



# Идентификация гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в сортах и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы Аграрного научного центра «Донской»

Н.Н. Вожжова

Аграрный научный центр «Донской», Ростовская область, Зерноград, Россия

Одно из приоритетных направлений селекции озимой мягкой пшеницы в настоящее время – обеспечение сопротивляемости листовым заболеваниям и, в частности, бурой ржавчине как самой вредоносной из них. Ген устойчивости к бурой ржавчине, *Lr34*, обеспечивает резистентность растений пшеницы по типу медленного развития. Использование *Lr34* в сочетании с другими генами устойчивости к бурой ржавчине (*Lr2c*, *Lr10*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr16* и др.) позволит получить образцы и сорта, менее подверженные болезням в полевых условиях. Целью работы была идентификация гена *Lr34* в сортах и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской» (АНЦ «Донской»), поскольку предполагалось его присутствие благодаря вовлечению в гибридизацию в 1960-е гг. сорта Безостая 1, а изучение этого гена в нашем коллекционном материале ранее не проводилось. В статье представлены результаты работы по идентификации у 646 образцов озимой мягкой пшеницы (в том числе 36 сортов АНЦ «Донской», внесенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и 8 сортов, проходящих государственное сортоиспытание) гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* и его аллельного состояния. Оценка аллелей гена *Lr34* проводилась при помощи кодоминантного молекулярного STS-маркера *csLV34* методом полимеразной цепной реакции. Всего было идентифицировано 238 образцов, несущих ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в доминантном аллельном состоянии. Сорта селекции АНЦ «Донской» Находка, Бонус, Конкурент, Аксинья, Казачка, Донская полукарликовая, Донская безостая, Изюминка, Зерноградка 9, Зерноградка 10 и Зерноградка 11 рекомендуются в качестве источников гена *Lr34* для селекции на устойчивость озимой мягкой пшеницы к болезням сельскохозяйственных культур, поскольку несут его доминантный аллель.

Ключевые слова: сорта; образцы; озимая мягкая пшеница; бурая ржавчина; ген; устойчивость; *Lr34*; полимеразная цепная реакция; идентификация.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

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;22(3):329-332. DOI 10.18699/VJ18.368

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Vozhzhova N.N. Identification of the *Lr34* gene for resistance to leaf rust in varieties and collection samples of winter soft wheat from the Agricultural Research Center "Donskoy". Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(3):329-332. DOI 10.18699/VJ18.368 (in Russian)

## Identification of the *Lr34* gene for resistance to leaf rust in varieties and collection samples of winter soft wheat from the Agricultural Research Center "Donskoy"

N.N. Vozhzhova

Agricultural Research Center "Donskoy", Rostov region, Zernograd, Russia

Nowadays one of the priorities in winter soft wheat breeding is to provide resistance to leaf diseases, and, in particular, to leaf rust as the most harmful of them. The gene for resistance to leaf rust, *Lr34*, provides resistance to wheat plants at the slow development. The use of this gene together with other genes for resistance to leaf rust will allow obtaining varieties and samples less susceptible to the disease. The purpose of this work was to identify the *Lr34* gene in the varieties and collection samples of winter soft wheat in the Agricultural Research Center "Donskoy" (ARC "Donskoy"), because its presence was suspected due to the introduction of the variety "Bezostaya 1" in hybridization of the 1960s, but the study of this gene in our collection has not been carried out yet. The article gives the results of the study of 646 samples of winter soft wheat (including 36 varieties of ARC "Donskoy" introduced in the State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation and 8 varieties being tested in the State Variety Testing) and identification of the *Lr34* gene and its allelic state. The assessment of the allelic state of the *Lr34* gene has been carried out with the help of the codominant marker *csLV34* using the method of PCR. There have been identified 238 samples with the *Lr34* gene in the dominant allelic state. The varieties Nakhodka, Bonus, Konkurent, Aksiniya, Kazachka, Donskaya polukarlikovaya, Donskaya bezostaya, Izyuminka, Zernogradka 9, Zernogradka 10 and Zernogradka 11 developed in SSE "ARC "Donskoy" are recommended as a source of the *Lr34* gene to breed winter soft wheat resistant to the diseases.

Key words: varieties; samples; winter soft wheat; leaf rust; gene; resistance; *Lr34*; polymerase chain reaction; identification.

В настоящее время одним из приоритетных направлений селекции озимой мягкой пшеницы является обеспечение устойчивости к листовым болезням и, в частности, к бурой ржавчине как самой вредоносной из них. В мире известно уже более 80 генов устойчивости к этому заболеванию, для идентификации которых используются сцепленные с ними молекулярные маркеры. Гены устойчивости к бурой ржавчине в опубликованном каталоге генных символов получили обозначение *Lr* (McIntosh et al., 2013).

Ген *Lr34* обеспечивает устойчивость растений пшеницы по типу медленного развития, который характеризуется удлинением периода развития болезни после поражения, а также уменьшением количества пустул возбудителя на поверхности листа и их размеров. Использование этого гена в сочетании с другими генами устойчивости к бурой ржавчине (*Lr2c*, *Lr10*, *Lr12*, *Lr13*, *Lr16* и др.) позволит получить менее подверженные болезни образцы и сорта пшеницы (Schnurbusch et al., 2004). Предполагалось, что ген устойчивости к бурой ржавчине, *Lr34*, может присутствовать в сортах и коллекционных образцах озимой мягкой пшеницы ФГБНУ «Аграрный научный центр «Донской» (АНЦ «Донской») благодаря вовлечению в гибридизацию с 1959 г. сорта Безостая 1 (Калиненко, 1995).

В связи с этим цель нашей работы – идентификация гена *Lr34* и определение его аллельного состояния в образцах озимой мягкой пшеницы АНЦ «Донской».

## Материал и методы

Объектом исследования были 646 образцов озимой мягкой пшеницы из коллекции отдела селекции и семеноводства пшеницы АНЦ «Донской», в том числе 36 сортов, внесенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, и 8 сортов, проходящих государственное сортоиспытание (Самофалова и др., 2016). В качестве контроля использовали почти изогенную линию сорта Thatcher, несущую ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr34*. ДНК пшеницы выделяли из смеси 5–7-дневных проростков каждого исследуемого образца (Plaschke et al., 1995).

Идентификацию гена *Lr34* осуществляли при помощи метода полимеразной цепной реакции с кодоминантным STS-маркером *csLV34*, маркирующим ген *Lr34* в различных аллельных состояниях (Lagudah et al., 2009).

Состав реакционной смеси в объеме 25 мкл: геномная ДНК (25 нг/мкл) – 2 мкл; 10 × PCR буфер – 2.5 мкл;  $MgCl_2$  (25 ммоль) – 2 мкл; смесь dNTPs (25 ммоль) – 0.2 мкл; по 1 мкл каждого праймера (10 ммоль); Tag-полимераза (5 ед./мкл) – 0.25 мкл; деионизированная вода – 16.05 мкл.

Условия амплификации: 94 °C – 5 мин; 40 циклов (94 °C – 40 с, 55 °C – 30 с, 72 °C – 1 мин); 72 °C – 7 мин (Lagudah, 2006). Продукты амплификации визуализировали в 2 % агарозном геле методом горизонтального электрофореза в ТВЕ-буфере (Brody et al., 2004). Визуализацию ДНК в окрашенном бромистым этидием агарозном геле осуществляли с помощью прибора Bio-Rad GelDoc XR+ с программным обеспечением BioRad ImageLab 5.1. Размер ампликонов определяли с помощью маркера молеку-

лярной массы ДНК 100–1000 п. н. («Синтол», г. Москва, Россия).

## Результаты и обсуждение

Ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* считается слабо эффективным в России (Гуляева, Садовая, 2014), но представляет ценность в качестве источника сцепленных с ним в одном сегменте хромосомы других генов устойчивости к болезням, таких как желтая ржавчина (*Yr18*), мучнистая роса (*Pm46*) и стеблевая ржавчина (*Sr57*) (McIntosh et al., 2013).

Всего исследовано 646 образцов озимой мягкой пшеницы АНЦ «Донской» (в том числе 44 сорта), из которых идентифицировано 238 образцов, несущих ген устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в доминантном аллельном состоянии.

Гетерозиготное аллельное состояние гена *Lr34* было идентифицировано в 68 образцах, рецессивное – в 240. В 99 пробах ген *Lr34* отсутствовал (например, в сортах иностранной селекции из коллекции ВИР с каталожными номерами 63938, 63542, 63543, 63547, 63283, 63548, 63549, 63550, 63551, 63555 и др.).

Маркер *csLV34*, применяемый для идентификации гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34*, позволяет оценить аллельное состояние этого гена в образцах озимой мягкой пшеницы. На доминантный (функциональный) аллель указывает наличие в образцах фрагмента амплификации с молекулярным весом 150 п. н., на рецессивный (не функциональный) аллель – 229 п. н. В случае наблюдения обоих фрагментов в образце ген *Lr34* находится в гетерозиготном состоянии (рисунок) либо это свидетельствует о гетерогенности исходного материала, поскольку экстракция ДНК проводилась из смеси проростков.

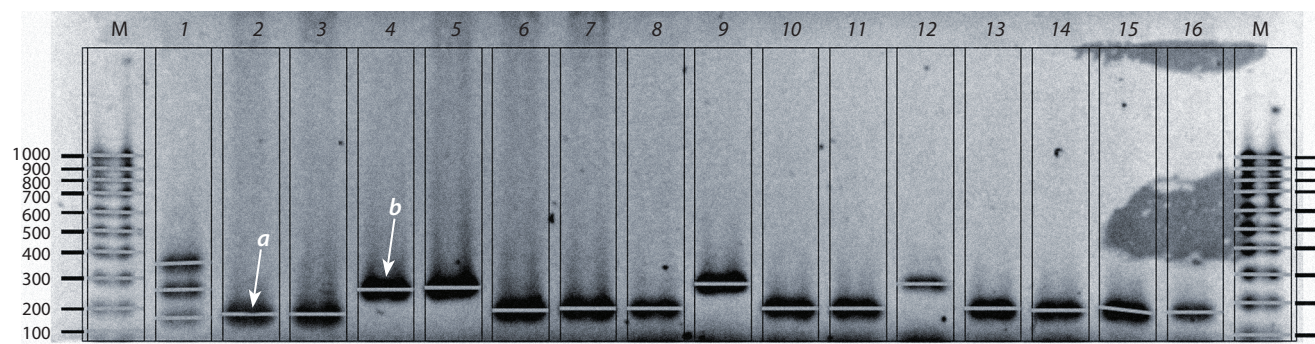
На рисунке представлен фрагмент одного из рабочих гелей, идентифицирующих наличие в исследуемых образцах гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* в различных аллельных состояниях.

Сорта Дон 95, Ростовчанка 5, Лучезар и Подарок Дону имеют рецессивный аллель гена *Lr34*.

Сорта Находка, Бонус, Конкурент, Аксиныя, Казачка, Донская полукарликовая, Донская безостая, Изюминка, Зерноградка 9, Зерноградка 10 и Зерноградка 11 несут доминантный аллель гена *Lr34* и могут быть использованы в качестве его источников в селекционном процессе.

У сорта Ермак помимо гетерозиготного состояния аллелей гена *Lr34* наблюдается дополнительный ампликон размером 343 п. н. Аналогичная картина отмечается и в ряде других проанализированных образцов. Возникновение ампликона такого размера, отличного от обоих известных аллелей гена *Lr34*, может быть связано с различными причинами: появлением неспецифического продукта амплификации, гетерогенностью или загрязнением исходного материала, а также с рекомбинацией маркера *csLV34* с локусом *Lr34*.

У сортов селекции АНЦ «Донской», внесенных в Государственный реестр селекционных достижений, а также проходящих государственное сортоиспытание, определены аллели гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* (таблица).



An exemplary electrophoregram identifying the allelic state of the *Lr34* gene in winter soft wheat varieties of Agrarian Research Center Donskoy.

M, molecular weight ladder 100–1000 bp.; 1, Ermak; 2, Nakhodka; 3, Bonus; 4, Don 95; 5, Rostovchanka 5; 6, Konkurent; 7, Aksin'ya; 8, Kazachka; 9, Luchezar; 10, Donskaya polukarikovaya (semi-dwarf); 11, Donskaya bezostaya; 12, Podarok Donu; 13, Izyuminka; 14, Zernogradka 9; 15, Zernogradka 10; 16, Zernogradka 11. (a) Amplicon of the dominant allele of the gene, 150 bp.; (b) amplicon of the recessive allele, 229 bp.

Winter soft wheat varieties with identified alleles of the gene *Lr34* bred at the Kalinenko All-Russia Research Institute of Cereal Crops that are enrolled in the State Register of Breeding Achievements of the Russian Federation or are being tested in State Variety Trials

Accession	Genotype for <i>Lr34</i>	Accession	Genotype for <i>Lr34</i>	Accession	Genotype for <i>Lr34</i>	Accession	Genotype for <i>Lr34</i>
Aksiniya	3	Donskoy mayak	3	Kaprizulya	3	Spartak	1
Asket	3	Donskoy prostor	3	Konkurent	3	Stanichnaya	3
Garant	3	Donskoy syurpriz	3	Lidiya	3	Tanais	3
Dar Zernograda	1	Donshchina	2	Lilit	3	Bonus	3
Deviz	3	Ermak	2	Marafon	3	Kipchak	1
Don 93	3	Zarnitsa	1	Nakhodka	3	Admiral	3
Don 95	1	Zernogradka 9	3	Pamyati Kalinenko	3	Kazachka	3
Don 105	3	Zernogradka 10	3	Podarok Donu	1	Luchezar	1
Don 107	3	Zernogradka 11	3	Rostovchanka 3	3	Krasa Dona	3
Donskaya bezostaya	3	Izyuminka	3	Rostovchanka 5	1	Shef	3
Donskaya yubileynaya	3	Kapitan	3	Rostovchanka 7	1	Etyud	1

Designations: 3, dominant allele of the *Lr34* gene; 2, heterozygous allelic state of the gene; 1, recessive allele of the gene.

Из 44 представленных сортов доминантным аллелем гена обладали 32, а гетерозиготное аллельное состояние было выявлено у сортов Донщина и Ермак.

Рецессивный аллель гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* наблюдался у сортов Дар Зернограда, Дон 95, Зарница, Подарок Дону, Ростовчанка 5, Ростовчанка 7, Спартак, Кипчак, Лучезар и Этюд.

Сорта озимой мягкой пшеницы с доминантным аллелем гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* имели невысокое поражение патогеном в полевых условиях. Так, у сортов Зерноградка 9, Зерноградка 11, Конкurent, Капитан, Марфон, Лидия, Донской сюрприз, Аскет и других поражение составляло 0–5 %, в то время как сорта с рецессивным аллелем *Lr34*, Дар Зернограда, Дон 95, Зарница, Подарок Дону и другие поражались до 50–60 %.

В селекции на устойчивость озимой мягкой пшеницы к болезням сельскохозяйственных культур рекомендуется использовать в качестве источников сорта селекции АНЦ «Донской», обладающие доминантным аллелем гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34*.

### Acknowledgments

Genotyping for the *Lr34* gene for leaf rust resistance in winter wheat varieties and accessions was supported by State Budgeted Project 0706-2015-0001.

The author is grateful to the Head of the Department of Winter Wheat Breeding and Seed Industry of Agrarian Research Center Donskoy D.M. Marchenko for kindly provided material for the study.

## Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

## References

- Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E., Creavalle T.D., Kern S.E. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media. *Biotechniques*. 2004;37(4):598-602.
- Gulyaeva E.I., Sadovaya A.S. Breeding of soft wheat for resistance to brown rust in Russia. *Zashchita i Karantin Rasteniy = Plant Protection and Quarantine*. 2014;10:24-26. (in Russian)
- Kalinenko I.G. *Selektsiya ozimoy pshenitsy* [Winter wheat breeding]. Moscow: Rodnik Publ., 1995. (in Russian)
- Lagudah E.S., Krattinger S.G., Herrera-Foessel S. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119:889-898.
- Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Bariana H.S., Spielmeier W. Molecular-genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2006;114:21-30.
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat. The 12<sup>th</sup> Int. Wheat Genetics Symp. Japan, Yokohama, 2013;197. Available at <http://maswheat.ucdavis.edu/CGSW/GeneSymbol.pdf>.
- Plaschke J., Ganal M.W., Roder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 1995;91:1001-1007.
- Samofalova N.E., Skripka O.V., Marchenko D.M., Filippov E.G., Dontsova A.A., Kostylev P.I., Krivosheev G.J., Kovtunova N.A., Kovtunov V.V., Ignatiev S.A. *Sorta i gibridy. Katalog* [Varieties and hybrids. Catalogue]. Rostov-on-Don: Kniga Publ., 2016. (in Russian)
- Schnurbusch T., Paillard S., Schori A., Messmer M., Schachermayr G., Winzeler M., Keller B. Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theor. Appl. Genet.* 2004;108: 477-484.