

УДК 577.21:633.111.1

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ В ВИДАХ *AEGILOPS* L., СИНТЕТИЧЕСКИХ ФОРМАХ И ИНТРОГРЕССИВНЫХ ЛИНИЯХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ

© 2012 г. Э.Р. Давоян, Р.О. Давоян, И.В. Бебякина, О.Р. Давоян, Ю.С. Зубанова,
А.Н. Зинченко, А.М. Кравченко

Краснодарский НИИ сельского хозяйства им. П.П. Лукьяненко, Краснодар, Россия,
e-mail: davayan@rambler.ru

Поступила в редакцию 11 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

С помощью диагностических молекулярных маркеров, сцепленных с известными генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*, был проведен скрининг образцов ДНК диких сородицей, синтетических форм и интрогрессивных линий мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). Ген *Lr9* был идентифицирован в геноме образцов вида *Aegilops umbellulata*, гены *Lr35* и *Lr47* – в *Ae. speltoides*. В синтетических формах Аврората и Авродес с замещением генома D пшеницы на геномы *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides* соответственно выявлены гены *Lr9* и *Lr35*. В геноме интрогрессивных линий, созданных с участием *Ae. umbellulata*, ген *Lr9* не идентифицирован. Присутствие гена *Lr35* установлено в одной линии, созданной на основе Авродес. Предполагается, что часть образцов диких видов и интрогрессивных линий имеет дополнительные гены устойчивости к листовой ржавчине.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, *Aegilops speltoides*, *Ae. umbellulata*, гены устойчивости к листовой ржавчине, синтетические формы, интрогрессивные линии мягкой пшеницы, молекулярные маркеры.

Введение

Листовая ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) является одной из самых распространенных и вредоносных болезней пшеницы. Поражение посевов приводит к значительным потерям урожая и снижению качества зерна. Для защиты сортов традиционно используется отдаленная гибридизация, которая позволяет обогащать генофонд мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) за счет ее дикорастущих сородицей.

Богатейший запас генов устойчивости к болезням сосредоточен в эгилопсах (Bell, Lupton, 1955; Pasquini, 1980). Широкая адаптация в разных эколого-географических зонах делает этот род источником большого генетического разнообразия.

Ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* был интрогрессирован в геном гексаплоидной пшеницы из *Aegilops umbellulata* (Sears, 1956).

В настоящее время известно о передаче генов *Lr35*, *Lr36*, *Lr47* и *Lr51* от вида *Ae. speltoides* (McIntosh *et al.*, 2005).

Для передачи пшенице от диких сородицей генов устойчивости к болезням и других положительных признаков в лаборатории цитогенетики Краснодарского НИИСХ был разработан подход по перестройке генома мягкой пшеницы. Путем замещения генома твердой пшеницы на геномы ААВВ мягкой пшеницы был получен тетраплоидный компонент сорта Аврора (Жиров, Терновская, 1984). С использованием полученного тетракомпонента были созданы синтетические геномно-замещенные формы Аврората и Авродес, у которых геном D мягкой пшеницы был замещен соответственно геномом U вида *Ae. umbellulata* и геномом S *Ae. speltoides*. При использовании этих форм были получены интрогрессивные линии озимой мягкой пшеницы, характеризующиеся устойчивостью к болезням, высоким содержанием

белка и другими интересными для селекции морфо-биологическими признаками.

Настоящая работа была проведена с целью скрининга образцов ДНК видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltooides*, синтетических форм Авролата и Авродес, полученных на их основе интрогрессивных линий мягкой пшеницы, на присутствие маркеров, сцепленных с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*.

Материалы и методы

Объектами исследований служили образцы вида *Ae. umbellulata* (коллекционные номера 571148, 577973, 583165, 1626, 1628, 1461, 1283, 816, 849, 44, 2306, 1588, 916 и 2244), образцы вида *Ae. speltooides* (коллекционные номера 1595, 2036, 2274, 2280, 2716, 2717, 3256, 1000, 2912, 3282, C4 и C5), синтетические формы мягкой пшеницы Авролата (BAU) и Авродес (BAS), 96 линий мягкой пшеницы с интрогрессией генетического материала от *Ae. umbellulata* и 30 линий с генетическим материалом *Ae. speltooides*. Все образцы видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltooides*, за исключением C4 и C5 из коллекции лаборатории, были получены из ВИР. Синтетические формы и созданные на их основе интрогрессивные

линии были получены в лаборатории биотехнологии Краснодарского НИИСХ.

Для оценки на устойчивость к листовой ржавчине использовали шкалу Мейнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926). К устойчивым относили растения с типом реакции 0 (иммунные), 1 (высокоустойчивые) и 2 (умеренно устойчивые). Растения с промежуточным типом реакции на заражение между 0 и 1 обозначались «01».

ДНК пшеницы выделяли из 5–7-дневных этилированных проростков по методу Плашке с соавт. (Plaschke *et al.*, 1995). Идентификацию генов *Lr* осуществляли с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, маркирующими гены *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*. Праймеры отбирали на основании литературных данных, их нуклеотидные последовательности представлены в табл. 1.

Условия амплификации были незначительно модифицированы (табл. 2). Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с 0,5× буфером ТВЕ. Концентрация геля варьировала от 1,5 до 2,3 % в зависимости от размера амплифицированного фрагмента. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете с помощью фотобокса «INFINITI 1000». В качестве маркера

Таблица 1

Происхождение генов устойчивости к листовой ржавчине и характеристика праймеров, используемых для идентификации соответствующих генов

Ген	Источник гена	Праймеры		Литературный источник
		название	нуклеотидная последовательность	
<i>Lr9</i>	<i>Ae. umbellulata</i>	<i>FJ13/1</i> <i>RJ13/2</i>	CCACACTACCCCAAAGAGACG TCCTTTTATTCGCGACGCCGG	Schachermayer <i>et al.</i> , 1994
<i>Lr35</i>	<i>Ae. speltooides</i>	<i>BCD260F1</i> <i>35R2</i>	GAAGTTAAAGAGGTCTTGAC TTTTGAGAATCAGTCATCAC	Seyfarth <i>et al.</i> , 1999
<i>Lr47</i>	« »	<i>PS10R</i> <i>PS10L</i>	GCTGATGACCCTGACCGGT TCTTCATGCCCGGTCTGGGT	Dubcovsky <i>et al.</i> , 2000

Таблица 2

Условия ПЦР с праймерами, используемыми для идентификации генов *Lr*

Ген	Условия амплификации фрагментов	Размер фрагмента п.н.
<i>Lr9</i>	94 °C 6 мин; 30 циклов (92 °C 30 с, 68 °C 30 с, 72 °C 60 с); 72 °C 5 мин	1100
<i>Lr35</i>	94 °C 3 мин; 35 циклов (94 °C 45 с, 60 °C 45 с, 72 °C 60 с); 72 °C 7 мин	900
<i>Lr47</i>	94 °C 5 мин; 35 циклов (94 °C 45 с, 61 °C 30 с, 72 °C 30 с); 72 °C 7 мин	282

молекулярной массы использовали ДНК-маркер М 24 100 п.н. «СибЭнзим».

В качестве положительных контролей для определения известных генов были использованы почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* (TcLr9) и *Lr35* (TcLr35). За положительный контроль для гена *Lr47* принимали ДНК образца *Ae. speltoides* 3256. В качестве отрицательного контроля использовали восприимчивый к листовой ржавчине сорт Аврора.

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день известно более 70 генов устойчивости к листовой ржавчине, *Lr*, с установленной локализацией на хромосомах пшеницы (McIntosh *et al.*, 2005). Традиционные методы определения генов трудоемки и требуют больших затрат времени, однако известные гены *Lr* можно идентифицировать с помощью молекулярных маркеров, таких, как STS (sequence-tagged site), SCAR (sequence characterized amplified regions), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) или SSR (simple sequence repeat) (Урбанович и др., 2006). Использование ДНК-маркеров позволяет быстро и точно определять нужные генотипы растений.

Исходя из родословных полученных нами интрогрессивных линий можно сделать вывод о том, что они могут содержать известные

гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* от *Ae. umbellulata* и *Lr35*, *Lr47* от *Ae. speltoides*. В связи с этим был проведен ПЦР-скрининг линий с помощью ДНК-маркеров, сцепленных с указанными выше генами. Предварительно анализировались доноры генов *Lr9*, *Lr35* и *Lr47* – образцы видов *Ae. umbellulata* и *Ae. speltoides*, а также синтетические формы Авролата и Авродес, на базе которых были созданы интрогрессивные линии.

На сегодняшний день ген *Lr9* пока является единственным известным геном устойчивости к листовой ржавчине, переданным в мягкую пшеницу от *Ae. umbellulata*. Данный ген является высокоэффективным в некоторых странах Европы, в том числе и в России (Zhemchuzina, Kurkova, 2010). Молекулярный маркер, сцепленный с *Lr9*, находится на расстоянии 8 сМ от гена; длина соответствующего ему фрагмента амплификации составляет 1100 п.н. (Schachermayer *et al.*, 1994).

ДНК 12 иммунных к листовой ржавчине (тип реакции 0) образцов *Ae. umbellulata* анализировали с помощью маркера, сцепленного с геном *Lr9*. ПЦР-анализ показал присутствие характерного фрагмента амплификации во всех исследуемых образцах (рис. 1).

Выбранный маркер позволил выявлять характерный фрагмент амплификации в геномно-замещенной форме Авролата, служившей мостиком для передачи генетического материала от *Ae. umbellulata* в пшеницу (рис. 2).

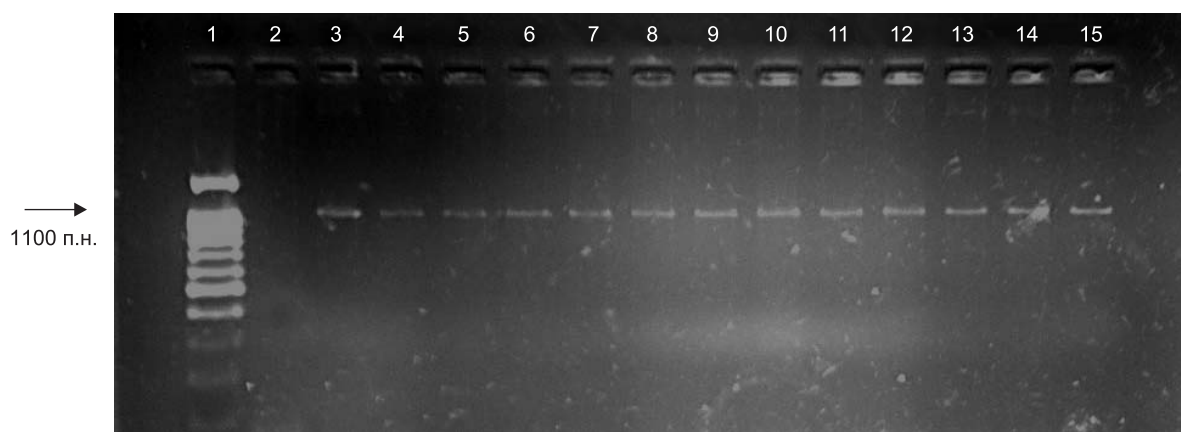


Рис. 1. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *FJ13/1* и *RJ13/2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – линия TcLr9; 4–15 – образцы вида *Ae. umbellulata*.

Интрогрессивные линии с генетическим материалом *Ae. umbellulata* были созданы путем скрещивания геномно-замещенной формы Авrolата с исходным сортом пшеницы Аврора (Давоян и др., 2004). Для идентификации маркера, сцепленного с *Lr9*, были отобраны 96 линий. Все линии были устойчивы к листовой ржавчине, тип реакции некоторых из них представлен в табл. 3. В 96 проанализированных линиях маркера, сцепленного с геном *Lr9*, выявлено не было (рис. 2).

ДНК 12 иммунных к листовой ржавчине (тип реакции: 0) образцов диких видов *Ae. speltoides* различных эколого-географических групп анализировали с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и

Таблица 3

Устойчивость к листовой ржавчине линий с генетическим материалом *Ae. umbellulata*

Название линии	Тип реакции устойчивости к листовой ржавчине
Д581	2
Д597	2
Д603	2
Д611	2
Д617	1
Д625	1
Д627	01
Д631	1

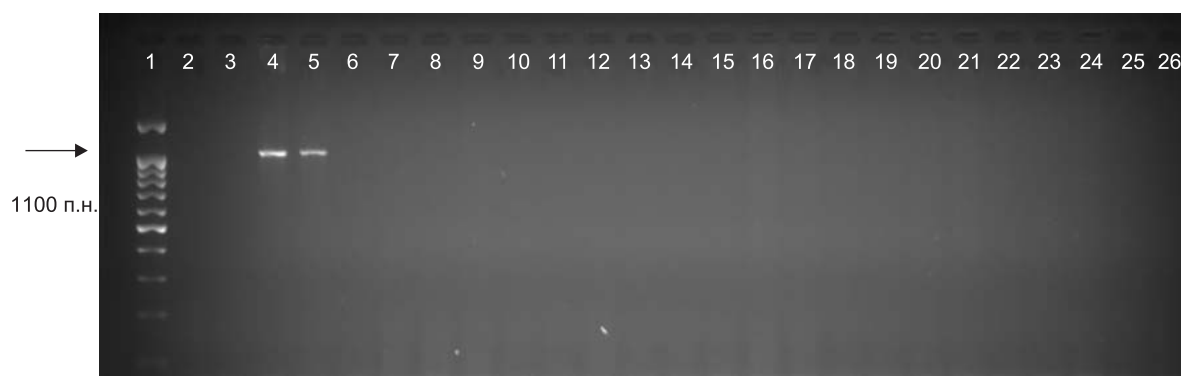


Рис. 2. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *FJ13/1* и *RJ13/2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*.

1 – маркер длины; 2 – Кавказ; 3 – Аврора; 4 – линия TcLr9; 5 – Авrolата; 6–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. umbellulata*.

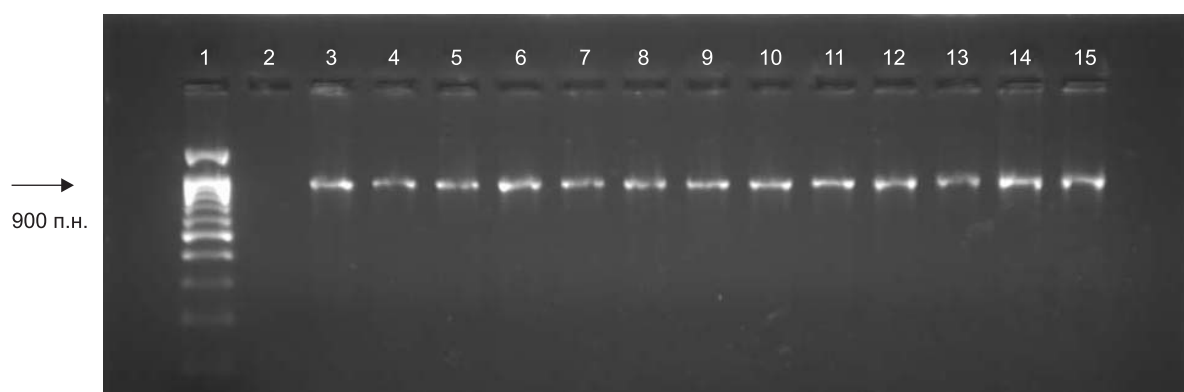


Рис. 3. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *BCD260F1* и *35R2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr35*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – линия TcLr35; 4–15 – образцы вида *Ae. speltoides*.

Lr47. Ген *Lr35* идентифицировали во всех 12 исследуемых образцах (рис. 3). Наличие маркера, сцепленного с геном *Lr47*, было выявлено в образцах 3256 и 1000 (рис. 4).

Передача генетического материала из *Ae. speltoides* в линии пшеницы осуществлялась с помощью синтетической формы Авродес.

В ДНК данной формы был выявлен маркер, сцепленный с геном *Lr35* (рис. 5), однако не был идентифицирован маркер, сцепленный с геном *Lr47* (рис. 6).

Для идентификации маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и *Lr47*, было отобрано 30 устойчивых к листовой ржавчине линий. Характеристи-



Рис. 4. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *PS10R* и *PS10L* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости к листовой ржавчине *Lr47*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора, 3–14 – образцы вида *Ae. speltoides* (9 – образец 3256; 10 – образец 1000).



Рис. 5. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *BCD260F1* и *35R2* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости *Lr35*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – линия TcLr35; 4 – Авродес; 5–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides* (26 – линия P771).

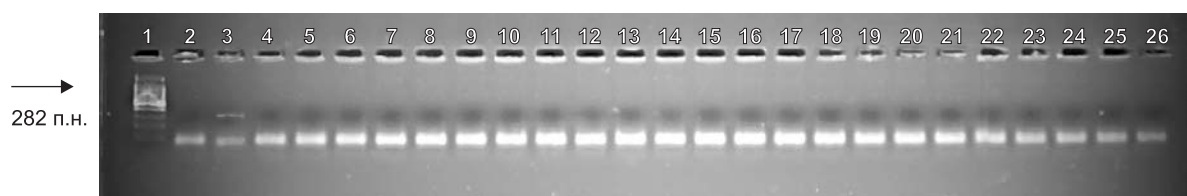


Рис. 6. Продукты амплификации с использованием пары праймеров *PS10R* и *PS10L* к диагностическому маркеру, сцепленному с геном устойчивости *Lr47*.

1 – маркер длины; 2 – Аврора; 3 – образец № 3256; 4 – Авродес; 5–26 – линии пшеницы с генетическим материалом *Ae. speltoides*.

Таблица 4
Устойчивость к листовой ржавчине линий
с генетическим материалом *Ae. speltooides*

Название линии	Тип реакции устойчивости к листовой ржавчине
P661	01
P742	2
P757	01
P760	01
P771	01
P773	1
P785	1
P803	2

ка устойчивости некоторых из них представлена в табл. 4. Присутствие гена *Lr35* установлено в линии P771, созданной на основе Авродес (рис. 5). ПЦР-анализ с праймерами к локусу, сцепленному с геном *Lr47*, не идентифицировал характерный фрагмент амплификации ни в одной из линий (рис. 6).

Отобранные нами для исследования образцы диких сородичей являются ценными источниками устойчивости к листовой ржавчине. Ген *Lr9* был идентифицирован в геноме образцов вида *Ae. umbellulata*, *Lr35* и *Lr47* – *Ae. speltooides*.

В ДНК синтетических форм Авролата и Авродес, служивших генетическим мостиком для передачи ценных признаков в интрогрессивные линии, выявлены гены *Lr9* и *Lr35* соответственно. Маркер, сцепленный с геном *Lr47*, не был выявлен в ДНК синтетической формы Авродес, возможно, это связано с тем, что образец *Ae. speltooides*, использовавшийся для получения синтетика, не несет данный ген.

Высокоэффективный ген устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, переданный от *Ae. umbellulata*, не был выявлен в анализируемых, устойчивых к болезни, линиях, полученных на основе синтетика Авролата. Можно предположить, что данные линии несут новый(е) ген(ы) устойчивости к листовой ржавчине.

Присутствие гена *Lr35* установлено в линии P771, созданной на основе формы Авродес. В остальных линиях с генетическим материалом *Ae. speltooides* маркеров, сцепленных с генами *Lr35* и *Lr47*, не выявлено. В дальнейшем планируется анализ данных линий на присутствие

известных генов устойчивости к листовой ржавчине *Lr36* и *Lr51*.

Не стоит исключать возможности потери маркеров, сцепленных с генами *Lr9*, *Lr35*, и *Lr47*, при рекомбинациях в процессе беккроссирования и самоопылений. Данная работа требует продолжения, в частности проведения фитопатологического теста, а также цитогенетического исследования передачи генетического материала от *Ae. umbellulata* и *Ae. speltooides* в созданные интрогрессивные линии. Вместе с тем изучаемый нами материал является ценным источником для селекции пшеницы на устойчивость к листовой ржавчине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-04-96542).

Литература

- Давоян Р.О., Бебякина И.В., Кекало Н.Ю. Получение и изучение замещенных по геному D линий мягкой пшеницы с хромосомами *Ae. umbellulata* // Наука Кубани. 2004. № 3. Ч. I. С. 48–51.
- Жиров Е.Г., Терновская Т.К. Геномная инженерия у пшеницы // Вестник с.-х. наук. 1984. № 10. С. 58–66.
- Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. № 5. С. 675–683.
- Bell D.G., Lupton F.G.H. Investigation of the Triticinae. Disease reactions species of *Triticum* and *Aegilops* and amphiploids between them // Can. J. Genet. Cytol. 1955. V. 5. P. 83–88.
- Dubcovsky J., Helguera M., Khan I.A. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47* // Theor. Appl. Genet. 2000. V. 101. P. 625–631.
- Mains E.B., Jakson H.S. Physiologic specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticiana* Erikss // Phytopathology. 1926. V. 16. P. 89–120.
- McIntosh R.A., Devos K.M., Dubcovsky J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat: Supplement // Ann. Wheat Newslett. 2005. V. 51. P. 251–285.
- Pasquini M. Disease resistance in wheat. Behavior of *Aegilops* species with respect to *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*, and *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* // Genet. Agric. 1980. V. 34. P. 133–148.
- Plaschke J., Ganai M.W., Roder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1995. V. 91. P. 1001–1007.
- Schachermayer G., Siedler H., Gale M.D. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat // Theor. Appl. Genet. 1994.

- V. 88. P. 110–115.
- Seyfarth R., Feuillet C., Schachermayer G. *et al.* Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 1999. V. 99. P. 554–560.
- Sears E.R. The transfer of leaf rust resistance from *Aegilops umbellulata* to wheat // *Brookhaven Symp. Biol.* 1956. V. 9. P. 1–20.
- Zhemchuzina A., Kurkova N. Structure of population of *Puccinia triticina* in various regions of Russia in 2006–2008 // *Abstr. of 8th Intern. Wheat Conf.* 1–4 June 2010. St. Petersburg, Russia. P. 279.

IDENTIFICATION OF LEAF RUST RESISTANCE GENES IN SPECIES OF *AEGILOPS* L., SYNTHETIC FORMS, AND INTROGRESSION LINES OF COMMON WHEAT

E.R. Davoyan, R.O. Davoyan, I.V. Bebyakina, O.R. Davoyan, Yu.S. Zubanova,
A.M. Kravchenko, A.N. Zinchenko

Krasnodar Lukyanenko Research Institute of Agriculture, Krasnodar, Russia,
e-mail: davayan@rambler.ru

Summary

DNA samples of wild relatives, synthetic forms and introgression lines of common wheat (*Triticum aestivum* L.) have been genotyped with diagnostic molecular markers linked to known leaf rust resistance genes *Lr9*, *Lr35* and *Lr47*. The *Lr9* gene is present identified in *Aegilops umbellulata*, and *Lr35* and *Lr47*, in *Ae. speltoides*. The synthetic forms Avrolata and Avrodes, with the substitution of the genomes of *Ae. umbellulata* and *Ae. speltoides*, respectively, for the wheat D-genome, possess *Lr9* and *Lr35* genes. The genomes of the introgression lines developed using *Ae. umbellulata* lack *Lr9*. The *Lr35* gene is present in one of the introgression lines derived from Avrodes. Some of the wild relatives and the introgression lines are suggested to have additional leaf rust resistance genes.

Key words: *Triticum aestivum*, *Aegilops speltoides*, *Aegilops umbellulata*, leaf rust resistance genes, synthetic, common wheat introgression lines, molecular markers.