

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕРМОПЛАЗМЫ ПШЕНИЦЫ, УСТОЙЧИВОЙ К РЖАВЧИНЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

А.М. КОХМЕТОВА, доктор биологических наук;

А.И. СЕДЛОВСКИЙ, доктор биологических наук;

Л.Н. ТЮПИНА, кандидат биологических наук; Г.Т. ЕСЕНБЕКОВА

Институт биологии и биотехнологии растений Национального центра биотехнологии Республики Казахстан, Алматы, Казахстан

### Введение

Несмотря на определенные успехи в селекции пшеницы, основной проблемой для ее возделывания являются грибные болезни, которые не только снижают урожай в годы эпифитотий до 50-70%, но и значительно ухудшают технологические и хлебопекарные качества зерна. Вредоносность ржавчины заключается в нарушении физиологических процессов, включающих снижение ассимиляционной деятельности растений, а также ухудшение зимостойкости озимых культур. Возбудители ржавчины препятствуют также образованию в зерне глютеиновых компонентов, подавляют процессы синтеза и отложения крахмала, а также протеина в эндосперме [1]. В Казахстане в последние годы значительное распространение получила бурая ржавчина *Puccinia recondita* Rob ex Desm f. *sp. tritici* Eriks., которая наносит серьезный экономический ущерб, снижая урожай и качество зерна пшеницы. Создание генетически устойчивых сортов растений является наиболее эффективным, экономически и экологически надежным методом контроля болезней. Количество эффективных Lr-генов устойчивости к возбудителю бурой листовой ржавчины с каждым годом сокращается, поэтому необходим постоянный поиск новых источников генов. Особая опасность болезни обусловлена способностью патогена к мутации и быстрой смене генераций, что ускоряет расообразовательный процесс. Использование генетических и молекулярно-генетических маркеров, сопряженных с признаком устойчивости к ржавчине, позволяет проводить направленный отбор конкретных носителей длительной устойчивости, что значительно повышает эффективность и надежность селекционных программ. С целью поиска эффективных генов устойчивости проведен скрининг и идентификация генетического материала, устойчивого к бурой ржавчине пшеницы.

### Объекты и методы исследования

Фитопатологическая оценка полевой устойчивости на естественном фоне к ржавчине пшеницы проведена по методике [2], согласно которой полевую устойчивость определяли по проценту распространения инфекции и инфекционному типу болезни (0 – иммунный, R – устойчивый, MR – умеренно устойчивый, MS – умеренно восприимчивый, S – восприимчивый). Инфекционный тип устойчивости на стадии проростков определяли по пятибальной шкале [3]. Для оценки ювенильной устойчивости к популяции и расе № 77 патогена бурой ржавчины (*Puccinia recondita* Rob ex Desm f. *sp. tritici*) изучено 38 образцов озимой мягкой пшеницы отечественной и зарубежной селекции. Фитопатологические тесты проводились на отрезках листьев проростков пшеницы, помещенных в 0,004% водный раствор бензимидазола [4]. Для идентификации молекулярных маркеров, сцепленных с генами устойчивости, использован метод BSA - Bulk Segregant Analysis [5]. Выделение ДНК из листьев проростков проведено на основе СТАБ метода [6]. Амплификация проводилась по методу [7]. Амплифицированные фрагменты ДНК разделялись в 5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле (398 mm x 338 mm x 0.4 mm). После электрофореза продукты ПЦР визуализировали путем окрашивания нитратом серебра.

### Результаты и обсуждение

Результаты фитопатологической оценки образцов пшеницы из питомника-ловушки SWARTN, включающего дифференциаторы ржавчинных болезней, показали устойчивость большинства образцов пшеницы к бурой ржавчине. Умеренный тип устойчивости 5 MR отмечен у носителя гена Lr3 и изогенной линии сорта Thatcher – TC\*6/DEMOCRAT (RL6002).

Умеренновосприимчивыми носителями (5MS-10MS) оказались гены Lr 2A (TC\*6/WEBSTER), Lr 2B (TC\*6/CARINA) и Lr 12 (EXCHANGE/6\*TC). Высокий уровень устойчивости (0-R тип) - выявлен у образцов с генами Lr1, Lr2C, Lr3KA, Lr3BG, Lr9, Lr10, Lr13, Lr14A, Lr14B, Lr15, Lr16, Lr17, Lr18, Lr19, Lr20, Lr23, Lr24, Lr25, Lr26, Lr10, Lr27+Lr31, Lr29, Lr30 и Lr32. Носители указанных Lr-генов могут быть вовлечены в скрещивания в селекции на устойчивость к бурой ржавчине.

В табл. 1 представлены результаты оценки проростков 38 образцов озимой мягкой пшеницы при заражении их расой № 77 популяции спор *Puccinia recondita*, а также данные оценки устойчивости материала к популяции патогена на стадии взрослого растения. Установлено, что при заражении образцов пшеницы расой № 77 один генотип пшеницы Г-152 характеризовался полной иммунностью (IT 0). Выявлено 22 образца с высоким уровнем ювенильной устойчивости (IT 1). Среди них сорта Купава, Бермет, Княжна, Октябрина, Алмалы, Уманка, Наири, Карлыгаш, Арап, Адир, Сапалы, Анза, Моро, BWKLDN-33, МК- 3832. Восприимчивыми к расе № 77 оказались сортообразцы Стекловидная-24 и МК-3732.

Анализ реакции проростков к популяции патогена *Puccinia recondita* показал, что 11 сортообразцов пшеницы (Купава, Бермет, Княжна, Наз, Алмалы, МК-3732, МК-3796, МК-3797, МК- 3732, МК-3750) проявили высокий уровень устойчивости к бурой ржавчине (табл. 1). Умеренноустойчивый и умеренно-восприимчивый типы реакции (IT 2-3) наблюдали у сортов Улугбек-600, Купава, Безостая-1, Октябрина и Анза. Последующий анализ устойчивости этих 38 образцов на естественном фоне к популяции патогена на стадии взрослого растения показал, что сорта Улугбек- 600 и Безостая-1, характеризовавшиеся как умеренно-устойчивые к ржавчине на стадии проростков показали высокую восприимчивость на стадии взрослого растения (30-60S). Сорт Анза, носитель APR-гена, характеризовался расоспецифической устойчивостью (IT 1), а на стадии взрослого растения отличался умеренно-восприимчивой реакцией. Сорта Бермет, Княжна, Алмалы, МК-3750, BWKLDN-33, Арап и Шарора проявили высокий уровень устойчивости.

Таблица 1

**Устойчивость образцов пшеницы к бурой ржавчине**

Наименование образца	Устойчивость к бурой ржавчине интенсивность поражения/инфекционный тип		
	Раса патогена № 77, стадия проростков	Популяция патогена, стадия проростков	Популяция, стадия взрослого растения
1	2	3	4
Купава	1	1	5MS
Бермет	1	1	0
Княжна	1	1	0
Стекловидная-24	3	4	60S
Жетысу	2	3 - 4	10MS
Улугбек-600	2	2	30S
Безостая-1	2	2 - 3	60S
Октябрина	1	2 - 3	10MS
МК-3732	3	1	20MS
Наз	2	1	10MS
Алмалы	1	1	0
Красноводопадская-25	2	3	15MS
Уманка	1	2	5MR
Наири	1	3	5R
Санзар 8	2	2	15MS

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4
Морокко	2	4	80S
Карлыгаш	1	3	5MR
МК-3796	2	1 - 2	20MS
МК-3797	2	1	5MR
МК- 3732-1	2	1	5R
МК- 3750	2	1	0
Моро	1	3	50S
Южная-12	2	1	10MR
BWKLDN-33	1	0	0
МК- 3832	1	1	20MS
Арап	1	2	0
Шарора	2	2	0
Адир	1	2	15MS
Сапалы	1	3	20MS
Анза	1	2 - 3	20MR-40MS
Таза	1	4	10MS
Прогресс	1	3	5MS
Г-152	0	2	15MS
Г-153	1	3	10MR
Г-157	1	2 - 3	20MS
5fth FAWWON-35	1	2	15MS

Известно, что ген Lr34 относится к генам с длительным развитием ржавчины, “slow rusting genes”, которые обеспечивают длительную и неспецифическую устойчивость взрослого растения. Этот эффективный ген расположен на коротком плече хромосомы 7D [8]. Проведено генетическое и фитопатологическое изучение популяции рекомбинантных инбренных линий пшеницы RILs F6 комбинаций Адир х Анза и RILs F6 Прогресс х Анза, где в качестве носителя гена Lr34 задействован сорт Анза. Результаты исследований показали, что ряд растений RILs характеризуется значениями умеренной устойчивости. По-видимому, эта устойчивость передана от сорта Анза, как носителя гена Lr34. Фенологические и фитопатологические наблюдения показали, что из изученных 113 RILs F6 комбинации Прогресс х Анза ряд линий является носителями признака «Leaf-tip necrosis» – «Некроза кончиков флаговых листьев» (Ltn), который, как известно, тесно сцеплен с геном Lr34 [8]. Скрининг сегрегирующей популяции с помощью морфологического генетического маркера Ltn позволил выявить 57 линий – потенциальных носителей Lr34.

Молекулярно-генетический анализ проведен в сегрегирующей популяции RILs F6 комбинации Прогресс х Анза с использованием ПЦР-метода. ДНК, выделенные из родительских форм и 113 линий - потомство сегрегирующей популяции RILs были протестированы с 26 парами RGAP праймеров и с тремя микросателлитными маркерами: Xgwm 130, Xgwm 295, Xgwm 1220. В табл. 2 представлены результаты идентификации устойчивых к бурой ржавчине линий популяции RILs на основе последовательного использования морфологического маркера Ltn и молекулярного маркера Xgwm 130 (табл. 2).

Таблица 2

**Характеристика линий RILs F6 Прогресс x Анза по устойчивости к бурой ржавчине и наличию маркерных генов**

Характеристика образцов и групп RILs по устойчивости к бурой ржавчине	Количество линий	Устойчивость к бурой ржавчине	Количество линий с наличием маркеров	
			Морфологический маркер Ltn	Амплифицированный фрагмент маркера Xgwm 130
Прогресс	10	40S	0	0
Анза	10	20MR-30MS	10	10
Устойчивые RILs	26	5R-10MR	0	0
Умеренно-устойчивые RILs	57	30MR-30MS	57	49
Восприимчивые RILs	30	50MS-60S	0	0

Примечание: Ltn – морфологический маркер «Leaf-tip necrosis», «Некроз кончиков флаговых листьев», сцепленный с геном устойчивости Lr34

Указанный маркер показал полиморфизм между контрастными по восприимчивости к ржавчине родительскими сортами Прогресс и Анза. Установлено, что из 57 умеренно-устойчивых линий RILs Прогресс x Анза, характеризующихся наличием гена Ltn, у 49 линий обнаружены продукты амплификации. Таким образом, для 49 линий пшеницы доказано наличие гена Lr34 с помощью комплекса генетических маркеров: морфологического маркера Ltn (Leaf Tip Necrosis) и молекулярного маркера Xgwm130. В настоящее время линии – носители эффективного гена Lr 34 испытываются на последующих этапах селекционного процесса.

#### Выводы

В результате проведенных исследований установлены особенности формирования признака устойчивости к бурой ржавчине пшеницы. Это позволило эффективно применить полученные знания для идентификации гермоплазмы пшеницы, устойчивой к бурой ржавчине. Для надежного поиска эффективных генов устойчивости разработана система бензимидазольной и ПЦР идентификации носителей генов устойчивости к бурой ржавчине пшеницы. Выделено 11 образцов пшеницы с высоким уровнем ювенильной устойчивости к бурой ржавчине. Из 57 линий RILs Прогресс x Анза, характеризующихся наличием гена Ltn, у 49 линий обнаружены продукты амплификации. Устойчивые к бурой ржавчине линии характеризовались наличием молекулярного маркера. Взаимосвязь между этими признаками была положительной и высокодостоверной:  $R^2 = 877$ . Линии-носители эффективного гена Lr 34 испытываются на последующих этапах селекционного процесса.

#### Список литературы

1. Животков Л.А., Бирюков С.В., Степаненко А.Я. Пшеница. – К.: Урожай, 1989. – 319 с.
2. McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An atlas of Resistance Genes. – Australia: CSIRO, 1995. – 121 p.
3. Chen X.M., Line R.F. Identification of stripe rust resistance genes in wheat genotypes used to differentiate North American races of *Puccinia striiformis* // Phytopathology. – 1992. – V. 82. – P. 1428-1434.
4. Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob ex Desm. // Микология и фитопатология. – 1970. – Т. 4, Вып. 3. – С. 56-63.
5. Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88. – P. 9828-9832.
6. Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in

wheat // Crop Sci. – 1996. – V. 36. – P. 905-909.

7. Chen X.M., Line R.F., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley and wheat by high resolution electrophoresis // Theor. Appl. Genet. – 1998. – V. 97. – P. 345-355.

8. Singh R.P., Huerta-Espino J., Williams M. Genetics and Breeding for durable resistance to leaf and stripe rust of wheat // Proc. 1-st Central Asia Wheat conf., Kazakhstan, 10-13 June 2003. – P. 127-132.

*Рекомендовано к печати д.б.н. Шевченко С.В.*