

УДК 631.524.86:632.4:633.111

А. А. БУЛОЙЧИК, Т. В. ДОЛМАТОВИЧ, В. С. БОРЗЯК, Е. А. ВОЛУЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНОВ
УСТОЙЧИВОСТИ *Lr26/Pm8* В СОРТООБРАЗЦАХ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ
(*TRITICUM AESTIVUM*)**

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, e-mail: A.Buloichik@igc.bas-net.by

(Поступила в редакцию 30.05.2013)

Введение. Болезни, вредители и сорняки уничтожают 25–30 % потенциального урожая сельскохозяйственных культур ежегодно, в том числе потери от болезней составляют 11,6 % [1]. В условиях Беларуси одними из вредоносных и распространенных заболеваний мягкой пшеницы являются мучнистая роса (*Blumeria graminis* DC) и бурая ржавчина (*Puccinia triticina* Erikss.).

Средства химической защиты растений от болезней малоэффективны, так как патогены способны давать несколько поколений в течение вегетационного периода растений, распространяться на значительные расстояния и адаптироваться к пестицидам. В этой связи наиболее экономически выгодным и экологически чистым способом борьбы с болезнями сельскохозяйственных культур является выведение и возделывание устойчивых сортов. Современная селекция нуждается в новых подходах и методах, позволяющих оптимизировать процесс, направленный на получение устойчивых к патогенам сортов. Одним из таких подходов является использование молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости в исходном материале и изучение эффективности этих генов в условиях Беларуси.

Цель работы – на основе молекулярных и фитопатологических методов исследования определить наличие и эффективность генов устойчивости *Lr26* и *Pm8* в сортообразцах мягкой озимой пшеницы.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись 192 сорта и селекционные линии мягкой озимой пшеницы различного географического происхождения из коллекции лаборатории генетики фитоиммунитета ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси».

ДНК выделяли из десяти индивидуальных проростков для каждого сортообразца по методу J. Plaschke et al. [2]. Концентрацию измеряли на спектрофотометре Ultraspec 3300pro (Amersham). Маркеры к генам устойчивости отбирали из литературных данных [3, 4]. Положительным контролем служили изогенные линии пшеницы и сорта, содержащие исследуемый ген. Анализ полученных фрагментов амплификации проводили в 1,5%-ном агарозном геле. В качестве маркера молекулярного веса использовали GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) и GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder Plus (Thermo Scientific).

Оценку устойчивости к патогенам проводили у 25 сортообразцов, у которых обнаружены локусы, сцепленные с генами *Lr26*, *Pm8*. Лабораторную оценку устойчивости этих образцов к клонам возбудителя бурой ржавчины проводили в камере регулируемого режима на отрезках листьев 9-дневных проростков [5]. В качестве инокулюма использовали 3 патотипа возбудителя бурой ржавчины, наиболее распространенные на территории Республики Беларусь, и клон №41, полученный из Всероссийского научно-исследовательского института растениеводства (Санкт-Петербург). Клоны патогена различались по вирулентности к изогенным линиям сорта Thatcher (Tc) и сортам, несущим известные гены устойчивости (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Характеристика по признаку вирулентности клонов возбудителя бурой ржавчины, использованных для лабораторной оценки

Шифр клона	Ген устойчивости у изогенной линии, сорта мягкой пшеницы					
	Centenario/6*Tc (<i>Lr1</i>)	Webster/6*Tc (<i>Lr2a</i>)	Tc*6/Transfer (<i>Lr9</i>)	Tc*6/Kenya W 1483 (<i>Lr15</i>)	Agent (<i>Lr24</i>)	Кавказ (<i>Lr26</i>)
2	В	В	У	В	У	В
15	У	У	У	У	В	У
39	В	В	У	У	У	У
43	У	В	У	В	В	У

П р и м е ч а н и е. У – реакция устойчивости; В – реакция восприимчивости.

Резистентность к мучнистой росе 25 сортообразцов мягкой озимой пшеницы оценивали на естественном инфекционном фоне Биологической опытной станции Института генетики и цитологии. Каждый образец был представлен делянкой длиной 0,5 м и шириной 1 м. Учитывали процент развития болезни на третьем листе сверху (фаза «начало колошения – цветение») и на флаглисте (фаза «молочно-восковая спелость») по шкале Гешеле [6]. Климатические условия 2012 г. были благоприятны для развития мучнистой росы на посевах мягкой пшеницы.

Результаты и их обсуждение. Источником генов *Lr26* и *Pm8* является рожь *Secale cereale* L. Короткое плечо хромосомы 1RS ржи, наряду с этими генами, содержит гены *Sr31* и *Yr9*, ответственные за устойчивость к стеблевой (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) и желтой ржавчине (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) соответственно, а также гены высокой урожайности и адаптивности для условий широкого географического ареала. В результате серии скрещиваний данные гены в составе транслокации 1BL/1RS были переданы в сорта и линии пшеницы *T. aestivum*. Пшенично-ржаная транслокация 1BL/1RS широко используется в селекции пшеницы во всем мире. Успешному использованию этой транслокации в коммерческих сортах способствовал длительный селекционный процесс.

Маго R. et al. [4] на основе AFLP метода разработан SCAR маркер P6M12-*P*, который позволяет детектировать ген *Lr26* в геноме пшеницы. С помощью этого маркера у образцов, имеющих ген *Lr26*, выявляются фрагменты амплификации 260 и 360 п.н. (рис. 1). ПЦР-анализ 192 образцов мягкой озимой пшеницы показал наличие данных продуктов амплификации у 25 образцов (табл. 2).

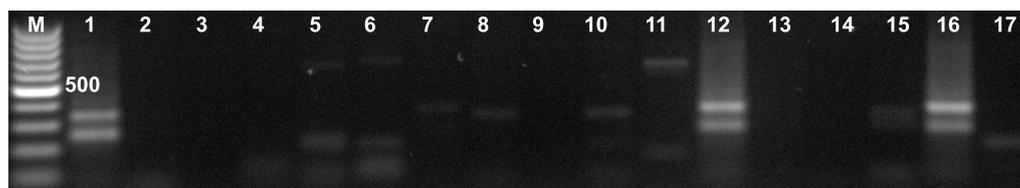


Рис. 1. Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации с праймером P6M12-*P*: М– маркер молекулярного веса (100bp DNA Ladder Plus (Fermentas); № 1–17 – сорта мягкой пшеницы (1 – яровой сорт Agent; 2–17 – озимые сорта: 2 – Amigo; 3 – Apollo; 4 – Aquila; 5 – Archamp; 6 – Aristide; 7 – Ark; 8 – Arthur 71; 9 – Atlas 66; 10 – Atou; 11 – Auburn; 12 – Benno; 13 – Bersee; 14 – Bert; 15 – Blueboy II; 16 – Bounty; 17 – Bouquet). При наличии гена *Lr26* амплифицируются фрагменты длиной 260 и 360 п.н.

С помощью STS маркера IAG95–1,2 [3] проведен молекулярный скрининг выделенных 25 сортообразцов мягкой озимой пшеницы на наличие гена устойчивости к мучнистой росе *Pm8*. В результате реакции амплификации при наличии этого гена синтезируется фрагмент длиной 1050 п.н. Показано, что все сортообразцы, имеющие маркерный локус к гену *Lr26*, несут и ген *Pm8* в составе транслокации 1BL.1RS (рис. 2).

Таким образом, с помощью молекулярных маркеров, сцепленных с генами *Lr26* и *Pm8*, показано, что 25 из 192 проанализированных сортообразцов содержат транслокацию 1BL.1RS. Это согласуется с литературными данными для большинства из них: Agra, Benno, Burgas–2, Sebeco 97,

Т а б л и ц а 2. Идентификация генов устойчивости к грибным патогенам в сортообразцах озимой мягкой пшеницы и оценка их эффективности

Наименование сортообразца	Номер по каталогу ВНИИР	Наличие / отсутствие (+/-) маркера Р6М12-Р к гену <i>Lr26</i>	Наличие / отсутствие (+/-) маркера IAG95-1,2 к гену <i>Pm8</i>	Тип устойчивости при заражении клоном бурой ржавчины				Развитие мучнистой росы в поле (БОС, 2012 г.), % [6]	
				2	15	39	43	третий лист сверху	флаг-лист
Agra	К-57251	+	+	4	0	0	0	10	10
Benno	К-50589	+	+	4	4	4	4	25	0–5
Bounty	К-56372	+	+	4	0	4	0	10	5
Burgas-2	К-53540	+	+	4	0	0	0	40	15
Buster	К-63911	+	+	4	0	0	0	15	5–10
Cebeco 97	К-50593	+	+	4	0	0	0	15–25	10
Delos	К-57290	+	+	4	0	0	0	10	5
Disponent	К-57217	+	+	4	0	0	0	10–15	5–10
Encore	К-63897	+	+	4	0	0	0	0–5	0–5
Hohenthurmer 6921/68	К-50620	+	+	4	0	0	0	40	15
Hornet	К-60100	+	+	4	0	0	0	15	10–15
Knirps	К-61476	+	+	4	4	0	4	15	5
Kronjuwel	К-57615	+	+	4	0	0	0	10–15	5
Lynx	К-63919	+	+	4	0	0	0	10	0–5
Perseus	К-55907	+	+	4	0	0	0	25	15
Salzmunder Bartweizen	К-43700	+	+	4	0	0	0	10–15	10
Selekta	К-56911	+	+	4	0	0	0	10	5
Sida	К-63883	+	+	4	0	0	1	10	0–5
Slejpner	К-59748	+	+	4	0	0	0	15	0–5
SO 5255	К-56912	+	+	4	0	0	0	10	5
Sutjeska	К-56311	+	+	4	0	0	0	10	0–5
Weihenstephan 625/65	К-55350	+	+	4	0	0	0	25	10–15
Zodiac	К-63922	+	+	4	0	0	0	25	10–15
Алтимир 67	К-56278	+	+	4	0	0	0	15–25	15–25
Кавказ	К-45564	+	+	4	0	0	0	25	10

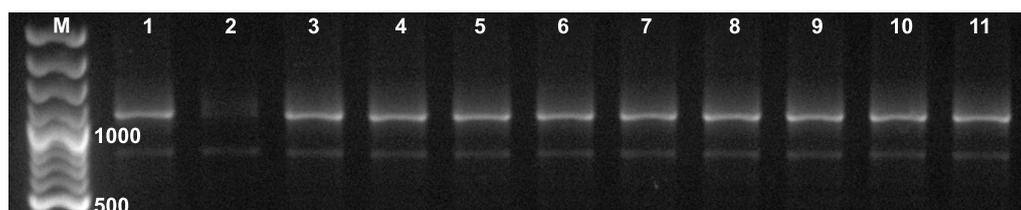


Рис. 2. Результаты разделения методом электрофореза продуктов амплификации с праймером IAG95–1,2: М – маркер молекулярного веса (100bp Plus DNA Ladder (Fermentas)); лунка 1 – сорт мягкой пшеницы Кавказ (положительный контроль гена *Pm8*); 2 – сорт Thatcher (отрицательный контроль); озимые сорта и линии: 3 – Agra; 4 – Burgas-2; 5 – Buster; 6 – Cebeco 97; 7 – Delos; 8 – Disponent; 9 – Encore; 10 – Hohenthurmer 6921/68; 11 – Hornet. При наличии гена *Pm8* амплифицируется фрагмент длиной 1050 п.н.

Disponent, Encore, Hornet, Knirps, Kronjuwel, Lynx, Perseus, Salzmunder Bartweizen, Selekta, Sida, Slejpner, Sutjeska, Weihenstephan 625/65, Zodiac, Алтимир 67 [7]. Для сортообразцов Bounty, Buster, Delos, Hohenthurmer 6921/68, SO 5255 наличие транслокации было обнаружено впервые.

Лабораторная оценка устойчивости выделенных 25 образцов мягкой озимой пшеницы к разновирulentным клонам возбудителя бурой ржавчины (фитотест) не выявила гена *Lr26* в сортах Benno и Knirps, что может быть связано с отсутствием экспрессии данного гена. Для остальных

исследованных сортообразцов наблюдалось соответствие молекулярно–генетической и фитопатологической оценки, что подтверждает наличие и экспрессию данного гена. Оценка полевой устойчивости этих сортообразцов пшеницы к мучнистой росе показала, что большинство из них достаточно высоко поражается болезнью (10 % и более) (табл. 2). Следовательно, эффективность гена устойчивости *Pm8* к белорусской популяции мучнистой росы невелика. Только сорт Епсоге проявил устойчивость к патогену, вероятно, за счет дополнительных факторов, влияющих на резистентность.

Комплекс генов устойчивости, идентифицированный в 25 сортах и селекционных линиях мягкой озимой пшеницы, представляет значительный интерес для селекции в Республике Беларусь. Так, присутствующий в этом комплексе ген устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr26* является эффективным к распространенной в Беларуси популяции гриба. По данным А.А.Булойчика с соавт. [8], процент вирулентных клонов к гену *Lr26* составлял 3,3 % в субпопуляции патогена в Минском районе (коллекционный питомник ИГЦ) и 20,96 % в субпопуляции в Пуховичском районе (селекционный материал, э/б «Зазерье»).

Заключение. Комплекс генов устойчивости *Lr26/Pm8* выявлен в 25 сортообразцах мягкой озимой пшеницы, являющихся носителями пшенично-ржаной транслокации 1BL.1RS. Указанная транслокация перспективна для использования в селекции мягкой пшеницы в Республике Беларусь, а выявленные сорта представляют интерес в качестве доноров устойчивости.

Литература

1. Жученко А. А. Стратегия адаптивной интенсификации сельского хозяйства (концепция). Пушино, 1994.
2. Plaschke J., Börner A., Xie D. X. et al. // Theor. Appl. Genet. 1993. Vol. 85, N 8. P. 1049–1054.
3. Mohler V., Hsam S. L. K., Zeller F. J., Wenzel G. // Plant Breeding. 2001. Vol. 120. P. 448–450.
4. Mago R., Miah H., Lawrence G. J. et al. // Theoretical and Applied Genetics. 2005. Vol. 112, N 1. P. 41–50.
5. Волуевич Е. А., Булойчик А. А., Палилова А. Н. // Генетика. 1995. Т. 31, № 1. С. 72–80.
6. Гешеле Э. Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. М., 1978.
7. Genetic Resources Information System for Wheat and Triticale: <http://wheatpedigree.net>.
8. Булойчик А. А., Борзяк В. С., Волуевич Е. А. // Молекулярная и прикладная генетика: Сб. науч. тр. Мн., 2010. Т. 11. С. 69–74.

A. A. BULOICHIK, T. V. DOLMATOVICH, V. S. BORZYAK, E. A. VOLUEVITCH

MOLECULAR IDENTIFICATION AND EFFECTIVENESS RESISTANCE GENES *LR26/PM8* IN ACCESSIONS COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM*)

Summary

Using molecular markers identified of resistance genes *Lr26* and *Pm8* in 25 winter common wheat varieties that carry wheat – rye translocation 1BL.1RS, which is of great interest for breeding in the Republic of Belarus.