ДНК, характерный для носителей гена *Lr35* размером 250 п.н. формировался у изогенной линии *Sr39* RL5711 Kerber, L286 и L372 (Рисунок 5). Продукты характерного фрагмента амплификации отсутствовал у сорта Жетысу.



1 – отрицательный контроль (ddH₂O), 2-3 – RL5711 Kerber (положительный контроль), 4-5 – L372, 6-7 – L286, 8-9 – Жетысу, М – Маркер молекулярного веса (Gene–Ruler 100 bp DNA Ladder). Праймер *Sr39#50*, 2% агарозный гель.

Рисунок 5 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу *Sr39#50*, сцепленному с геном *Lr35/Sr39*

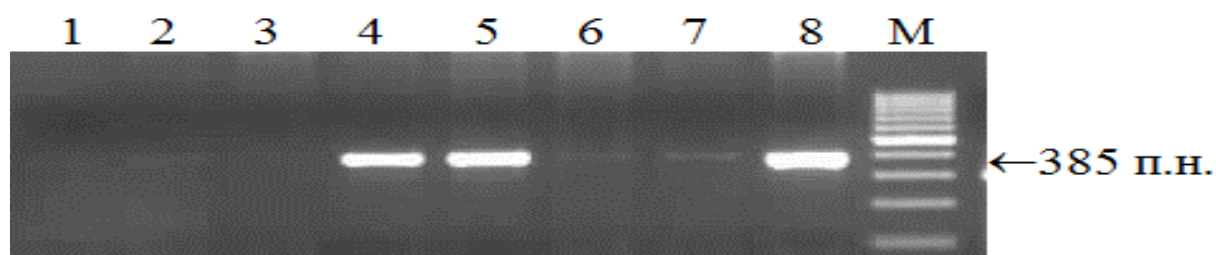
Ген *Lr37* локализован на хромосоме 2AS, источником гена является *Triticum ventricosum*, тестером является линия VPM1. Ген *Lr37* сцеплен с генами устойчивости к желтой и стеблевой ржавсине *Yr17* и *Sr38*. Для идентификации носителей гена *Lr37* проводили ПЦР амплификацию с использованием CAPS праймеров LN2/Ventriup [14]. В качестве положительного контроля использован американский сорт Madsen с идентифицированным геном устойчивости *Lr37*, а в качестве отрицательного контроля – ddH₂O. ПЦР-анализ, представленный на рисунке 13, свидетельствует о формировании амплифицированных продуктов, характерных для носителей генов *Lr37/Yr17/Sr31* размером 262 п.н., у линии L372 и Madsen. У остальных образцов продукты амплификации отсутствовали.



1– Жетысу, 2 – L286, 3 – L372, 4 – Madsen, положительный контроль, 5 – Анза, 6 – отрицательный контроль (ddH₂O), М – Маркер молекулярного веса (Gene–Ruler, 100 bp DNA Ladder). Праймер VENTRIUP/LN2, 2% агарозный гель.

Рисунок 13 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу VENTRIUP/LN2, сцепленному с геном *Lr37*

Для поиска гена *Lr68* использованы праймеры STS маркера csGS [15]. Ген *Lr68* локализован на хромосоме 7BL [15], источником гена *Lr68* является бразильский сорт Frontana, тестерным сортом Parula. На рисунке 14 представлены результаты электрофореза продуктов ПЦР, отражающие наличие или отсутствие в исследуемых образцах гена *Lr68*. ПЦР-анализ показал что фрагмент ДНК, характерный для носителей гена *Lr68* размером 375 п.н. формировался у линий L286 и у сорта Parula. Продукты характерного фрагмента амплификации отсутствовали у сорта Жетысу и L372.



1 – отрицательный контроль (ddH₂O), 2-3 – Жетысу, 4-5 – L286, 6-7 – L372, 8 – Parula (положительный контроль), М – Маркер молекулярного веса (Gene–Ruler 100 bp DNA Ladder). Праймер csGS, 2% агарозный гель.

Рисунок 14 – Продукты амплификации ДНК образцов озимой пшеницы с использованием праймеров к локусу csGS, сцепленному с геном *Lr68*

В таблице 12 представлены обобщенные результаты ПЦР-анализа с использованием молекулярных маркеров, сцепленных с генами устойчивости *Lr22a*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr34/Yr18*, *Lr35/Sr39*, *Lr37/Yr17/Sr38* и *Lr68*.

У линии L286 обнаружены пять эффективных *Lr*-генов, включая гены *Lr22a*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr68* (Таблица 12). Известно, что APR ген *Lr34* очень широко распространен у коммерческих сортов пшеницы. Известно, что комплекс генов *Lr34* и *Lr68* относится к генам с длительным развитием ржавчины, “slow rusting genes”, которые обеспечивают длительную и неспецифическую устойчивость взрослого растения. По данным Колмера [21], ген остается эффективным в контроле бурой ржавчины более 30 лет. По-видимому, этим объясняется стабильная полевая устойчивость к ржавчине этой линии на инфекционном фоне.

Хотя у линии L372 идентифицировано 4 гена (*Lr24*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*), этот образец характеризуется умеренно-восприимчивой реакцией (20MS) на патоген. В сорте Жетысу идентифицировано 1 ген (*Lr22a*), однако он не обеспечивает устойчивость к популяции патогена и в полевых условиях сорт поражается на 30MS бурой ржавчиной.

Заключение В результате молекулярного скрининга установлено, что линия L286 является носителем пяти эффективных *Lr*-генов (*Lr22a*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr68*), включающие APR-гены возрастной устойчивости (*Lr22a*, *Lr34* и *Lr68*), которые обеспечивают устойчивую реакцию на патоген (тип реакции 0–R). У линии L372 идентифицировано 4 гена (*Lr24*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*), которые, являясь проростковыми генами, менее эффективно защищают пшеницу от патогена; линия характеризуется умеренно-восприимчивым типом реакции, 30MS. У сорта Жетысу идентифицирован 1 *Lr*-ген (*Lr22a*), на стадии взрослого растения этот сорт проявляет умеренно-восприимчивый и восприимчивый тип реакции, 40MS-S. Полученные результаты используются в Казахстане для создания устойчивых к бурой ржавчине сортов пшеницы с применением MAS-селекции.

Литература

1. Маркелова Т.С. Иммунологические основы и методы создания исходного материала пшеницы для селекции на устойчивость к болезням в Поволжье: дис. ... док. с-х. наук: 06.01.11. – Саратов, 2007. – 44 с.
2. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. Catalogue of gene symbols for wheat: 2010 supplement // <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene2010>.
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: 10.11134/btp.1.2014.10.
4. Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 1994. – № 88. – P. 110–115.
5. Feuillet C., Travella S., Stein N., Albar L., Nublat A., Keller B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2003, – 100(25). – P. 15253–15258.
6. Prins, R., Groenewald, J.Z., Marais, G.F., Snape, J.W., Koeber, R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – № 103: – P. 618–624.
7. Schachermayr G., Messmer M.M., Feuillet C., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 1995. – № 90. – P. 982–990.

8. Procunier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarnecki E., Dyck P.L. RAPD/DGGE markers linked to leaf rust resistance genes *Lr29* and *Lr25* in wheat (*Triticum aestivum* L.). // Journal of Genetics and Breeding. – 1995. – 49. – P. 87-92.
9. Hiebert C.W., Thomas J.B., Somers D.J., McCallum B.D., Fox S.L. Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2007. – 115. – P. 877–884.
10. Mago R., Spielmeyer W., Lawrence G.J., Lagudah E.S., Ellis J.G., Pryor A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theoretical and Applied Genetics. – 2002. – Vol. 104(8). – P. 1317-1324.
11. Thomas J., Nilmalgoda S., Hiebert C., McCallum B., Humphreys G., DePauw R. Genetic markers and leaf rust resistance of the wheat gene *Lr32* // Crop Science. – 2010. – № 50. – P. 2310-2317.
12. Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Bariana H.S., Spielmeyer W. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2006. – Vol. 114(1). – P. 21-30
13. Mago R., Zhang P., Bariana H.S., Verlin D.C., Bansal U.K., Ellis J.G., Dundas I.S. Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection // Theoretical and Applied Genetics. – 2009. – 124. – P.65-70.
14. Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-qi L., Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // Crop Science. – 2003. – № 43. – P. 1839-1847.
15. Herrera-Foessel S.A., Singh R.P., Huerta-Espino J., Rosewarne G.M., Periyannan S.K., Viccar L., Calvo-Salazar V., Lan C., Lagudah E.S. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat // Theoretical and Applied Genetics. – 2012. – Vol.124. P. 1475-1486.
16. Кохметова А.М., Седловский А.И., Тюпина Л.Н., Есенбекова Г.Т., Идентификация гермоплазмы пшеницы, устойчивой к ржавчине с использованием генетических и молекулярных маркеров // Бюллетень Никитского ботанического сада. – Выпуск 99. – С. 41-45.
17. Lagudah E.S. Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat // Euphytica. 2011. – 179. – P. 81-91.
18. Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Canadian Journal of Research. – 1948. – Vol. 26 – P. 496-500.
19. Riede C.R. and Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat // Crop Science. – 1996. – Vol. 36. – P. 905-909.
20. Chen X.M., Line R.F., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis // Theoretical and Applied Genetics – 1998. – Vol.97. – P. 345-355.
21. Kolmer J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust // Annu. Rev. Phytopathology. – 1996. –34(1). – P. 435-455.

Сапахова З.Б., Кохметова А.М., Моргунов А.И., Елешев Р.Е.

БИДАЙ ҮЛГІЛЕРІН ҚОҢЫР ТАТТЫҢ ТӨЗІМДІЛІК ГЕНДЕРІНІҢ ТАСЫМАЛДАУШЫЛАРЫН МОЛЕКУЛАЛЫҚ СКРИНИНГТЕУ НЕГІЗІНДЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Қоңыр тат бидайдың қауіпті ауруларының бірі. Бұл зерттеуде қоңыр татқа эффективті төзімділік гендері – *Lr9*, *Lr10*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr68*, сондай-ақ *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Yr17/Sr31*, *Lr35/Sr39* және *Lr34/Yr18* ген кешендері зерттелген. Молекулалық скрининг нәтижесінде L286 линиясы бес эффективті *Lr*-геннің (*Lr22a*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr68*) тасымалдаушысы екені айқындалды, оның ішінде ересек төзімділіктің APR-гендері бар. Ал L372 линиясында 4 ген (*Lr24*, *Lr29*, *Lr35*, *Lr37*) және Жетысу сортында 1 *Lr*-ген (*Lr22a*) идентификацияланды. Алынған нәтижелерді Қазақстанда Marker Assisted Selection технология арқылы қоңыр татқа төзімді бидай сорттарын шығару үшін қолдануға болады.

Кілт сөздер: бидай, қоңыр тат, төзімділік гендері, *Lr*-гендер, молекулалық маркерлер.

Z.B. Sapakhova, A.M. Kokhmetova, A.I. Morgounov, R.E. Yeleshev

IDENTIFICATION OF CARRIERS OF LEAF RUST RESISTANCE GENES ON BASED MOLECULAR SCREENING OF WHEAT ENTRIES

Wheat leaf rust is dangerous disease of wheat. In the present study, attention was drawn to the part of the effective resistance genes to leaf rust - *Lr9*, *Lr10*, *Lr22a*, *Lr24*, *Lr29*, *Lr32*, *Lr68*, as well as gene complex *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Yr17/Sr31*, *Lr35/Sr39* and *Lr34/Yr18*, which were identified in the process of molecular screening of wheat germplasm. In the results of molecular screening line L286 was carriers of five effective *Lr*-genes (*Lr22a*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr68*), including APR genes (*Lr22a*, *Lr34* and *Lr68*). In the line L372 identified 4 genes (*Lr24*, *Lr29*, *Lr35*, and *Lr37*) and 1 gene (*Lr22a*) in cultivar Zhetisu. The results are used in Kazakhstan to create leaf rust resistant wheat varieties using MAS breeding. Our results provide an opportunity to move the breeding process in Kazakhstan to a new scientific level through the use of technology Marker Assisted Selection.

Keywords: wheat, leaf rust, resistance genes, *Lr*-genes, molecular markers.

УДК: 582.475

Е.Ж. Сембиев, М.В. Шабалина

Казахский национальный аграрный университет

ВЛИЯНИЕ КОСВЕННЫХ ФАКТОРОВ НА ГОРНЫЕ ЛЕСА СЕВЕРНОГО ТЯНЬ-ШАНЯ

Аннотация

В статье рассматриваются вопросы влияния косвенных факторов на лесообразующую среду и предлагаются основные мероприятия для сохранения устойчивости насаждений: соблюдение лесотипологических соответствий, поддержание законов конкуренции и естественный отбор.