

АНАЛИЗ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО ГЕНАМ УСТОЙЧИВОСТИ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ С ПОМОЩЬЮ ПЦР-МАРКЕРОВ

© 2019 г. П. Ю. Крупин^{1,2,*}, И. В. Груздев¹, М. Г. Дивашук^{1,2}, М. С. Баженов^{1,2},
А. А. Кочешкова², А. Г. Черноок^{1,2}, М. В. Дудников¹, Г. И. Карлов^{1,2}, А. А. Соловьев^{1,3}

¹Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

²Центр молекулярной биотехнологии, Российский государственный аграрный университет—
МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127550 Россия

³Главный ботанический сад им. Н.В. Цицина Российской академии наук, Москва, 127276 Россия

*e-mail: pavel-krupin@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.12.2018 г.

После доработки 10.03.2019 г.

Принята к публикации 19.03.2019 г.

Приведены результаты анализа коллекции образцов яровой тритикале на наличие генов устойчивости к возбудителю листовой (бурой) ржавчины пшеницы (*Puccinia triticina* Erikss.) *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ДНК-маркеров и контрольных образцов изогенных линий пшеницы, несущих искомый ген. Показано отсутствие положительной амплификации у всех изученных образцов яровой тритикале при использовании ДНК-маркеров на гены устойчивости *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47*. Показано, что образцы Лена 1270, 25АД20, к-1763, к-3256, Арта 59 несут аллель маркера Xgwm251, совпадающего по размеру с аллелем у изогенной линии Thatcher по гену *Lr25*. ПЦР-анализ с использованием маркера LgAg показал, что образцы тритикале Памяти Мережко, Ульяна, V20-140, S17, ПРАГ 554/1, C95, 08871, RIL-130 R22-2, 172-1-16, C250, 08857, 09228, 131/17, A2-16-11, POPW9, ПРАГ 500, C260, Арта 116/2, ПРАГ 554, AVS19883, к-1220, ПРАГ 553/1, C254, ПРАГ 518, ПРАГ 418, R-7-5 RIL202, L2413, Л8-6 несут фрагмент, близкий по размеру к фрагменту, характерному для положительного контроля — изогенной линии сорта Thatcher по гену *Lr19*. Таким образом, нами установлено, что генетический фонд яровой тритикале крайне обеднен генами устойчивости к листовой ржавчине. Необходимы активные работы по интрогрессии новых генов устойчивости как из известных линий-доноров тритикале, так и из мягкой пшеницы.

Ключевые слова: тритикале, листовая ржавчина, *Lr*-гены, ПЦР маркеры, устойчивость.

DOI: 10.1134/S0016675819080083

Тритикале — зерновая культура, созданная человеком в результате скрещивания пшеницы и ржи с целью объединения в одном организме лучших признаков от родительских видов. Новые сорта переводят эту культуру из разряда перспективной в одну из наиболее востребованных зерновых культур. В 2016 г. мировые посевные площади тритикале составили 4.16 млн га, а мировое производство зерна — 15.2 млн т [1]. Производство зерна тритикале в мире стабильно растет в последние 20 лет, причем 50%-ный рост наблюдался за последнее десятилетие. Тритикале выращивают главным образом в Польше, Германии, Франции, Белоруссии и России как зернофуражную и кормовую укосную культуру [2].

В начале периода промышленного возделывания тритикале болезни существенно не снижали

ее урожай. Однако при увеличении площадей посевов и распространении в производстве сортов с ограниченным набором генов устойчивости в популяции патогена происходит интенсивный отбор в пользу редких или мутантных вирулентных аллелей. Это приводит к возникновению вирулентных рас патогена и преодолению устойчивости растения. Одним из наиболее актуальных заболеваний тритикале является листовая ржавчина пшеницы, вызываемая патогеном *Puccinia triticina* Erikss. [3]. В полевых условиях на этих двух культурах паразитирует одна и та же популяция патогена [4].

Листовая ржавчина — одно из серьезных заболеваний пшеницы, ущерб от которой может достигать 50% [5]. Защита урожая с использованием фунгицидов повышает стоимость конечной про-

дукции и нагрузку на окружающую среду и, кроме того, эффективна только при своевременном применении. Альтернативным путем является создание генетически устойчивых форм.

Будучи аллополиплоидом, тритикале сочетает в себе гены устойчивости к листовой ржавчине пшеницы и ржи и, следовательно, обладает большим разнообразием ответных и защитных реакций. На сегодняшний день имеются сведения о 75 генах устойчивости к листовой ржавчине [6], из которых гены *Lr25*, *Lr26* и *Lr45* были интрогрессированы в пшеницу из генома ржи [7]. Многие *Lr*-гены к настоящему моменту утратили свою эффективность [8, 9]. В связи с этим в селекции тритикале кроме генетического пула пшеницы и ржи также используются гены близкородственных видов, таких как *Triticum toposocum* [10], *Aegilops tauschii* [11].

Исследования показали, что различные сорта и линии тритикале существенно различаются по устойчивости к листовой ржавчине [12–15]. Интрогрессирование и комбинирование эффективных *Lr*-генов разного видового происхождения и разного механизма устойчивости позволит создать сорта тритикале, обладающие длительной устойчивостью к листовой ржавчине.

Эффективно вести отбор устойчивых форм помогает использование молекулярных ДНК-маркеров на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их применение позволяет осуществлять скрининг коллекций сортов и линий на наличие доноров *Lr*-генов и направленно переносить гены устойчивости в другие сорта, создавать комбинации разных генов устойчивости в пределах одного генотипа, что приведет к сокращению объемов селекционного материала и повышению эффективности селекции [16].

Цель нашей работы заключалась в скрининге коллекции яровой тритикале на наличие генов устойчивости к листовой ржавчине с использованием ПЦР-маркеров. Для анализа были выбраны гены устойчивости к листовой ржавчине, которые в разные годы и разных эколого-географических нишах Российской Федерации сохраняли свою эффективность: *Lr9*, *Lr12*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* [8, 9, 17–21]. Кроме того, для анализа был выбран ген *Lr19* как один из наиболее распространенных и по-прежнему эффективных в большинстве условий ген устойчивости [22], а также ген *Lr25* ржаного происхождения [23].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. В работе изучены 179 образцов яровой тритикале. Коллекция состояла из сортов яровой тритикале, включенных в Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию, сортов зарубеж-

ной селекции, коллекционных образцов, хранящихся во ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова” (ВИР), а также селекционных образцов из коллекции кафедры генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства (КГБСиС) РГАУ–МСХА имени К.А. Тимирязева (табл. 1). В качестве контролей были использованы почти изогенные линии пшеницы, несущие гены устойчивости к листовой ржавчине *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* (любезно предоставлены Всероссийским институтом фитопатологии, Отдел микологии и иммунитета, и ФГБНУ “НЦЗ имени П.П. Лукьяненко”, Отдел селекции и семеноводства пшеницы и тритикале).

Выделение ДНК. Семена проращивали в чашках Петри в течение 3–5 сут при температуре 25°C. ДНК выделяли из проростков длиной 5–10 см по методике с использованием СТАВ с модификациями [24]. Проростки измельчали вручную в 450 мкл разогретого до 65°C 2× СТАВ-буфера, растворенного в 450 мкл дистиллированной воды. Пробирки с измельченным растительным материалом перемешивали переворачиванием, затем держали на водяной бане при 65°C в течение 1.5–2 ч, периодически перемешивая содержимое покачиванием. К охлажденной до комнатной температуры смеси добавляли хлороформ–изоамил в соотношении 24 : 1, перемешивали переворачиванием в течение 15 мин и фракционировали в центрифуге в течение 15 мин при 12 000 об./мин. Надосадочную жидкость отбирали в чистую пробирку и добавляли эквивалентный объем охлажденного изопропанола, после чего перемешивали и повторно центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 15 мин. Жидкость сливали, в пробирку добавляли 100 мкл 70%-ного этанола, центрифугировали при 12 000 об./мин, спирт сливали, пробирку высушивали. Далее в пробирку добавляли 100 мкл дистиллированной воды и хранили в виде раствора при 4°C.

ПЦР-анализ. На основе данных, опубликованных в научной литературе, нами были отобраны наиболее эффективные гены устойчивости к листовой и стеблевой ржавчине, локализованные в хромосомах субгеномов пшеницы А и В, так как объектом исследования служила гексаплоидная тритикале с геномным составом AABBRR, и на которые разработаны эффективные ПЦР-маркеры: SCS5₅₅₀ на ген *Lr9* [25], SSR-маркер Xgwm251 на гены *Lr12* [26] и *Lr25* [27], LrAg на ген *Lr19* [28], S1302₆₀₉ на ген *Lr24* [29], SCS421₅₇₀ на ген *Lr28* [30], OPY10 на ген *Lr29* [31], PS10 на ген *Lr47* [32]. ПЦР проводили в амплификаторе C1000 Thermal Cycler в пробирках объемом 25 мкл. Каждая ПЦР-смесь объемом 25 мкл содержала 0.5 мкл раствора ДНК с концентрацией 50–300 нг, 0.5 мкл каждого

Таблица 1. Образцы коллекции яровой тритикале и их географическое происхождение

№ п.п.	Название	Происхождение	№ п.п.	Название	Происхождение	№ п.п.	Название	Происхождение
1	Rosner 612	США	61	Мексика 24	Россия	121	С 230	Россия, КГБСиС
2	09017	Россия, КГБСиС*	62	V10286	Россия, КГБСиС	122	08857	»
3	PI 520484	Россия	63	V2-0-140	»	123	к-3256	Россия
4	Т 327	Мексика	64	Соловей харьковский	Украина	124	9228	Россия, КГБСиС
5	25AД20	Россия	65	V17-5-49	Россия, КГБСиС	125	131/17	»
6	Мексика 13	»	66	08574	»	126	A2-16-11	»
7	С 78	Россия, КГБСиС	67	Sandro	Швейцария	127	PI 429151	Швейцария
8	Лена 1270	»	68	PI 429162	»	128	PI 422260	Россия, КГБСиС
9	Gabo	Польша	69	Л 2412	Россия, КГБСиС	129	Мексика 38	Россия
10	PI 587531	Россия	70	Гребешок	Россия	130	Л 13	Россия, КГБСиС
11	С 247	Россия, КГБСиС	71	PI 587548	»	131	RI9-1144	»
12	V8-2-100	»	72	к-1767	Белоруссия	132	Л 8120	»
13	Т 328	Мексика	73	ПРАГ 552	Россия	133	32-2-4	»
14	Wanad	Польша	74	S 17	Россия, КГБСиС	134	08880	»
15	к-1185	Мексика	75	Grego	Польша	135	П13-5-2	»
16	Хлебодар украинский	Украина	76	ПРАГ 554/1	Россия	136	С 85	»
17	Т 348	Мексика	77	Л 15	Россия, КГБСиС	137	к-1200	Испания
18	Памяти Мережко	Россия	78	С 191	»	138	AVS 20675	Австралия
19	С 97	Россия, КГБСиС	79	V8-1-101	»	139	к-1715	Украина
20	Activo	Швейцария	80	PI 429153	Швейцария	140	PI 520445	Россия
21	PI 587279	Россия	81	Арта 59	Россия, КГБСиС	141	AVS 20909	Австралия
22	131/7188	Россия, КГБСиС	82	PI 428904	Россия	142	Т 328	Мексика
23	С 242	»	83	131/121	Россия, КГБСиС	143	Л 8-4	Россия, КГБСиС
24	Presto//Tesmo	Польша	84	С 253	»	144	Л 8-6	»
25	ПРАГ 553 (20)	Россия	85	093302	»	145	Rorw 9	Польша
26	Abaco	Швейцария	86	08833	»	146	8514	Россия, КГБСиС
27	Иволга	Россия, КГБСиС	87	32-10-6	»	147	ПРАГ 500	Россия
28	Ульяна	Белоруссия	88	П13-5-3	»	148	Ярило	»
29	Л 26	Россия, КГБСиС	89	С 232	»	149	131/1621	Россия, КГБСиС
30	П2-16-20	»	90	R11-1138	»	150	09305	»
31	ПРАГ 551	Россия	91	С 95	»	151	Л 8666	»
32	Л 8-3	Россия, КГБСиС	92	R20-5-138	»	152	С 245	»

Таблица 1. Окончание

№ п.п.	Название	Происхождение	№ п.п.	Название	Происхождение	№ п.п.	Название	Происхождение
33	к-1716	Украина	93	08871	»	153	С 260	»
34	PI 429031	Мексика	94	Л 1348	»	154	PI 429160	Швейцария
35	PI 559373	США	95	08821	»	155	Арта 116/2	Россия, КГБСиС
36	V20-239	Россия, КГБСиС	96	Л 2430	»	156	V17-150	»
37	ПРАГ 500/1	Россия	97	ПРАГ 553 (3)	Россия	157	Белорусский	Белоруссия
38	Л 8645	Россия, КГБСиС	98	AVS 20979	Австралия	158	к-1068	Эфиопия
39	С 169	»	99	к-1922	Украина	159	ПРАГ 554	Россия
40	ПРАГ 553 (5)	Россия	100	Л13-5-13	Россия, КГБСиС	160	Кармен	»
41	ПРАГ 559 (6)	»	101	Лана	Белоруссия	161	AVS 19883	Австралия
42	к-3253	»	102	PI 429251	Россия	162	С 198	Россия, КГБСиС
43	32-16-2	Россия, КГБСиС	103	Л 12	Россия, КГБСиС	163	С 17	»
44	AVS 90614	Австралия	104	Л 2471	»	164	к-1220	Испания
45	S 1702	Россия	105	Л 8112	»	165	С 224	Россия, КГБСиС
46	131/114	Россия, КГБСиС	106	RIL-130 R22-2	»	166	ПРАГ 553/1	Россия
47	Т 323	Мексика	107	к- 1433	Эфиопия	167	С 254	Россия, КГБСиС
48	AVS 19885	Австралия	108	PI 495820	Россия	168	С 236	»
49	PI 429157	Швеция	109	к-1752	Белоруссия	169	ПРАГ 518	Россия
50	08221	Россия, КГБСиС	110	к-1763	»	170	09020	Россия, КГБСиС
51	П13-5-1	»	111	08888	Россия, КГБСиС	171	Л 22	»
52	ПРАО-1	Россия	112	8-35-5	»	172	ПРАГ 418	Россия
53	PI 429082	Польша	113	09306	»	173	131/7	Россия, КГБСиС
54	ПРАГ 553/2	Россия	114	PI 448835	США	174	Мексика 51	Россия
55	Мексика 55	»	115	Dubblat	Польша	175	Л 24	Россия, КГБСиС
56	С 259	Россия, КГБСиС	116	172-1-16	Россия, КГБСиС	176	6-35-5	»
57	RIL205 R7-2	»	117	9304	»	177	PI 429158	Швейцария
58	Legalo	Польша	118	С 250	»	178	Л 2413	Россия, КГБСиС
59	Л 8665	Россия, КГБСиС	119	PI 429159	Швейцария	179	R-7-5 RIL202	»
60	9308	»	120	С 188	Россия, КГБСиС			

* КГБСиС – кафедра генетики, биотехнологии, селекции и семеноводства РГАУ–МСХА им. К.А. Тимирязева.

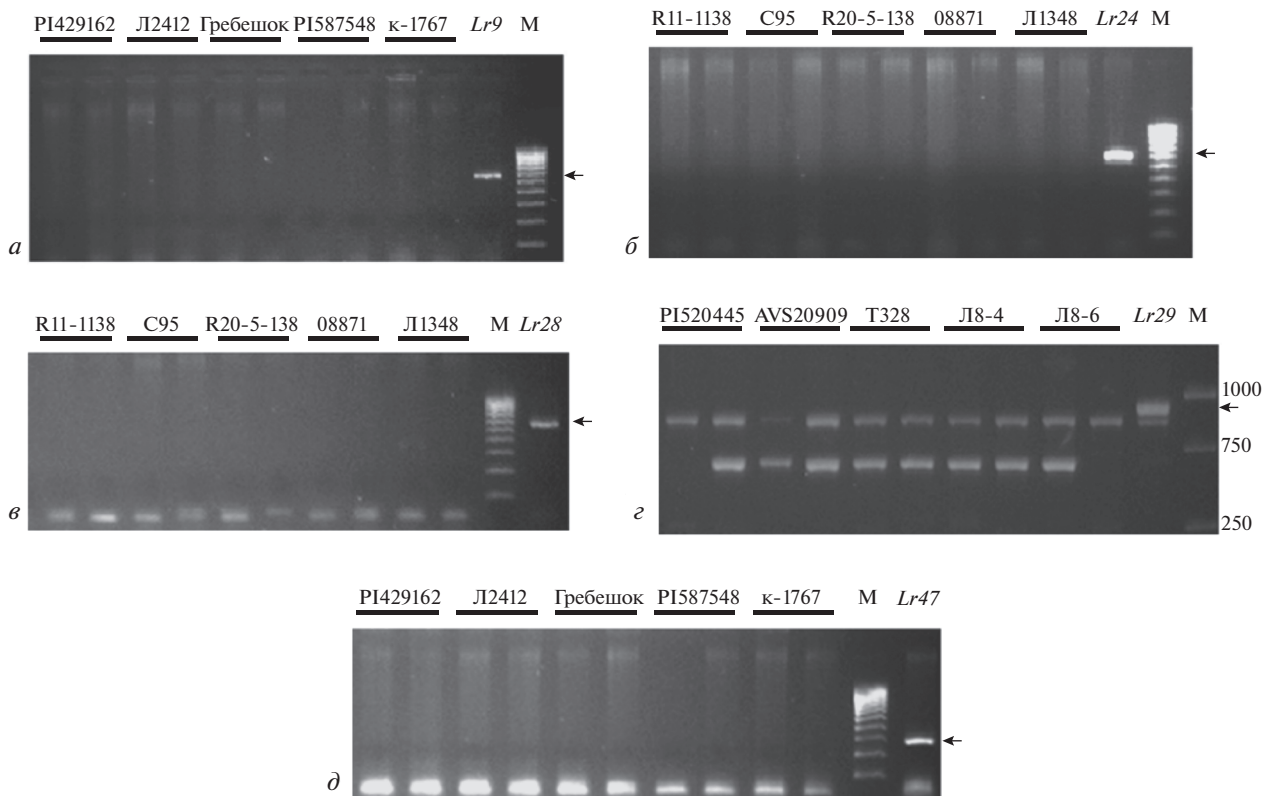


Рис. 1. Пример результатов электрофоретического разделения ампликонов маркеров в 1.5%-ном агарозном геле на гены устойчивости к листовой ржавчине (в скобках указан размер целевого бэнда). *a* – SCS5₅₅₀ на ген *Lr9* (550 пн); *б* – S1302₆₀₉ на ген *Lr24* (609 пн); *в* – SCS421₅₇₀ на ген *Lr28* (570 пн); *г* – OPY10 на ген *Lr29* (950 пн); *д* – PS10 на ген *Lr47* (282 пн). Дорожки *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* – почти изогенные линии Thatcher с соответствующими генами устойчивости *Lr* (положительный контроль). М – маркер молекулярных размеров Gene Ruler 100bp DNA Ladder (*a*, *б*, *в*, *д*) и Gene Ruler 1kbp DNA Ladder (*г*). Стрелкой указаны целевые фрагменты.

праймера (10 нг/мкл), 200 мкмоль каждого dNTP, 2.5 ммоль MgCl₂, 2.5 мкл Taq-буфера и 0.5 U Taq-полимеразы. Использованные молекулярные маркеры и условия амплификации указаны в табл. 2. Аликвоты ПЦР-продуктов, полученных с помощью маркеров SCS5₅₅₀, LrAg, S1302₆₀₉, SCS421₅₇₀, OPY10, PS10, объемом 3.5–10 мкл анализировали путем электрофореза на 1.5%-ном агарозном геле в 0.5× TBE-буфере. Размеры бэндов устанавливали с помощью маркера молекулярного размера Gene Ruler 100bp DNA Ladder и Gene Ruler 1kbp DNA Ladder (Fermentas, Латвия). Размер продуктов амплификации, полученных с использованием SSR (simple sequence repeat) маркера Xgwm251, определяли фрагментным анализом на приборе AB3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) в соответствии с рекомендациями производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Определение генов устойчивости методом ПЦР

В работе была проанализирована коллекция яровой тритикале на наличие генов устойчивости

к листовой ржавчине (*Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47*) с использованием ПЦР-маркеров (табл. 2).

При использовании молекулярных маркеров SCS5₅₅₀ на ген *Lr9* (рис. 1, *a*), S1302₆₀₉ на ген *Lr24* (рис. 1, *б*), SCS421₅₇₀ на ген *Lr28* (рис. 1, *в*), OPY10 на ген *Lr29* (рис. 1, *г*), PS10 на ген *Lr47* (рис. 1, *д*) ни у одного из изучаемых образцов яровой тритикале не был обнаружен целевой фрагмент, показывающий наличие гена устойчивости. Вместе с тем фрагменты ожидаемого размера амплифицировались в каждом случае на соответствующем положительном контроле (изогенные стрелки Thatcher по генам устойчивости, указаны стрелками), что свидетельствует о корректности работы использованных нами молекулярных маркеров.

Для определения наличия генов *Lr12* и *Lr25* нами был использован микросателлитный маркер Xgwm251, по литературным данным сцепленный с этими генами. Продукты амплификации анализировали путем фрагментного анализа, в качестве контроля использовали изогенные линии Thatcher по генам *Lr12* и *Lr25*. В результате проведения фрагментного анализа ни у одного из

Таблица 2. Характеристика ПЦР-маркеров на гены устойчивости к листовой ржавчине

Маркер	Ген	Донор	Последовательность нуклеотидов праймеров	Условия амплификации	Авторы маркера
SCS5 ₅₅₀	<i>Lr9</i>	<i>Ae. umbellulata</i> 6BL	F: 5' TGC GCC CTT CAA AGG AAG 3' R: 5' TGC GCC CTT CTG AAC TGT 3'	2 мин 95°C, 30 циклов (1 мин 94°C, 1 мин 64°C, 1 мин 72°C) 7 мин 72°C	Gupta et al., 2005 [25]
Xgwm251	<i>Lr12</i>	<i>T. aestivum</i>	F: 5' CAACTGGTTGCTACAAAGCA 3' R: 5' GGGATGTCTGTTCCATCTTAG 3'	3 мин 94°C; 45 циклов (1 мин 94°C, 1 мин 55°C, 2 мин, 72°C), 10 мин 72°C	Singh, Bowden, 2011 [26]
	<i>Lr25</i>	<i>S. cereale</i>			Singh et al., 2012 [27]
LrAg	<i>Lr19</i>	<i>Th. ponticum</i>	f4: 5' CAG CTA CGT GCA TCC CTT TCT T 3' r1: 5' AGC TCC TTG TGA CTG AAA TGA ATG 3' r5: 5' GGA GGT ACC TTT GCC CAC TC A 3'	15 мин 95°C, 35 циклов (40 с 94°C, 40 с 63.5°C, 40 с 72°C), 5 мин 72°C	Gennaro et al., 2009 [28]
S1302 ₆₀₉	<i>Lr24</i>	<i>Th. ponticum</i>	F: 5' CGC AGG TTC CAA ATA CTT TTC 3' R: 5' CGC AGG TTC TAC CTA ATG CAA 3'	2 мин 95°C, 35 циклов (1 мин 94°C, 1 мин 60°C, 1 мин 72°C), 7 мин 72°C	Gupta et al., 2006 [29]
SCS421 ₅₇₀	<i>Lr28</i>	<i>Ae. speltooides</i>	F: 5' ACA AGG TAA GTC TCC AAC CA 3' R: 5' AGT CGA CCG AGA TTT TAA CC 3'	2 мин 95°C, 40 циклов (1 мин 94°C, 1 мин 68°C, 1 мин 72°C), 7 мин 72°C	Cherukuri et al., 2005 [30]
OPY10	<i>Lr29</i>	<i>Th. ponticum</i>	F: 5' GTG ACC TCA GGC AAT GCA 3' R: 5' GTG ACC TCA GAA CCG ATG 3'	3 мин 94°C, 35 циклов (30 с 94°C, 30 с 59°C, 1 мин 30 с 72°C) 10 мин 72°C	Tar et al., 2002 [31]
PS10	<i>Lr47</i>	<i>Ae. speltooides</i>	F: 5' GCT GAT GAC CCT GAC CGG T 3' R: 5' TCT TCA TGC CCG GTC GGG T 3'	4 мин 95°C, 7 циклов (1 мин 94°C, 1 мин от 70 до 64°C, 1 мин 72°C), 35 циклов (1 мин 94°C, 1 мин 63°C, 1 мин 72°C), 7 мин 72°C	Helguera et al., 2000 [32]

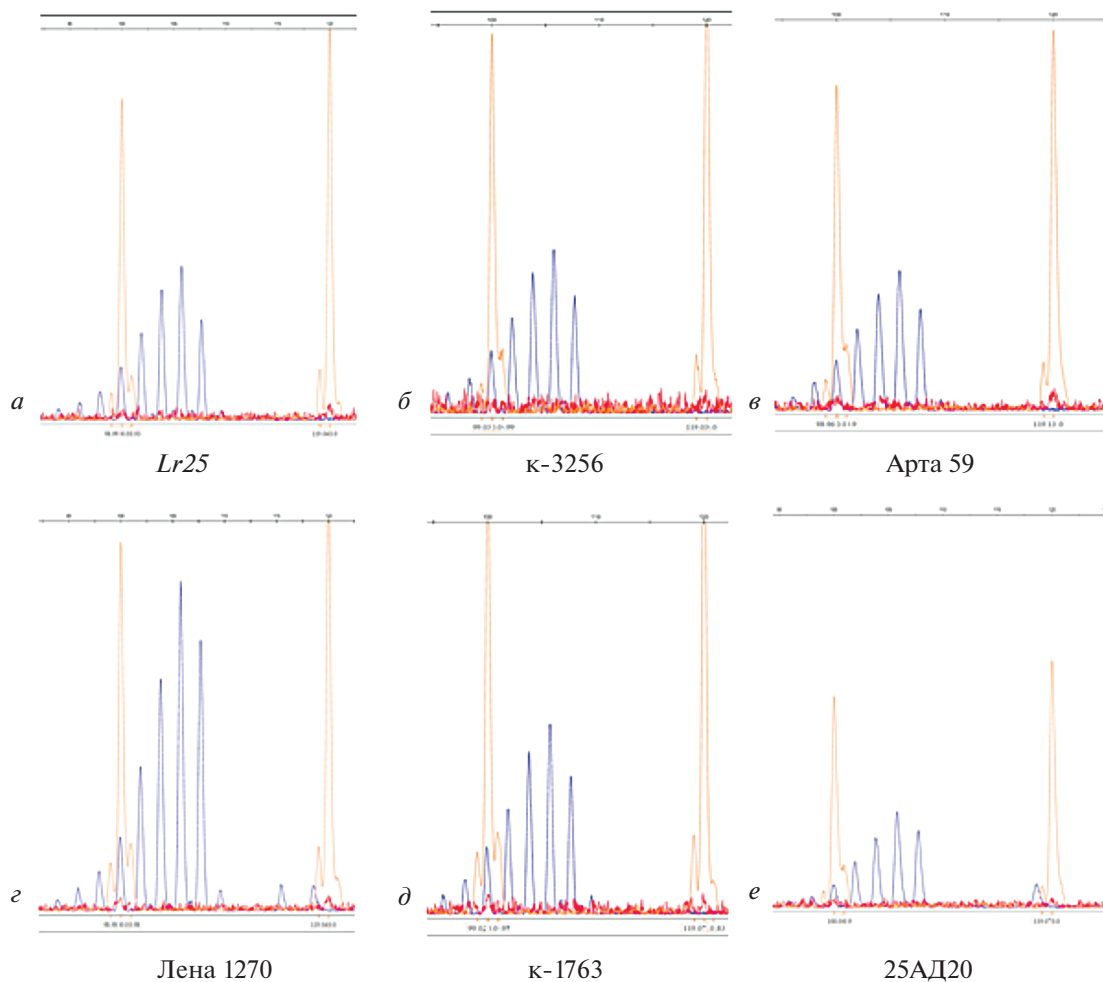


Рис. 2. Пример результатов фрагментного анализа с использованием микросателлитного маркера Xgwm251 на наличие гена *Lr25*. *а* — положительный контроль, изогенная линия Thatcher по гену *Lr25*; *б–е* — образцы яровой тритикале, показавшие фрагменты, совпадающие по размеру с положительным контролем. Желтым цветом обозначен маркер размеров (100 и 120 пн); синим цветом обозначен фрагмент, амплифицируемый при использовании маркера Xgwm251.

изучаемых образцов коллекции яровой тритикале не был выявлен амплифицируемый фрагмент, совпадающий по размеру с фрагментом, амплифицируемым на изогенной линии Thatcher *Lr12*. В пяти образцах (Лена 1270, 25АД20, к-1763, к-3256 и Арта 59) выявлен фрагмент, полностью совпадающий по размеру (108 пн) с фрагментом, амплифицируемым на изогенной линии Thatcher *Lr25* (рис. 2).

В результате проведенного ПЦР-анализа с использованием молекулярного маркера LrAg [28] установлено, что фрагмент, близкий по размеру к фрагменту 811 пн, характерному для положительного контроля — изогенной линии сорта Thatcher по гену *Lr19*, — имеют следующие 28 образцов: Памяти Мережко, Ульяна, V20-140, S17, ПРАГ 554/1, C95, 08871, RIL-130 R22-2, 172-1-16, C250, 08857, 09228, 131/17, A2-16-11, POPW9, ПРАГ 500, C260, Арта 116/2, ПРАГ 554, AVS19883, к-1220,

ПРАГ 553/1, C254, ПРАГ 518, ПРАГ 418, R-7-5 RIL202, L2413, Л8-6. Гетерогенность по маркеру LrAg продемонстрировали 14 образцов: ПРАГ 553 (20), S1702, 08221, C259, C191, PI448835, 08880, PI520445, 131/1621, V-17-150, AVS19883, C224, L22, 131/7. Пример амплификации такого фрагмента представлен на рис. 3, *а*, целевой фрагмент размером около 811 пн указан стрелкой: образцы C260, Арта 116/2 несут фрагмент, близкий к целевому, в двух исследуемых растениях, образец V-17-150 не несет фрагмент, близкий к целевому, в одном из двух исследуемых растений, в образце C245 целевой фрагмент отсутствует; целевой фрагмент виден на контрольном образце (обозначен *Lr19*). При этом по размеру бэнды, выявляемый у образцов тритикале, обладал несколько большей молекулярной массой, чем у положительного контроля всех перечисленных образцов, за исключением образца C250. Он показал фрагмент, наиболее близкий к контрольному образцу — почти изогенной ли-

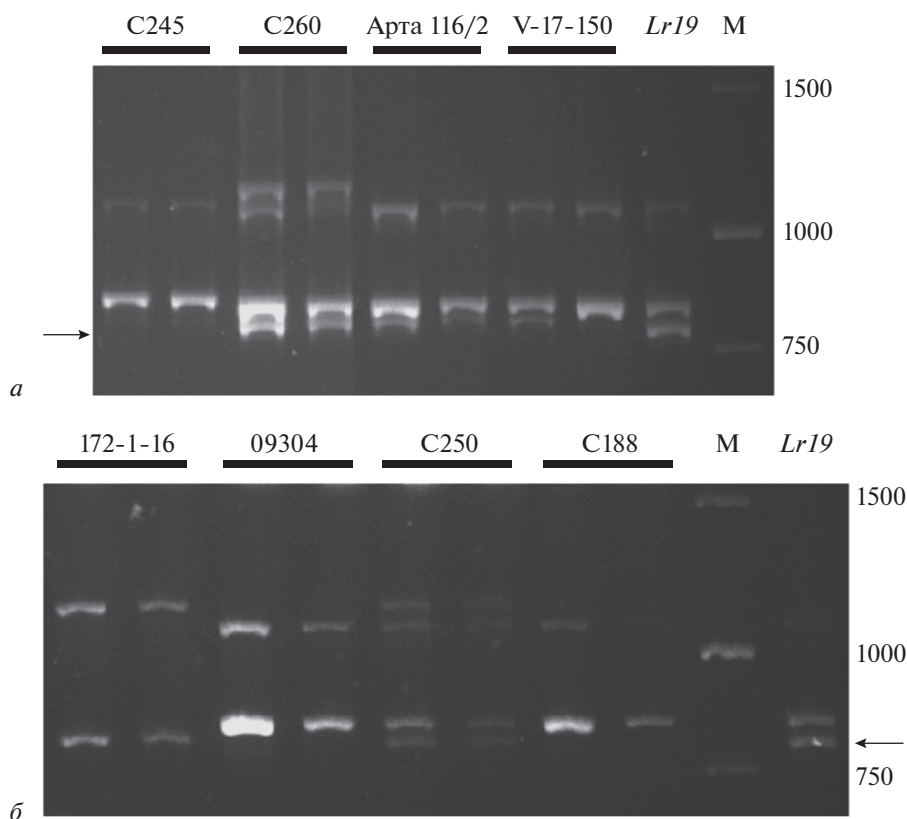


Рис. 3. Пример результатов электрофоретического разделения ампликонов маркера LrAg на ген *Lr19* в 1.5%-ном агарозном геле. *a* – C245, C260, Арта 116/2, V-17-150; *б* – 172-1-16, 09304, C250, C188. *Lr19* – изогенная линия Thatcher по гену *Lr19* (положительный контроль). М – маркер молекулярных размеров Gene Ruler 1kbp DNA Ladder. Стрелкой указаны целевые фрагменты.

нии Thatcher по гену *Lr19* (показан на рис. 3,б; образец 172-1-16 несет фрагмент, близкий к целевому, у образцов 09304 и C188 искомый бэнд отсутствует).

ОБСУЖДЕНИЕ

При интерпретации результатов ПЦР-анализа, проведенного с целью поиска генов устойчивости в коллекции сортов, важно понимать, что не все ПЦР-маркеры разработаны непосредственно на саму последовательность гена устойчивости. Так, среди генов устойчивости к листовая ржавчина известны последовательности генов или их кандидатов для *Lr10*, *Lr19*, *Lr34* [25, 28, 33]. В большинстве случаев ПЦР-маркеры сцеплены с теми или иными генами и их применение возможно только в том случае, если в качестве донора используется непосредственно тот сорт, на котором был разработан сцепленный с геном ПЦР-маркер.

У проанализированной коллекции яровой тритикале у всех 179 образцов показано отсутствие генов *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47*.

Lr12 – ген пшеничного происхождения, локализованный в длинном плече хромосомы 4В [26, 34]. Нами в результате фрагментного анализа не

выявлены образцы яровой тритикале, несущие аллель, амплифицируемый у изогенной линии Thatcher по гену *Lr12*. По всей видимости, образцы с данным геном устойчивости не попадали в селекционную программу ярового тритикале.

Ген *Lr25* был передан в мягкую пшеницу линии Transec через транслокацию хромосомы 2R *Secale cereale* сорта Rosen и располагается в хромосоме 4В [23]. По данным Зубова [18] и Волковой [9], ген сохраняет свою эффективность, однако в работе Моториной [8] были выявлены вирулентные расы. Singh et al. [27] картировали микросателлитный маркер Xgwm251 на участок 4BL-хромосомы пшеницы, сцепленный с геном *Lr25* на расстоянии 3.8 cM, используя почти изогенную линию пшеницы сорта Thatcher по гену *Lr25*. SSR-маркер Xgwm251 предназначен для использования в селекции мягкой пшеницы и выявляет фрагмент хроматина (интрогрессию) от ржи сорта Rosen, несущего ген *Lr25*, в генетическом окружении пшеницы. Однако существуют другие сорта ржи, обладающие данным микросателлитным аллелем, но не несущим ген *Lr25*. Поэтому в случае применения маркера Xgwm251 для скрининга коллекции тритикале на наличие гена *Lr25* мы

можем говорить лишь о вероятном нахождении гена устойчивости *Lr25* (или его аналога) в геноме тритикале. В нашем исследовании показано, что образцы Лена 1270, 25АД20, к-1763, к-3256 и Арта 59 несут аллель (108 пн), по размеру совпадающий с аллелем, амплифицирующимся на изогенной линии Thatcher по гену *Lr25*.

Ген *Lr19* был перенесен от *Thinopyrum ponticum* в хромосомы пшеницы гомеологичной группы 7. Ген *Lr19* в течение длительного времени считался одним из самых надежных и получил большое распространение. Однако, по сообщениям Моториной [8] и Зубова [18], выявлены вирулентные расы, соответственно в Белгородской и Самарской областях, преодолевающие эту устойчивость. Gennaro et al. [28] создали кодоминантный STS-маркер LrAg на последовательность гена-кандидата *Lr19*. Он был выбран для идентификации гена *Lr19* в изучаемой коллекции, так как создан непосредственно на последовательность гена-кандидата, а не просто сцеплен с геном или служит маркером на фрагмент интрогрессированного от *Thinopyrum ponticum* хроматина.

При использовании маркера LrAg на ДНК ржи нами был выявлен ампликон, близкий к целевому, следовательно, данный фрагмент у тритикале может амплифицироваться как с генома ржи, так и быть следствием интрогрессии гена *Lr19* в геном тритикале со стороны родительской формы пшеницы, несущей этот ген. Поскольку данный маркер разработан на ген-кандидат устойчивости *Lr19*, то выявляемый у тритикале фрагмент также может амплифицироваться с гена устойчивости (или его кандидата). Среди образцов, несущих этот маркер, представлены как сорта (Ульяна и Памяти Мережко), так и селекционные линии РГАУ—МСХА им. К.А. Тимирязева. Полученные данные в целом согласуются с результатами изучения полевой устойчивости ряда образцов исследуемой коллекции яровой тритикале [35] и могут быть использованы в поиске новых генов устойчивости к листовой ржавчине ржаного происхождения.

Среди изученных 179 образцов яровой тритикале с помощью набора молекулярных маркеров найдены образцы, потенциально несущие некоторые гены устойчивости к возбудителю бурой ржавчины: *Lr19* (42 образца) и *Lr25* (5 образцов), и не выявлено ни одного носителя генов *Lr9*, *Lr12*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47*, которые, по различным источникам, также являются высокоэффективными в создании сортов, устойчивых к бурой листовой ржавчине. Выделенные образцы могут нести гены устойчивости к листовой ржавчине, но только фитопатологические тесты и наблюдения могут показать, можно ли их использовать в селекционном процессе на устойчивость к бурой ржавчине. В исследуемой коллекции присутству-

ют образцы, обладающие как вертикальной, так и горизонтальной иммунной реакцией в полевых и лабораторных условиях [15, 35].

Несмотря на большое генетическое и фенотипическое разнообразие тритикале, необходимо дополнительно интрогрессировать в геном тритикале гены устойчивости из пшеницы, ржи и их диких сородичей. В первую очередь для переноса генов устойчивости к бурой ржавчине следует использовать *T. aestivum*, имеющую D-геном, в хромосомах которого могут быть локализованы такие эффективные гены, как *Lr24*, *Lr34*, *Lr39*, *Lr43* [36–39]. Кроме того, необходимо использовать гены устойчивости ржи к возбудителю листовой ржавчины *Puccinia dispersa* Erikss. et Henning (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *secalis*) *Pr1–Pr5* [40, 41]. Такой перенос хотя и сопряжен с рядом трудностей, позволит обогатить генофонд тритикале, что ввиду ограниченного набора возделываемых сортов (особенно яровой тритикале) [42] позволит в дальнейшем избежать эпифитотий и замедлить процесс расообразования у *Puccinia triticina* Erikss.

Авторы хотели бы выразить признательность рецензенту, ценные и справедливые замечания которого позволили, на наш взгляд, значительно улучшить качество статьи.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ № 16-16-00097.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Available at <http://faostat.fao.org/>
2. Mergoum M., Singh P.K., Peña R.J. et al. Triticale: A “New” Crop with Old Challenges // Cereals. N.Y.: Springer, 2009. P. 267–287. https://doi.org/10.1007/978-0-387-72297-9_9
3. Singh R.P., Saari E.E. Biotic stresses in triticale // Proc. 2nd Int. Triticale Symp. Mexico, 1990. P. 171–177.
4. Михайлова Л.А., Мережко А.Ф., Фунтикова Е.Ю. Разнообразие тритикале по устойчивости к бурой ржавчине // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. 2009. № 5. С. 27–29.
5. Roelfs A.P. Evidence for two populations of wheat stem and leaf rust in the USA // Plant Dis. Reports. 1974. V. 32. P. 806–809.
6. Singla J., Luthi L., Wicker T. et al. Characterization of *Lr75*: A partial, broad-spectrum leaf rust resistance gene in wheat // Theor. Appl. Genet. 2017. V. 130. P. 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2784-1>

7. Kolmer J.A. Leaf rust of wheat: Pathogen biology, variation and host resistance. Review // *Forests*. 2013. V. 4. P. 70–84.
<https://doi.org/10.3390/f4010070>
8. Моторина И.П. Генетические основы устойчивости к бурой ржавчине форм мягкой пшеницы от отдаленных скрещиваний: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Белгород, 2006.
9. Волкова Г.В. Научно обоснованные принципы создания и использования устойчивых к вредоносным болезням сортов пшеницы для стабилизации фитосанитарного состояния агроценозов на юге России. 2013 // *Научн. журн. КубГАУ*. 2013. № 91(7). С. 1–22.
10. Sodikiewicz W., Strzembicka A. Application of *Triticum monococcum* for the improvement of triticale resistance to leaf rust (*Puccinia triticina*) // *Plant Breeding*. 2004. V. 123. P. 39–42.
<https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2003.00949.x>
11. Kwiatek M., Majka M., Wiśniewska H. et al. Effective transfer of chromosomes carrying leaf rust resistance genes from *Aegilops tauschii* Coss. into hexaploid triticale ($\times$ *Triticosecale* Witt.) using *Ae. tauschii* $\times$ *Secale cereale* amphiploid forms // *J. Appl. Genet.* 2015. V. 56(2). P. 1–6.
<https://doi.org/10.1007/s13353-014-0264-3>
12. Тырышкин Л.Г., Курбанова П.М., Куркиев К.У. и др. Эффективная ювенильная устойчивость гексаплоидного тритикале к бурой ржавчине // *Защита и карантин растений*. 2008. № 10. С. 25.
13. Majka M., Serfling A., Czembor P. et al. Resistance of (*Aegilops tauschii* $\times$ *Secale cereale*) $\times$ *Triticosecale* hybrids to leaf rust (*Puccinia triticina*) determined on the macroscopic and microscopic level // *Front. Plant Sci.* 2018. V. 9. P. 1–13.
14. Hanzalová A., Bartoš P. Resistance of Triticale to wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) // *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2011. V. 47(1). P. 10–16.
<https://doi.org/10.17221/100/2010-cjgpb>
15. Сидоров А.В., Тырышкин Л.Г., Соловьев А.А. Ювенильная устойчивость образцов тритикале современной селекции к листовой ржавчине // *Вестн. студенческого научн. о-ва*. 2014. № 1. С. 86–87.
16. Давоян Э.Р., Беспалова Л.А., Давоян Р.О. и др. Использование молекулярных маркеров в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко // *Вавилов. журн. генетики и селекции*. 2014. Т. 18(4/1). С. 732–738.
17. Курбанова П.М. Генетическое разнообразие яровой мягкой пшеницы по эффективной возрастной устойчивости к листовой ржавчине: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2009.
18. Зубов Д.Е. Селекционная ценность доноров устойчивости яровой мягкой пшеницы к листовой ржавчине в Среднем Поволжье: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Кинель: Самарская гос. с.-х. акад., 2011.
19. Плотникова Л.Я., Штубей Т.Ю. Эффективность генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr22b*, *Lr34*, *Lr37* в Западной Сибири и цитофизиологическая основа их действия // *Вавилов. журн. генетики и селекции*. 2012. Т. 16(1). С. 123–131.
20. Сочалова Л.П., Лихенко И.Е. Изучение устойчивости пшеницы к листовым патогенам в условиях Западной Сибири // *Сиб. вестн. с.-х. науки*. 2011. № 1. С. 18–25.
21. Шаманин В.П., Гуляева Е.И., Шайдаюк Е.Л. и др. Вирулентность гриба *Puccinia triticina* на сортах и селекционных линиях мягкой пшеницы на опытном поле ОмГАУ в 2013 г. // *Вестн. Алтайск. гос. аграр. ун-та*. 2014. Т. 6 (116). С. 36–42.
22. Тырышкин Л.Г. Генетический контроль эффективной ювенильной устойчивости коллекционных образцов пшеницы *Triticum aestivum* L. к бурой ржавчине // *Генетика*. 2006. Т. 42. № 3. С. 377–384.
23. Driscoll C.J., Anderson L.M. Cytogenetic studies of Transec – a wheat-rye translocation line // *Can. J. Genet. Cytol.* 1967. V. 9. P. 375–380.
<https://doi.org/10.1139/g67-038>
24. Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA // *Nucl. Acids Res.* 1980. V. 8. P. 4321–4325.
<https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
25. Gupta S.K., Charpe A., Koul S. et al. Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-assisted selection in bread wheat // *Genome*. 2005. V. 48. P. 823–830.
<https://doi.org/10.1139/g05-051>
26. Singh S., Bowden R.L. Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene *Lr12* in bread wheat // *Mol. Breeding*. 2011. V. 28(2). P. 137–142.
<https://doi.org/10.1007/s11032-010-9467-4>
27. Singh A., Pallavi J.K., Gupta P., Prabhu K.V. Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene *Lr25* in wheat // *J. Appl. Genet.* 2012. V. 53. P. 19–25.
<https://doi.org/10.1007/s13353-011-0070-0>
28. Gennaro A., Koeber R.M.B., Ceoloni C. A candidate for *Lr19*, an exotic gene conditioning leaf rust resistance in wheat // *Functional and Integrative Genomic*. 2009. V. 9. P. 325–334.
<https://doi.org/10.1007/s10142-009-0115-1>
29. Gupta S.K., Charpe A., Koul S. et al. Development and validation of SCAR markers co-segregating with an *Agropyron elongatum* derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat // *Euphytica*. 2006. V. 150(1–2). P. 233–240.
<https://doi.org/10.1007/s10681-006-9113-8>
30. Cherukuri D.P., Gupta S.K., Charpe A. et al. Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat // *Euphytica*. 2005. V. 143. P. 19–26.
<https://doi.org/10.1007/s10681-005-1680-6>
31. Tar M., Purnhauser L., Csösz L. et al. Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene (*Lr29*) in wheat // *Acta Biol. Szegediensis*. 2002. V. 46(3–4). P. 133–134.
32. Helguera M., Khan I.A., Dubcovsky J. Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47* // *Theor. Appl. Genet.* 2000. V. 101. P. 625–631.
<https://doi.org/10.1007/s001220051524>

33. Dakouri A., McCallum B.D., Walichnowski A.Z., Cloutier S. Fine-mapping of the leaf rust *Lr34* locus in *Triticum aestivum* L. and characterization of large germplasm collections support the ABC transporter as essential for gene function // *Theor. Appl. Genet.* 2010. V. 121. P. 373–384.
<https://doi.org/10.1007/s00122-010-1316-7>
34. Singh D., Park R.F., McIntosh R.A. Genetic relationship between the adult plant resistance gene *Lr12* and the complementary gene *Lr31* for seedling resistance to leaf rust in common wheat // *Plant Pathol.* 1999. V. 48(5). P. 567–573.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00391.x>
35. Груздев И.В., Захарова Е.В., Большакова Л.С., Соловьев А.А. Оценка образцов яровой тритикале (*×Triticosecale* Wittm.) по устойчивости к бурой ржавчине (*Puccinia triticina* Erikss.) в полевых условиях Московской области // *Изв. ТСХА.* 2017. № 3. С. 5–18.
36. Autrique E., Singh R., Tanksley S.D., Sorrells M.E. Molecular markers for fourleaf rust resistance genes introgressed into wheat from wild relatives // *Genome.* 1995. V. 38. P. 75–83.
<https://doi.org/10.1139/g95-009>
37. Hussein T., Bowden R.L., Gill B.S., Cox T.S. Chromosome location of leaf rust resistance gene *Lr43* from *Aegilops tauschii* in common wheat // *Crop Sci.* 1997. V. 37(6). P. 1764–1766.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183x003700060016x>
38. Nelson J.C., Singh R.P., Autrique J.E., Sorrells M.E. Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat // *Crop Sci.* 1997. V. 37. P. 1928–1935.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1997.0011183x003700060043x>
39. Raupp W.J., Sukhwinder-Singh G.L., Brown-Guedira G.L., Gill B.S. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat // *Theor. Appl. Genet.* 2001. V. 102. P. 347–352.
<https://doi.org/10.1007/s001220051652>
40. Wehling P., Linz A., Hackauf B. et al. Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2* // *Theor. Appl. Genet.* 2003. V. 107. P. 432–438.
<https://doi.org/10.1007/s00122-003-1263-7>
41. Roux S.R., Hackauf B., Linz A. et al. Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 2. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr3*, *Pr4* and *Pr5* // *Theor. Appl. Genet.* 2004. V. 110. P. 192–201.
<https://doi.org/10.1007/s00122-004-1807-5>
42. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию (на 20 февраля 2018 г.). Режим доступа: <http://reestr.gossort.com/reestr/culture/10>.

Analysis of the Collection of Spring Triticale for Leaf Rust Resistance Genes Using PCR Markers

P. Yu. Kroupin^{a, b, *}, I. V. Gruzdev^a, M. G. Divashuk^{a, b}, M. S. Bazhenov^{a, b},
A. A. Kocheshkova^b, A. G. Chernook^{a, b}, M. V. Dudnikov^a, G. I. Karlov^{a, b}, and A. A. Soloviev^{a, c}

^aAll-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

^bCentre for Molecular Biotechnology, Russian Timiryazev State Agrarian University, Moscow, 127550 Russia

^cTsitsin Main Botanical Garden of Russian Academy of Sciences, Moscow, 127276 Russia

*e-mail: pavel-krupin@yandex.ru

The present study demonstrates the results of the PCR analysis of the collection of spring triticale accessions for the presence of *Lr9*, *Lr12*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* genes conferring resistance to wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) using molecular markers and near isogenic lines carrying target genes as a positive control. No positive amplification of DNA markers for genes *Lr9*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr47* was shown in all samples of the studied collection of spring triticale. Accessions Lena 1270, 25AD20, k-1763, k-3256, Arta 59 were shown to carry the Xgwm251 allele linked to the *Lr25* gene. The PCR analysis using the LrAg marker showed that Pamyati Merezkhko, Ulyana, V20-140, S17, PRAG554/1, C95, 08871, RIL-130 R22-2, 172-1-16, C250, 08857, 09228, 131/17, A2-16-11, POPW9, PRAG500, S260, Arta116/2, PRAG-554, AVS19883, k1220, PRAG553/1, S254, PRAG518, PRAG418, R-7-5 RIL202, L2413, L8-6 carry a fragment close in size to the positive control fragment, near isogenic Thatcher line with *Lr19*. Thus, we have shown that the genetic pool of spring triticale is extremely depleted in leaf rust resistance genes. Active breeding work is required on the introgression of new resistance genes, both from the known donor lines of triticale and from bread wheat.

Keywords: triticale, leaf rust, *Lr*-genes, PCR markers, resistance.