

**Таблица 1** - Прорастание семян томата после обработки культуральной жидкостью фосфатмобилизующих бактерий

№ п/п	Вариант	Степень прорастания, %	Средняя длина проростка, мм	Средняя длина корешка, мм	Средняя общая длина, мм
1	Контроль	90	17,4±7,0	21,1±6,0	36,6±12,1
2	шт. Т 9	90	29,2±3,5	14,0±4,2	43,2±5,9
3	шт. Т 13	100	21,3±6,6	32,5±8,0	53,7±12,8
4	шт. Л 6	100	28,8±8,0	21,2±7,6	50,0±14,7
5	шт. А 4	80	24,3±6,9	12,9±3,1	32,1±8,7
6	шт. П 2	100	29,4±5,4	13,2±3,6	43,2±8,6
7	шт. П 3	90	27,0±4,9	25,6±5,5	47,3±9,2
8	шт. К 2	80	20,0±4,0	16,4±2,3	36,4±3,5

**Таблица 2** - Прорастание семян редиса

№ п/п	Вариант	Степень прорастания, %	Средняя длина проростка, мм	Средняя длина корешка, мм	Средняя общая длина, мм
1	Контроль	80	7,1±2,7	14,0±5,8	21,1±7,4
2	шт. Т 9	90	12,0±4,8	10,7±5,7	22,7±9,5
3	шт. Т 13	100	13,5±7,0	16,3±7,2	29,8±12,6
4	шт. Л 6	100	13,2±7,1	22,5±7,8	35,7±14,0
5	шт. А 4	70	9,0±3,2	11,4±7,7	20,4±10,5
6	шт. П 2	90	13,1±2,8	28,1±8,5	41,4±8,3
7	шт. П 3	100	16,0±6,0	27,4±7,3	43,3±12,5
8	шт. К 2	70	9,2±2,8	9,3±2,5	18,7±4,3

В результате проведенного эксперимента выявлено, что наибольшая степень прорастания и общая длина проростка, в сравнении с контролем, наблюдается при инокуляции семян редиса и томата следующими штаммами – Т 13, Л 6, П 2, П 3 и Т 9. Таким образом, при обработке семян бактериальной биомассой фосфатмобилизующих бактерий происходит повышение всхожести семян и отмечается стимуляция роста корней и проростков практически во всех вариантах опыта. В результате для дальнейших исследований было отобрано 5 штаммов бактерий, которые будут идентифицированы для установления видовой принадлежности.

#### Литература

- 1 Дятлова К.Д. Микробные препараты в растениеводстве // Соровский образовательный журнал. – 2001. – Т.7. - № 5. – С.17-22.
- 2 Forster I. Verbesserte Nährstoffversorgung der Kulturpflanzen durch mikrobielle Phosphormobilisierung // Wiss. Beitr. M. Luther Univ. Yfile-Wittenberg. S. – 1989. - № 70(1). – P. 159-162.
- 3 Streeter J. G. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules // Plant Cell Environ. – 2003. – V. 26. - № 8. – P. 1199-1204.
- 4 Страна И. Г. Общее семеноведение полевых культур. - М.: Колос, 1966. – 464 с.
- 5 Schroth M.N., Hancock J.G. Disease – suppressive soil and root-colonizing bacteria // Science. – 1982. – V.216. – P. 1376-1381.

УДК 577.2

А.А. Токубаева\*, К.К. Шулембаева

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

\*e-mail: anar.tokubaeva@mail.ru

#### Изучение генов устойчивости к бурой ржавчине с помощью молекулярных маркеров у мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.)

С помощью молекулярных SCAR и STS-маркеров Iag95, Lr28, csLV34, Sr39, VENTRIUP-LN2, WMS382 проведен скрининг сортообразцов и линий местной селекции на устойчивость к бурой ржавчине по генам *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* и *Lr50*. У 9 сортообразцов и диких видов - *T. timopheevii* и *T. kiharae* по специфическим продуктам амплификации ДНК было обнаружено наличие гена *Lr26*. У 19 сортообразцов, в том числе и линий имели ген *Lr34*, ген *Lr35* был выявлен только у дикого вида *Ae. kotschyii*, а ген *Lr37* был обнаружен в

Вестник КазНУ. Серия биологическая. №3/1(59). 2013

интрогрессивной линии л-344 и у диких видов *Ae. ventricosa*, *T. timopheevii*, *T. kiharae*. Ген *Lr50* был обнаружен у 21 из изучаемых 50 образцов пшеницы.

**Ключевые слова:** бурая ржавчина, SCAR, STS, маркеры, устойчивость, ген, ДНК, пшеница.

A.A. Tokubayeva, K.K. Shulembaeva

#### Study of the leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using molecular markers

With assistance of molecular markers SCAR and STS – *Iag95*, *Lr28*, *csLV34*, *Sr39*, *VENTRIUP-LN2*, *WMS382*, the screening of *Triticum aestivum* L. specimens was carried to leaf rust resistance genes *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* and *Lr50*. Amplified PCR products of 9 specimens and wild species - *T. timopheevii*, *T. kiharae* have indicated the presence of *Lr26* gene, 19 specimens – *Lr34* gene, in wild species *Ae. kotschyi* – *Lr35* gene, in introgressive line l-344 and wild species *Ae. ventricosa*, *T. timopheevii*, *T. kiharae* – *Lr37* gene. Gene *Lr50* have indicated in 9 specimens of wheat.

**Keywords:** leaf rust, SCAR, STS markers, resistance, gene, DNA, wheat.

A.A. Токубаева, К.К. Шулембаева

#### Молекулалық маркерлер арқылы жұмсақ бидайда (*Triticum aestivum* L.) қоңыр татқа төзімді гендерін зерттеу

Алғаш рет SCAR және STS молекулалық маркерлерді *Iag95*, *Lr28*, *csLV34*, *Sr39*, *VENTRIUP-LN2*, *WMS382* қолдану арқылы жергілікті селекция сортүлгілеріне және линияларға қоңыр тат ауруына төзімді *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* және *Lr50* гендеріне скрининг жүргізілді. ДНК амплификациясы нәтижесінде түзілген өнім бойынша 9 сортүлгіде және жабайы түрлерде - *T. timopheevii*, *T. kiharae* *Lr26* гені анықталды. 19 сортүлгі мен линияларда *Lr34* гені, *Lr35* гені жабайы түр – *Ae. kotschyi*, *Lr37* гені интрогрессивті линия л-344 пен жабайы түрлер – *Ae. ventricosa*, *T. timopheevii*, *T. kiharae* идентификацияланды. Зерттеліп отырған 50 сортүлгілерінің 21 үлгісінде *Lr50* гені табылды.

**Түйін сөздер:** қоңыр тат ауруы, SCAR, STS маркерлер, төзімділік, ген, ДНК, бидай.

Использование эффективных генов устойчивости в селекции мягкой пшеницы – один из наиболее экономически безопасных методов борьбы с болезнями. К настоящему времени описано более 58 *Lr*-генов, локализованных на разных хромосомах пшеницы. Часть из них была обнаружена непосредственно в геноме *Triticum aestivum* L. [1]. *Lr*-гены различаются по степени эффективности: от малоэффективных до высокоэффективных. Соответственно и сорта пшеницы будут варировать по устойчивости к заболеванию в зависимости от того, какие *Lr*-гены в них присутствуют. Традиционные методы выявления вирулентных генов трудоемки и требует больших затрат времени. Развитие ДНК-технологий значительно ускорило определение устойчивых *Lr*-генов пшеницы и дало возможность перейти к массовой оценке генетического материала. По данным MAS (Marker assisted selection), используемый для повышения глобального производства сельскохозяйственных культур и для улучшения генома растений новый подход, основанный на молекулярно маркерной технологии, является ценным инструментом в отборе сортов по хозяйственно ценным признакам. Селекция с помощью маркеров облегчает отбор устойчивых сортов, основываясь на тесной связи между маркерными аллелями и геном, отвечающим за качественные или количественные признаки, благодаря точной передаче участков хромосомы, несущий интересующий ген [2]. По данным исследования CIMMYT (International Maize and Wheat Improvement Center) показано, что сочетание 4-5 генов устойчивости приводит к высокому уровню вирулентности, равной с иммунитетом [3].

В данной статье обсуждаются результаты работы, проведенные с помощью молекулярных маркеров для идентификации генов *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* и *Lr50* у местных сортов пшеницы и коллекции мировой селекции.

Исследование было проведено в лаборатории молекулярной генетики Института общей генетики и цитологии РК.

#### Материалы и методы

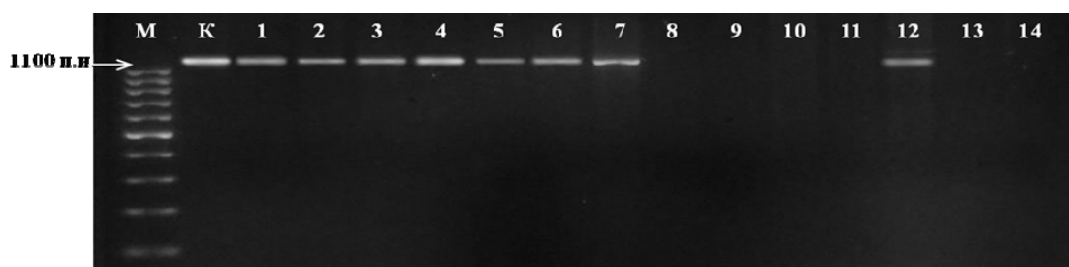
Объектом исследования служили 41 сортообразцов местной селекции мягкой пшеницы различного происхождения: к-24/20989, К-4, Богарная 52, Кондитерская, Нуреке, Ажар, л-344, л-345, МК 3677, 16/20978, К-88, Казахстанская 126, Clement, Compare, Надежда, Алмалы, Алия, Кокбидай, Lemhi, Moro, Rie Besel 47/51, Безостая 1, Одесская 120, Фараби 159, Ания, Майра, Юбилейная 75, Tres, Lee, Stephens, Имунная, Казахстанская 3, СИМ 79/279, Стекловидная, к -1448, Егемен 20, Анар, К-2780, Казахстанская 4, N 18, Сапалы; 4 египетских сортов: Geiza-168, Gemeiza-10, Sakha-93, Sids-1; 5 диких видов *T. timopheevii*, *T. dicoccum*, *T. kiharae*, *Ae. ventricosa*, *Ae. kotschyi*, любезно

представленных сотрудниками Казахского научно-исследовательского института Земледелия и растениеводства и Хоуссамом Э.М. Эль-Вакилем (Университет Александрия, Египет), а также интрогрессивные линии – л-344, л-345.

ДНК выделяли согласно методике, описанной Edwards [4]. Идентификацию *Lr*-генов осуществляли с использованием ПЦР с праймерами, маркирующими отдельные гены. Праймеры были выбраны на основании литературных данных [5-10]. В качестве компонентов реакционной смеси для ПЦР использовался PCR Master mix (“Fermentas”). Продукты амплификации разделяли в 1,4%-ном агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Гели документировали с помощью фотографирования после окрашивания бромистым этидием. Как маркер молекулярной массы использовали GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (“Fermentas”). В качестве положительного контроля были использованы изогенные линии сорта Thatcher, содержащие гены *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* и *Lr50*, а отрицательным контролем был использован сорт Thatcher.

### Результаты и их обсуждение

С помощью ПЦР анализа изучены 45 сортообразцов мягкой пшеницы и 5 диких видов. В результате обнаружены следующие гены устойчивости к бурой ржавчине: *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr37* и *Lr50*.

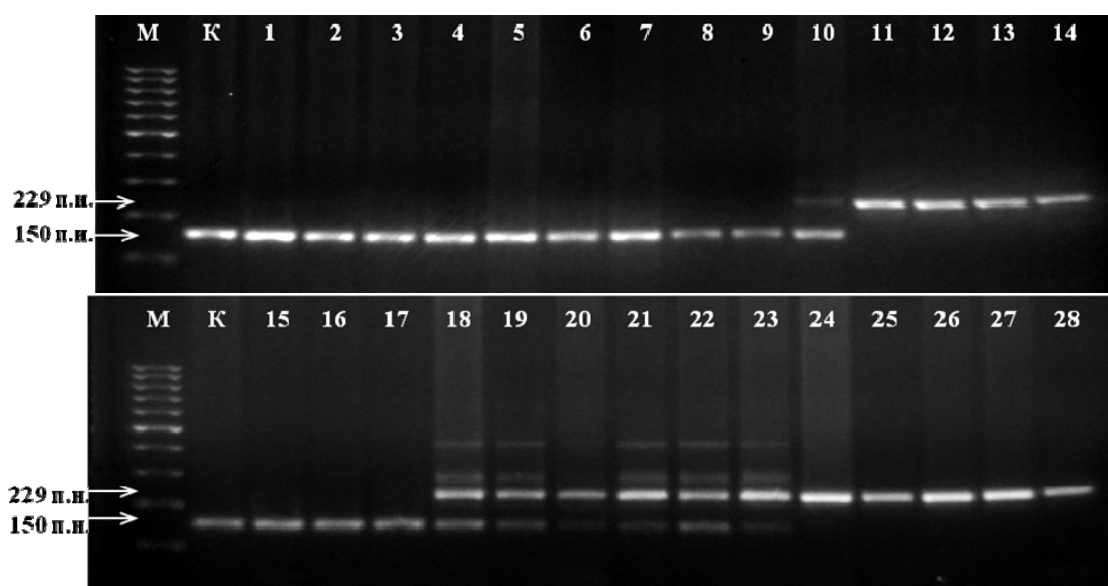


М – маркер; К – контроль; 1 – Ажар; 2 – Л-344; 3 – Л-345; 4 – *T. timopheevii*; 5 – Кокбидай; 6 – СИМ 79/279; 7 – Ст екловидная; 8 – Кондитерская; 9 – Нуреке; 10 – Казахстанская 126; 11 – Compare; 12 – Clement; 13 – Алмалы; 14 – Thatcher

**Рисунок 1** - Продукты амплификации ДНК с использованием праймеров Iag95F/Iag95R, сцепленных с геном *Lr26*

В литературных источниках имеются сведения о том, что источником гена *Lr26* является рожь *Secale cereale* L. Короткое плечо хромосомы 1 ржи (1RS) содержит несколько генов устойчивости к патогенам, а именно: *Sr31*, *Yr9*, *Pm8* и в том числе ген *Lr26*. Для идентификации гена *Lr26* нами были использованы SCAR маркер Iag 95. В результате был получен специфический продукт длиной 1100 пн. Этот фрагмент выявлен у сортообразцов мягкой пшеницы л-344, л-345, Кокбидай, Ажар, Clement, Gemeiza-9, СИМ - 79/279 и у диких видов *T. timopheevii*, *T. kiharae* (рис.1). Ген *Lr26* в сочетании с геном *Lr37* может обеспечить высокую устойчивость к листовой ржавчине [11]. Эти данные согласуются с результатами наших исследований, где сочетание *Lr26+Lr37* было найдено у интрогрессивированной линии л-344 и у диких видов *T. timopheevii*, *T. kiharae*.

Для наличия гена *Lr28* у сортообразцов пшеницы был использован ПЦР анализ с праймерами *Lr28-01* и *Lr28-02*, разработанный Наик с соавторами. (1998) для идентификации ген *Lr28* [6]. У всех образцов, включая сорт Thatcher, отмечено наличие продукта амплификации с размером около 378 пар нуклеотидов. Данный фрагмент длиной 378 п.н. был обнаружен у всех изученных сортообразцов, включая дикие виды: *T. timopheevii*, *T. dicoccum*, *T. kiharae*, *Ae. ventricosa*, *Ae. kotschyi*. Маркеры *Lr28-01* и *Lr28-02* оказалась не специфичным для идентификации гена *Lr28*, так как универсально восприимчивый сорт Thatcher, имел специфичный ген *Lr28*. При использовании того же маркера Blaszczyk (2004) у 25 образцов пшеницы и Гайнуллин (2007) у 30 также, обнаружили только один фрагмент длиной 378 п.н, включая сорта идентифицированных на аллельность гену *Lr28* и у сортов не аллельных этому гену [12,13]. Это свидетельствует о необходимости разработки нового маркера для гена *Lr28*.



М – маркер, К – контроль, 1 - 24/20989; 2 - Нуреке; 3 - МК3677; 4 - 16/20978; 5 - *T. timopheevii*; 6 - Алмалы; 7 – Алия; 8 - Gemeiza-10; 9 - Sids 1; 10 - Безостая 1; 11 - Одесская 120; 12 - К-4; 13 - Богарная 52; 14 – Thatcher; 15 - Фараби 159; 16 – Ания; 17 – Майра; 18 –Иммунная; 19 - СИМ - 79/279; 20 – Стекловидная; 21 -Егемен 20; 22 - К-2780; 23 - Sakha 94; 24 - Ажар; 25 – Казахстанская 126, 26 - Clement; 27 - Compare; 28 – Надежда

**Рисунок 2** - Продукты амплификации ДНК с использованием праймеров csLV34F, csLV34R, сцепленному с геном *Lr34*

Ген *Lr34* был идентифицирован с помощью маркера csLV34. В результате анализа амплифицированы фрагменты длиной 150 и 229 п.н. Фрагмент длиной 150 п.н. соответствует доминантному аллелю *Lr34Lr34*, что обеспечивает проявление ген устойчивости *Lr34*, а фрагмент 229 п.н. соответственно рецессивному аллелю *lr34lr34*. Использование ПЦР анализа позволило установить присутствие гена *Lr34* у 13 сортообразцов с фрагментом *Lr34Lr34*=150 п.н.: МК3677, 16/20978, Алмалы, Алия, Gemeiza-10, Sids 1, Безостая 1, Одесская 120, Ания, Майра, Иммунная, СИМ - 79/279, Sakha 94 и у дикого вида *T. dicoccum*; у 6 сортообразцов присутствовали как *Lr34Lr34*=150 п.н. фрагмент, так и фрагмент *lr34lr34*=229 п.н.: к-24/20989, Нуреке, Фараби 159, Стекловидная, Егемен 20, к-2780, а у остальных сортообразцов были идентифицированы фрагмент *Lr34Lr34* с длиной 229 п.н. (рис.2). Надо отметить, что сегмент хромосомы, в состав которого входит ген *Lr34*, содержат также ген устойчивости к желтой ржавчине *Yr18*, мучнистой расе *Pm8*, желтой карликовости ячменя *Bdv1*. Это делает локус ценным источником устойчивости в селекции пшеницы.

Ген *Lr35* тестируется у сортообразцов и диких форм с помощью специфическими праймерами SCAR SR39. В результате ПЦР амплифицировался фрагмент длиной 900 п.н. С использованием указанного маркера ген *Lr35* был выявлен у дикого вида *Ae. kotschyi*, в остальных образцах этот ген не обнаружен. Таким образом, генотипы пшеницы местной селекции не содержат ген *Lr35*.

Ген *Lr37* тесно сцепленный с генами устойчивости к желтой ржавчине *Yr17* и стеблевой ржавчине *Sr38*, является высокоэффективным против возбудителей листовой ржавчины. В результате ПЦР с маркерами VENTRIUP-LN2 амплифицируется специфический фрагмент длиной 262 п.н. В наших исследованиях ген *Lr37* выявлен только у диких видов *T. timopheevii*, *T. kiharae*, *Ae. ventricosa* и интродуцированной линии л-344 (рис. 4). В исследуемых сортообразцах и линиях пшеницы очень низкий уровень распространения гена *Lr37*.

Ген *Lr50* тестируется с помощью праймеров WMS382F/R, который амплифицирует продукт размером около 139 пар нуклеотидов. Из 21 образца - к-24/20989, К 4, Богарная 52, Кондитерская, Нуреке, Л-345, МК 3677, 16/20978, К 88, Geiza-168, *T. timopheevii*, *T. kiharae*, Алмалы, Алия, Gemeiza-10, Sakha-93, Sids-1, Безостая 1, Фараби 159, Ания, Майра, Юбилейная 75, Stephens, Иммунная, Казахстанская 3, СИМ 79/279, к-1448, Егемен 20, К-2780, N18 и Сапалы.

Таким образом, использование SCAR и STS маркеров значительно ускорило идентификацию устойчивости у 50 сортообразцов мягкой пшеницы. С использованием праймеров Iag95F/R

идентифицирован ген *Lr26* у 9 сортообразцов пшеницы и у диких видов *T. timopheevii* и *T. kiharae*. Маркеры Lr28-01, Lr28-02, тесно сцепленные с геном *Lr28*, амплифицировали специфический фрагмент 378 п.н. у всех образцов. Выявленные ДНК маркеры Lr28-01, Lr28-02 не позволяют надежно идентифицировать образцы пшеницы, имеющие гены возрастной устойчивости *Lr28*, так как наличие этого гена обнаружено у всех нами изученных сортообразцов, и наряду с этим у высоковосприимчивого сорта Thatcher, это подвергает сомнению использование их в качестве маркеров. С помощью STS-праймеров csLV34F/R был обнаружен ген *Lr34* у 19 сортообразцов пшеницы. Ген *Lr35* был выявлен у только дикого вида *Ae. kotschyi*, в остальных образцах этот ген не обнаружен, а ген *Lr50* был обнаружен у 21 из изучаемых 50 образцов. Из STS маркеры VENTRIUP, LN2, тесно сцепленные с геном *Lr37*, амплифицировали специфический продукт 259 п.н. у диких видов *T. timopheevii*, *T. kiharae*, *Ae. ventricosa* и интрогрессивной линии л-344.

#### Литература

1. McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C.F., Somers D.J. et al. Catalogue of gene symbols for wheat. Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium. Brisbane, Australia. – 2008. P. 15–32.
  2. Kuchel H., Ye G., Fox R., Jefferies S. Genetic and economic analysis of a targeted marker-assisted wheat breeding strategy // Molecular Breeding. - 2005. – V.16. P. 67–78.
  3. Singh R.P., William H.M., Huerta-Espino J., Rosewarne G. Wheat rust in Asia: meeting the challenges with old and new technologies. "New directions for a diverse planet". Proceedings of the 4th International Crop Science Congress, 26 Sep – 1 Oct. Brisbane, Australia. Published on CDROM. Web site [www.cropscience.org.au](http://www.cropscience.org.au). – 2004. P. 27-54.
  4. Edwards K., Jonstone C., Thompson C.A. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl. Acids Res. – 1991. – Vol. 19. – No. 6. – P. 1349.
  5. Mago R., Spielmeyer W., Lawrence G.J., Lagudah E.S., Ellis J.G., Pryor A. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 104. – P.1317-1324.
  6. Naik S., Gill K.S., Prakasa Rao V.S., Gupta V.S., Tamhankar S.A., Putjar S., Gill B.S., Ranjekar P.K.. Identification of a STS marker linked to the *Aegilops speltoides*-derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 97. – P. 535-540.
  7. Lagudah E.S., McFadden H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Bariana H.S., Spielmeyer W. Molecular genetic characterization of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2006. – Vol. 114. – P. 21-30.
  8. Gold J, Harder D, Townley-Smith F. Development of molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines. <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol2/issue1/full/1/index.html>. – 2002. P. 624-631.
  9. Helguera M, Khan IA, Kolmer J, Lijavetzky D, Zhong-qi L, Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines // Crop Science. – 2003. – Vol. 43. – P. 1839-1847.
  10. Brown-Guedira GL, Singh S, Fritz AK. Performance and mapping of leaf rust resistance transferred to wheat from *Triticum timopheevii* ssp. *Armeniacum* // Phytopathology. – 2003. – Vol. 93. – No. 7. – P. 784-789
  11. Moreno-Sevilla B., Baenziger P.S. The 1BL/1RS translocation: Agronomic performance of F3-derived lines from a winter wheat cross // Crop Sci. – 1995. – V. 35. – P.1051-1055.
  12. Blaszczyk L, Chelkowski J, Korzun V, Kraic J, Ordon F, Ovesná J, Purnhauser L, Tar M, Vida G. Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories // Cell. Mol. Biol. Lett. – 2004. – Vol. 9. – P. 805-817.
- Gajnullin NR, Lapochkina IF, Zhemchunzhina AI, Kiseleva MI, Kolomiets TM, Kovalenko ED. 2007. Phytopathological and molecular genetic identification of leaf rustresistance genes in common wheat accessions with alien genetic material // Russ. J. Genet. – Vol. 43. – P. 875-881.