analysis is the useful method for fingerprinting and determination of relationships between the different *C. sativa* genotypes. The results can be used in breeding programs for the genetic identification of cultivars for copyright protection and to control the spread of promising breeding material.
Key words: Camelina sativa, ISSR-PCR, polymorphism, genetic distances.

УДК 633.11:575
ЗАЙЦЕВА Г.П., АКИНИНА Г.Е., ТВЕРДОХЛЕБ Е.В., ДУГАРЬ Ю.Н., ПОПОВ В.Н.
Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН,
Украина, 61060, г. Харьков, пр. Московский 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

ОПРЕДЕЛЕНИЕ *Lr* ГЕНОВ В СОРТАХ ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ ОЗИМОЙ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ

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

В настоящее время идентифицировано более 70 *Lr*-генов, 67 из них картированы относительно разных ДНК-маркеров [1]. В частности, *Lr10* локализован на коротком плече хромосомы 1А и не является широко эффективным, однако может играть позитивную роль в сочетании с другими генами устойчивости [2]. *Lr34* картирован на хромосоме 7D, относится к числу наиболее высокоэффективных генов устойчивости к бурой ржавчине. *Lr20* расположен на длинном плече хромосомы 7А. Источником гена *Lr26* является рожь (*Secale cereale* L.), он находится на коротком плече хромосомы 1RS. Гены *Lr24* и *Lr19* привнесены в мягкую пшеницу от *Agropyron elongatum* (Host) Beauv.

К настоящему времени осуществлено множество переносов полезных генов от дикорастущих сородичей пшеницы в геном мягкой пшеницы, однако, лишь небольшое число генов можно использовать в селекционных целях. Создавать сорта пшеницы, сочетающие несколько олигогенов, или специфическую и неспецифическую устойчивость, легче при использовании молекулярных маркеров генов. Они являются мощным инструментом, позволяющим пирамидировать гены (marker assisted selection – MAS breeding programs). Кроме того, несколько генов устойчивости можно идентифицировать совместно посредством тестирования на присутствие молекулярных маркеров. Определить гены устойчивости с помощью молекулярных маркеров возможно на ранних стадиях развития растения (семена и проростки). К настоящему времени известны ДНК-маркеры, сцепленные с генами устойчивости *Lr9* [7], *Lr24* [3], *Lr29*, *Lr25* [5], *Lr35* [4] и *Lr39* [6].

Целью наших исследований являлась идентификация *Lr*-генов в сортах озимой мягкой пшеницы украинской селекции с использованием ДНК-маркеров.

Материалы и методы

Сорта и линии пшеницы мягкой озимой (*Triticum aestivum* L.), были предоставлены Национальным центром генетических ресурсов растений Украины. Нами были проанализированы сорта и линии, созданные в Институте растениеводства им В.Я. Юрьева НААН (далее ИР), сорта Селекционно-генетического института НААН, г. Одесса (СГИ) и Мироновского института пшеницы им. В.М. Ремесло НААН, г. Киев (МИП). Из каждого учреждения было отобрано по 19 сортов (перечень сортов представлен в таблице). В качестве контроля использовали образцы с известными *Lr* генами. Для изучения генетического разнообразия сортов были выбраны 4 микросателлитных локуса сцепленных с *Lr10, Lr19, Lr20, Lr34* [8]. ДНК выделяли из смеси пяти семян набором реагентов для выделения ДНК из биологического материала DiatomDNAPrep100 (Неоген). Наличие *Lr* генов изучали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Амплификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе Терцик (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 5 мкл ДНК и 1 мкМ каждого праймера. Для амплификации использовали следующую программу: 94 °С –

10 мин., 1 цикл, с последующими 40 циклами: 94 °С – 30 сек., Tm (62 °С – *Lr10*, 55 °С – *Lr19*, 60 °С – *Lr20*) 30 сек., 72 °С – 30 сек., 72 °С – 10 мин., 1 цикл. Амплификацию маркера к гену *Lr34* проводили в соответствии с рекомендациями http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/index.htm.

Продукты амплификации визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле в боратном буфере с низкой ионной силой, для мониторинга ДНК в ультрафиолете использовали бромистый этидий (на 300 мл 2% агарозного геля – 20 мкл). Электрофорез проводили в горизонтальном приборе Hoefer SuperSub100 [9].

В качестве маркеров молекулярной массы использовали DNA ladders 50. Полученные гели документировали с использованием фотосистемы Nikon. Для определения количества и размеров продуктов амплификации применяли демоверсию программы TotalLab 120 (http://www.totallab.com).

Результаты и обсуждение

При идентификации гена *Lr10* с использованием праймеров Lrk 10 D1 (F) и Lrk 10 D2 (R) идентифицирован фрагмент размером 282 п.н. в шести сортах озимой мягкой пшеницы, созданных в двух селекционных центрах – ИР и СГИ (табл. 2). Ген *Lr10* в настоящее время не относится к группе эффективных генов, но его комбинирование с другими *Lr*-генами может способствовать повышению уровня устойчивости [10].

По литературным данным ДНК-маркеры к *Lr19* и *Lr20* имеют фрагменты 130 п.н. и 542 п.н., соответственно [8]. В наших опытах указанные фрагменты не наблюдались, следовательно, представленные гены, отсутствуют в изученных сортах пшеницы.

Таблица. Образцы озимой мягкой пшеницы

Номер Нац. каталога	Название образца	Номер Нац. каталога	Название образца	Номер Нац. каталога	Название образца
Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН		Селекционно-генетический институт НААН		Мироновский институт пшеницы им. В.М. Ремесло НААН	
UA0100002	Харьковская 11	UA0106584	Годувальниця одеська	UA0106265	Снігурка
UA0100005	Харьковская 90	UA0106587	Єдність	UA0104204	Подолянка
UA0100813	Харківська 105	UA0104207	Дальницька	UA0102692	Крижинка
UA0100833	Харьковская 81	UA0103681	Куяльник	UA0105975	Фаворитка
UA0103003	Полукарлик 3	UA0105607	Оксана	UA0106226	Богдана
UA0106376	Досконала	UA0106022	Зміна	UA0106227	Золотоколоса
UA0106573	Дорідна	UA0106017	Вдала	UA0105600	Смуглянка
UA0103677	Харус	UA0106254	Господиня	UA0104205	Колумбія
UA0104972	Василина	UA0106257	Запорука	UA0106578	Солоха
UA0104973	Астет	UA0106523	Заможність	UA0107097	Сонечко
UA0106375	Альянс	UA0106580	Бунчук	UA0107438	Нива Київщини
UA0106572	Розкішна	UA0106583	Благодарка одеська	UA0107643	Славна
UA0106961	Гордовита	UA0107430	Жайвір	UA0107655	Лимарівна
UA0108061	Линия 831/10	UA0107433	Борвій	UA0107656	Спасівка
UA0107997	Статна	UA0107661	Ластівка одеська	UA0107657	Чигиринка
UA0108058	Дбайлива	UA0107662	Голубка одеська	UA0110806	Леля
UA0108107	Фермерка	UA0107663	Ватажок	UA0100020	Полесская 90
UA0108116	Запашна	UA0110807	Ніконія	UA0100065	Мироновская 808
UA0108131	Линия 808/10	UA0101767	Прокофьевка	UA0100007	Украинка

Молекулярный скрининг сортов озимой пшеницы на наличие гена *Lr34* с использованием праймеров csLV34 (F) и csLV34 (R) показал наличие фрагментов размером 150 п.н и 229 п.н. Амплификация фрагментов размером 150 п.н свидетельствует о наличии гена *Lr34,* а наличие фрагмента размером 229 п.н. может свидетельствовать об отсутствии этого гена. Так, у 13 сортов пшеницы ИР были выявлены фрагменты размером 150 п.н., а у 8 сортов – фрагмент размером 229 п.н., у 16 сортов СГИ также идентифицирован маркер, сцепленный с геном *Lr34*. Среди сортов селекции МИП – у 3-х идентифицировали фрагмент размером 150 п.н., а у 16 сортов он отсутствовал. Ген *Lr34* получил широкое распространение в селекции пшеницы от сорта Безостая 1, который использовался во многих селекционных центрах по созданию сортов пшеницы. Несмотря на то, что эффективность гена *Lr34* снижается, показано, что комбинация его с другими расоспецифическими генами, например *Lr13*, значительно повышает уровень полевой устойчивости [11].

Выводы

С помощью ДНК-маркеров были выявлены сорта и линии пшеницы мягкой озимой, в которых выявлены маркеры, сцепленные с генами устойчивости к бурой ржавчине. Из 19 сортов селекции ИР выявлено 13 образцов с генами *Lr10* и *Lr34*, причём у сорта Фермерка присутствуют два гена - *Lr10* и *Lr34*. У изученных сортов селекции СГИ выделено 17 образцов, 4 из которых имеют два гена *Lr 10* и *Lr34* – Куяльник, Зміна, Жайвір, Ластівка одеська. Всего лишь три образца с геном *Lr34* мы выявили в сортах селекции МИП: Богдана, Колумбія, Леля.

Литература

1. McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 Supplement [Електронний ресурс]. – Режим доступа: www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2009.pdf
2. McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. CSIRO, Melbourne. – 1995.
3. Dedryver F., Jubier M. F., Thouvenin J., Goueau H. Molecular markers linked to the leaf rust resistance gene Lr 24 in different wheat cultivars // Genome. – 1995. – 38, N 1. – P. 75–83.
4. Gold J., Harder D., Townley-Smith F., Aung T., Procunier J. Development of a molecular marker for rust resistance genes Sr39 and Lr 35 in wheat breeding lines // Elektronic Jorn. of Biotechnol. – 1999. – 2, N 1.
5. Procunier J.D., Townley-Smith T.F., Fox S., Prashar S., Gray M., Kim W.K., Czarnecki E., Dyck P.L. PCR-based RAPD/DGGE-markers linked to leaf rust resistance genes Lr 29 and Lr 25 in wheat (*Triticum aestivum* L.) // J. Gen. and Breed. – 1995. – 49. – P. 87–92.
6. Raupp W.J., Sukhwinder-Singh, Brown-Guedira G.L., Gill B.S. Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene Lr 39 in wheat // TAG Theor. Appl. Gen. – 2001. – 102. – P. 347–352.
7. Schachermayr G., Siedler H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the Lr 9 leaf rust resistance gene of wheat // Theor. Appl. Gen. – 1994. – 88. – P. 110–115.
8. Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров // Генетика. – 2006. – 42, № 5. – С. 675–683.
9. Brody J.R., Calhoun E.S., Gallmeier E. et al. Ultra-fast high-resolution agarose electrophoresis of DNA and RNA using low-molarity conductive media // Bio-techniques. – 2004. – 37, N 4. – P. 598–602.
10. McIntosh R.A. et al. Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO, Australia, and Kluwer Academic Publishers, Dortrecht, 1995.
11. Kolmer J.A. Virulence phenotypes of Puccinia triticina in South AtlanticStates in 1999 // Plant Diseases. – 2002. – 86. – P. 288–291.

ZAITSEVA G.P., AKININA G.YE., TVERDOKHLEB E.V., DUGAR YU.M., POPOV V.N.

The Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuryev of NAAS,

Ukraine, 61060, Kharkov, Moskovskiy prospekt, 142, e-mail: yuriev1908@gmail.com

DETERMINATION OF *Lr* GENES IN SOFT WINTER WHEAT VARIETIES OF UKRAINIAN SELECTION

Aims. The aim of our research was to identify *Lr*-genes in winter wheat Ukrainian varieties using DNA markers. ***Methods.*** DNA was isolated from a mixture of five seeds. Presence of *Lr* genes was studied by polymerase chain reaction (PCR). The amplification products were visualized by electrophoresis on a 2% agarose gel. For determination the numbers and sizes of the amplification products demo version of program

TotalLab 120 was used. ***Results.*** *Lr10* gene was detected in six varieties of winter wheat from two breeding centers – The Plant Production Institute (PPI) and The Plant Breeding and Genetics Institute (PBGI). In the studied varieties *Lr19* and *Lr20* genes were not identified. *Lr34* gene was identified in 13 varieties of PPI, 17 varieties of PBGI and three varieties of the Mironivskiy institute of wheat (MIW). ***Conclusions.*** Using the DNA-markers varieties and lines of soft winter wheat with the *Lr* genes were identified. The two *Lr* genes, *Lr10* and *Lr34,* are present in some studied samples. And two genes, *Lr19* and *Lr20,* were not identified in studied Ukrainian winter wheat varieties and lines.
Key words: Lr- genes, DNA markers, leaf rust, *T. aestivum* L.

УДК 577.21:632.4
ІВАЩУК Б.В., ПІРКО Я.В., БЛЮМ Я.Б.
Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України,
Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а, e-mail: yavp@mail.ru

ІДЕНТИФІКАЦІЯ АЛЕЛЬНИХ СТАНІВ ГЕНА RPG1 У СОРТІВ ЯЧМЕНЮ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

Ячмінь (*Hordeum vulgarum*) є однією з найбільш поширених зернових культур у світі. Разом з пшеницею ячмінь складає більш ніж 25% світового харчового постачання. Оцінено, що через різноманітні захворювання цих злаків щороку втрачається близько 5 млрд. доларів США [1]. До найбільш шкідливих патогенів ячменю та пшениці відносять *Puccinia recondite*, *Puccinia graminis* і *Puccinia striiformis,* які викликають такі захворювання, як листова іржа, стеблова іржа і смугаста іржа відповідно. Особливою небезпечністю серед них виділяється *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, що вражає як ячмінь, так і пшеницю і періодично викликає масові епіфітотії, які призводять до значного зниження врожаю та якості зерна цих культур.

У 1940-х роках XX століття втрати урожаю ячменю, спричинені стебловою іржею, стали мінімальними, що було викликано появою нових сортів з геном Rpg1. До недавнього часу цей єдиний ген надійно забезпечував стійкість ячменю до різних патотипів *P. graminis* f. sp. *tritici* [2]. З появою у 1999 р. в Уганді нової раси стеблової іржі, названої Ug99, більшість сортів пшениці та ячменю виявились чутливими до цього патотипу, тому і досі використання у селекції ячменю таких генів, як Rpg1, та пошук нових генів стійкості до цього патотипу іржі є актуальною проблемою. Особливо важливо відзначити, що у зв'язку з швидким поширенням Ug99 з центральної Африки в Південну Африку, Аравійській півострів, Іран, і далі на схід Євразії виникає ризик розповсюдження цього захворювання і в країнах Європи. Rpg1 – домінантний ген, оригінальним джерелом якого є сорт ячменю Kindred [2]. Оскільки він забезпечував широку стійкість до різних патотипів *Puccinia graminis* протягом останніх 70-ти років, майже кожен сорт ячменю в середніх і західних штатах США є носієм цього гена. Завдяки визначенню нуклеотидної послідовності гена Rpg1 було виявлено, що білковий продукт Rpg1 схожий на рецептор кінази з унікальним поєднанням двох тандемних кіназних доменів [6]. В епідермісі листка експресується в 30 разів більше цього білка, ніж в інших тканинах. Він головним чином представлений в цитозолі, плазматичній мембрані та внутрішньоклітинних мембранах. Аналіз мутантів по гену Rpg1 показав, що для стійкості необхідна наявність обох кіназних доменів, але лише один із них має кіназну активність [3]. Результати деяких досліджень свідчать про те, що Rpg1 фосфорилюється вже через 5 хв. після інокуляції авірулентними урединоспорами, що наштовхує на думку про його роль у ранній відповіді на інфекцію стеблової іржею. Також було з'ясовано, що для перенесеної геном Rpg1 стійкості немає прямої відповідності між стійкістю до стеблової іржі, числом копій гена чи транскрипційним рівнем [3], але при великій кількості перенесених копій гена може відбуватись посттрансляційний генний сайленсинг [4].

У зв'язку з цим, важливо мати розгорнуті дані щодо наявності та алельного стану гена Rpg1 у різних сортів ячменю вітчизняного селекційного фонду, оскільки він визначає стійкість ячменю до багатьох вірулентних патотипів стеблової іржі. Тому метою даної роботи було виявлення можливої присутності «стійкого» алеля гена Rpg1 в українських сортах ячменю.