

УДК 577.113:575.22:633.11

## **ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕНА УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ Lr34 В СОРТАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНОГО МАРКЕРА**

А.М. РАДЧЕНКО, Е.Н. ТИЩЕНКО

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины  
Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская 31/17  
e-mail: dubrovny@ukr.net

*Lr 34* является одним из высокоэффективных генов устойчивости мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) к бурой ржавчине – болезни, которая приводит к снижению урожайности и качества зерна. Исследовано 13 сортов пшеницы на наличие гена *Lr34* с использованием микросателлитного локуса *Xgwm 295*. Установлено варьирование аллельного состава этого *SSR*-маркера. Среди проанализированных сортов пшеницы аллели локуса *Xgwm 295* имеют размер 240, 254 и 280 пн. Аллель размером 254 пн, который сцеплен с геном *Lr34*, присутствует у сортов Золотоколоса, Подолянка, Glenlea, Frontana, Saar.

**Ключевые слова:** бурая ржавчина, *SSR*-маркеры, пшеница.

**Введение.** Бурая, или листовая, ржавчина, одна из основных болезней пшеницы (*Triticum aestivum* L.), возбудителем которой является грибок *Puccinia triticina*, может приводить к потерям урожая, а также к снижению качества зерна. Устойчивость к бурой ржавчине мягкой пшеницы является предпосылкой для получения стабильно высоких урожаев.

На сегодня обнаружено более 50 *Lr*-генов, часть из которых перенесена в геном гексаплоидной пшеницы из родственных видов. Они располагаются на разных хромосомах и различаются по эффективности. В частности, *Lr34*, локализованный на хромосоме 7D; *Lr1*, расположенный на длинном плече хромосомы 5D; *Lr9*, локализованный на длинном плече хромосомы 6B; *Lr10*, картированный на коротком плече хромосомы 1A; *Lr20*, расположенный на длинном плече хромосомы 7A. Источником гена *Lr26* является рожь *Secale cereale*, он находится на коротком плече хромосомы 1RS [1–3, 6, 9]. В соответствии с тем, какие *Lr*-гены представлены в генотипе, определяется уровень устойчивости растений пшеницы к этому патогену. Вместе с тем, в селекционно – генетических программах могут использоваться комбинации разных генов.

*Lr34* относится к числу наиболее высокоэффективных генов устойчивости к бурой ржавчине. В отличие от других *Lr*-генов, он не связан с расспецифичностью и обеспечивает общую устойчивость сортов пшеницы на протяжении всего вегетационного периода. В основном, это обусловлено экспрессией *Lr34* в листьях, однако этот ген может функционировать и в зародышах [7].

© А.М. РАДЧЕНКО, Е.Н. ТИЩЕНКО, 2010

Краттингер и соавт. [7] выдвинули гипотезу о его разнообразных функциях в клетке. Согласно их предположению ген *Lr34* кодирует белок, который связан с мембранным транспортом, что и придает устойчивость к возбудителю бурой ржавчины. Кроме того, по данным Лабуаскье и др. [5] которые анализировали изогенные линии, не исключается возможность, что ген *Lr34* имеет отношение к хлебопекарному качеству пшеницы.

Традиционные методы определения *Lr*-генов, контролирующих устойчивость к бурой ржавчине, требуют значительных затрат времени. Что касается *Lr34*, его идентификацию затрудняет также отсутствие расспецифичности. На сегодня отдельные *Lr*-гены возможно определять с использованием молекулярных маркеров, среди которых наиболее надежными являются монокусные маркеры микросателлитных последовательностей. Ген *Lr34* был, впервые обнаружен в сорте *Frontana* в 1966 г. [5]. В настоящее время определена нуклеотидная последовательность этого гена и структура микросателлитных локусов, расположенных в его окрестностях. Установлено, что ближе всего с ним сцеплен локус *Xgwm 295* [10].

Целью данной работы был анализ аллельного состава микросателлитного локуса *Xgwm 295* сортов мягкой пшеницы и их скрининг на наличие аллелей, сцепленных с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr34*.

### Материалы и методы

Объектом исследования были сорта пшеницы украинской селекции: отечественной и зарубежной селекции: Володарка, Золотоколоса, Крыжинка, Подолянка, Фаворитка, Смуглянка, Ятрань 60, Эритроспермум 917, Ферругинеум 1239, и зарубежной селекции: *Frontana*, *Saar*, *Glenlea* (сорта получены из коллекции

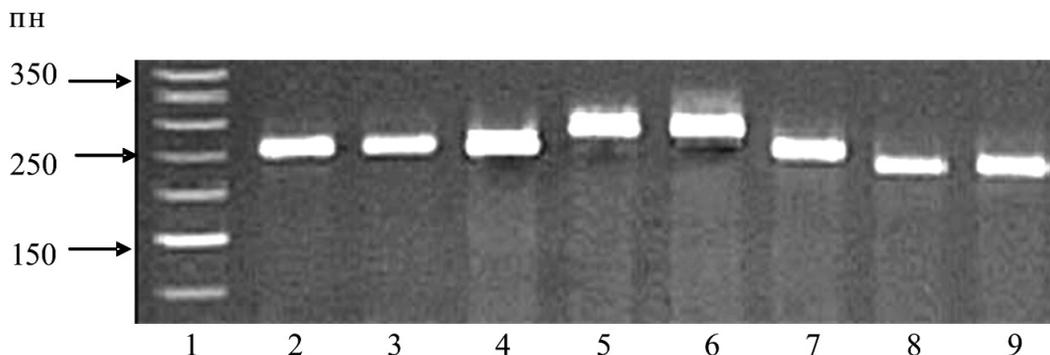
Мироновского института пшеницы имени В.М. Ремесло НААН Украины).

Экстракцию ДНК пшеницы осуществляли из одиночных зерен (случайная выборка по 10 зерен для каждого сорта) с использованием СТАБ-метода [3]. Праймеры и состав реакционной смеси соответствовали рекомендациям Родера и соавт. [9]. Амплификацию фрагментов ДНК проводили на термоциклере *Techne* (Великобритания), используя следующий режим: первая денатурация 94 °С, 2 мин.; заключительная элонгация 72 °С, 3 мин.; 30 основных циклов: денатурация при 94 °С 1 мин.; отжиг праймеров при 52 °С, 1 мин.; элонгация 72 °С, 1 мин. Продукты амплификации разделяли в 2 %-ном агарозном геле в 1xTBE-буфере (трис-боратном буфере) при напряженности 4 В/см в течение двух часов. В качестве маркера молекулярного массы использовали *pUC19/Msp 1* (*Fermentas*, Литва). Гели документировали фотографированием после окрашивания бромистым этидием. Размер аллеля определяли согласно программы *TotalLab*. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали реактивы фирмы *Fermentas* (Литва).

### Результаты и обсуждение

Анализировали 13 сортов озимой и яровой пшеницы, среди которых сорт *Frontana*, в котором впервые был идентифицирован ген *Lr34*, служил в качестве контроля. Для идентификации гена *Lr34*, был использован микросателлитный локус *Xgwm 295*, расположенный на хромосоме 7D. В качестве праймеров, фланкирующих микросателлитную последовательность, использовали нуклеотидные последовательности, рекомендованные Родером и соавт. [9].

На рис. представлены результаты SSR-анализа генома гексаплоидной пшеницы. В целом, среди проанализированных сор-



**Рисунок.** Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК сортов пшеницы в 2 %-ном агарозном геле с праймерами к гену *Lr34*: 1 – маркер молекулярной массы; 2 – Glenlea; 3 – Frontana; 4 – Подольянка; 5 – Ятрань 60; 6 – Крыжинка; 7 – Золотоколоса; 8 – Смуглянка; 9 – Володарка

**Таблица.** Идентификация гена *Lr34* в сортах пшеницы с использованием микросателлитного локуса *Xgwm 295*

| №  | Название сорта    | <i>Lr 34</i> | Размер аллеля, пн |
|----|-------------------|--------------|-------------------|
| 1  | Володарка         | –            | 240               |
| 2  | Золотоколоса      | +            | 254               |
| 3  | Крыжинка          | –            | 280               |
| 4  | Мироновская 30    | –            | 280               |
| 5  | Подольянка        | +            | 254               |
| 6  | Фаворитка         | –            | 240               |
| 7  | Смуглянка         | –            | 240               |
| 8  | Ятрань 60         | –            | 280               |
| 9  | Эритроспермум 917 | –            | 240               |
| 10 | Ферругинеум 1239  | –            | 240               |
| 11 | Frontana          | +            | 254               |
| 12 | Saar              | +            | 254               |
| 13 | Glenlea           | +            | 254               |

Примечание. "+" и "-" означают присутствие / отсутствие аллеля размером 254 пн

тов для микросателлитного локуса *Xgwm 295* было характерно наличие разных аллелей. Так, обнаружены аллели следующего размера: 240 пн, 254 пн, 280 пн. Сорта Володарка, Смуглянка, Фаворитка, Ферругинеум 1239, Эритроспермум 917 имели аллель 240 пн. Аллель 254 пн был присутсв 5-ти сортам: Золотоколоса, Подольянка,

ка, Glenlea, Frontana, Saar тогда как сорта Мироновская 30, Ятрань 60, Крыжинка содержали аллель 280 пн (табл.).

Учитывая, что сорта из мировой коллекции, заведомо содержащие ген *Lr34* и показывающие повышенный уровень устойчивости к бурой ржавчине, содержат аллель 254 пн, считается, что именно эта специфическая аллель является надёжным маркером для идентификации гена *Lr34* [3]. Поэтому, есть основание считать, что 4 сорта из 13, указанных выше, имеют ген *Lr34*, среди которых Золотоколоса и Подольянка отечественной селекции. Их целесообразно использовать в генетических программах по повышению устойчивости сортов мягкой пшеницы к патогену *Puccinia triticina*.

Результаты SSR-анализа по локусу *Xgwm 295* свидетельствуют, что помимо аллеля размером 254 пн, идентифицированного у сортов Золотоколоса, Подольянка, Glenlea, Frontana, Saar, в других сортах синтезируются ампликоны размером или 240, или 280 пн. Вариабельность аллельного состава этого локуса встречается также при исследовании мирового генофонда сортов мягкой пшеницы. Так, у 68 сортов, проанализированных Урбанович О.Ю. и соавт. [10], размер этого ал-

лея варьирует в диапазоне 240 – 258 пн, тогда как 18 сортов, например: AC Domain, Chris, Renown, Pasqua, Thatcher, Roblin, Manitou, Frontana, Мелодия, Злата, Фантазия, Поэзия, – имеют аллель размером 254 пн. Важно, что на сегменте хромосомы, который содержит ген *Lr34*, расположены также другие гены устойчивости, в частности, к стеблевой ржавчине (*Yr18*) [2, 6, 11, 12]. Этот локус на хромосоме 7D представляет практический интерес для решения обсуждаемой проблемы у мягкой пшеницы. Следует отметить, что кроме микросателлитного локуса *Xgwm 295*, тесно сцепленного с *Lr34*, на хромосоме 7D поблизости от него, хотя и дальше, находится также микросателлитный локус *Xgwm 130* [9]. Для идентификации гена *Lr34* возможно использовать STS-маркер *csLV34*. Исследуя популяцию Arina x Forno обнаружено, что с геном *Lr34* также сцеплен локус *Xbarc352* [13].

### Выводы

Таким образом, используя SSR-анализ, показано варьирование аллельного состава по локусу *Xgwm 295* ряда сортов пшеницы, среди которых аллель размером 254 пн, сцепленная с *Lr34*-геном устойчивости к бурой ржавчине, идентифицирована для сортов Glenlea, Frontana, Saar, Золотоколоса, Подолянка.

### Список литературы

1. Малышев С.В. Идентификация эффективных генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* L. бурой ржавчине с помощью STS-маркеров // Генетика. – 2006. – Т. 42, №6. – С. 812–817.
2. Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы с использованием молекулярных маркеров // Генетика. – 2006. – Т. 42, №5. – С. 675–685.
3. Dyck PL, Samborski DJ, Anderson RG. Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana // Canadian Journal of Genetics and Cytology. – 1966. – Vol. 8. – P. 665–671.
4. Kleinhofs A., Kilian A., Maroof M.A. et al. A molecular, isozyme and morphological map of the barley genome // Theor. and Appl. Genet. – 1993. – Vol. 86. – P.705–712.
5. Labuschagne M.T., Pretorius Z.A., Grobelaar B. The influence of leaf rust resistance genes *Lr29*, *Lr34*, *Lr35* and *Lr37* on breadmaking quality in wheat // Euphytica. – 2002. – Vol. 124. – P. 65–70.
6. Liu J.Q., Kolner J.A. Genetics of stem rust resistance in wheat Pasqua and Taber // Phytopathology. – 1998. – Vol. 88. – P.171–176.
7. Manninger K. Effective resistance genes as sources of resistance against Hungarian wheat rust // Czech J. Genet. Plant Breed. – 2002. – Vol. 38, №3-4. – P.153–154
8. Krattinger S.G., Lagudah E.S. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat // Science. – 2009. – Vol. 323. – P. 1360–1363.
9. Roder M.S., Korzun V., Wendehake K. et al. A microsatellite map of wheat // Genetics. – 1998. – Vol. 149. – P. 2007–2023.
10. Suenaga K., Singh R.P., Huerta-Espino I. Microsatellite markers for genes *Lr34*/*Yr 18* and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust in bread wheat // Phytopathology. – 2003. – Vol. 93. – P. 881–890.
11. Singh R.P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat // Phytopathology. – 1992. – Vol. 82. – P.835–838
12. Singh R.P. Genetic association of gene *Bdv 1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rust in bread wheat // Plant Dis. – 1993. – Vol. 77. – P. 1103–1106.
13. Schnurbusch T., Bossolini E., Messmer B. Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar forno // Phytopathology. – 2004. – Vol. 94. – P. 1036–1041.

Представлена И.О. Андреевым.  
Поступила 21.10.2010.

ВИЗНАЧЕННЯ ГЕНА СТІЙКОСТІ  
ДО БУРОЇ ІРЖІ *LR34*  
У СОРТАХ М'ЯКОЇ ПШЕНИЦІ  
З ВИКОРИСТАННЯМ  
МІКРОСАТЕЛІТНОГО МАРКЕРА

О.М.Радченко, О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України  
Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська 31/17  
e-mail: dubrovny@ukr.net

*Lr34* є одним із найефективніших генів стійкості до бурої іржі м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) – хвороби, які призводять до зниження врожайності та якості зерна. Досліджено 13 сортів пшениці на наявність гена *Lr34* за допомогою мікросателітного локусу Xgwm 295. Встановлено варіювання алельного складу цього SSR-маркера. Серед проаналізованих сортів пшениці алелі локусу Xgwm 295 мають розмір 240, 254 та 280 пн. Алель розміром 254 пн, який зчеплений з геном *Lr34*, виявлено в сортах: Золотоколоса, Подолянка, Glenlea, Saar.

Ключові слова: бура іржа, SSR-маркери, пшениця.

IDENTIFICATION OF *LR34* GENE RESISTANCE  
TO THE LEAF RUST IN WHEAT VARIANTS,  
USING MICROSATELLITING MARKER

A.N. Radchenko, E. N. Tichenko

Institute of Plant Physiology and Genetics,  
NAS of Ukraine  
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska st., 31/17  
e-mail: dubrovny@ukr.net

*Lr34* is one of high effective genes resistance of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) to leaf rust – disease, which reduce yield and quality grains. Using microsatellite locus Xgwm 295, 13 sorts of wheat to identificate the *Lr34* gene are investigated. The variation of allelic composition of this locus are shown. Locus Xgwm 295 have alleles 240, 254, 280 b. Allele of 254 b, which is coupled with *Lr34*, present in the sorts of Zolotokolosa, Podolyanka, Glenlea, Saar.

Key words: brown blight, SSR-marker, wheat.