

КАРЕЛОВ А. В.^{1,2}, КОЗУБ Н. О.^{1,2}✉, КУЧЕРЯВИЙ І. І.¹, СОЗІНОВА О. І.^{1,2}, СОЗІНОВ І. О.¹, РЯБЧУН В. К.³, БЛЮМ Я. Б.²

¹ Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33

² ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України»,

Україна, 04123, м. Київ, вул. Осиповського, 2а

³ Інститут рослинництва ім. В.Я. Юр'єва,

Україна, 61060, м. Харків, пр. Московський, 142

✉ natalkozub@gmail.com

ГЕНЕТИЧНІ ПЕРЕДУМОВИ ПОМІРНОЇ СТІЙКОСТІ ДО ФУЗАРІОЗУ КОЛОСА У СОРТІВ ПШЕНИЦІ СЕЛЕКЦІЇ ЛІСОСТЕПУ УКРАЇНИ

Мета. Метою роботи було визначення генетичних передумов для стійкості до фузаріозу колоса у сортів пшениці м'якої Лісостепової зони на основі даних про алельний стан гена *TDF_076_2D*, що забезпечує помірну стійкість до грибів видів *Fusarium graminearum* Schwabe, та *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. **Методи.** Досліджено 91 сорт пшениці озимої м'якої, створених у Інституті фізіології рослин і генетики НАН України. Для виділення ДНК використовували комерційний набір на основі силікату. Для визначення алельного стану гена стійкості використали молекулярний маркер *INDEL1*, який косягує із геном *TDF_076_2D*. **Результати.** Частота алеля стійкості за маркером *INDEL1* гена помірної стійкості до грибів роду *Fusarium TDF_076_2D* становила 0,802. **Висновки.** Більшість сортів пшениці м'якої в дослідженій вибірці несуть алель стійкості маркера гена інтересу. Отримані дані відповідають результатам попередніх досліджень для ширшої вибірки озимих українських сортів, створених раніше, а також ярих сортів. Сорти, у яких був визначений алель стійкості, можуть виявляти нижчий ступінь ураження фузаріозом колоса в полі, а також слугувати джерелами гена для селекції за допомогою молекулярних маркерів.

Ключові слова: м'яка пшениця, гени стійкості до хвороб, фузаріоз колоса, молекулярні маркери.

З-поміж поширених в Україні фітопатогенів пшениці досить важливе місце займають збудники фузаріозу колоса; це гриби роду *Fusarium*, а саме переважно види *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch (анаморф – *F. graminearum*) та *F. culmorum* Wm. G. Sm. [1–4]. Так у Степовій зоні України

втрати урожаю від грибів цього роду в роки епіфітотій сягали 50–60% [5]. Крім цього, гриби роду *Fusarium* є продуцентами мікотоксинів, зокрема, деоксиніваленолу, ніваленолу, зираленону, які можуть спричинити отруєння людей та худоби [6–8]. Стійкість пшениці до збудників фузаріозу колоса є помірною, расонеспецифічною і переважно забезпечується низкою регуляторних генів [7, 9–12]. Зокрема, з'ясовано, що важливе значення у регулюванні шляхів взаємодії з патогенами у рослин має ген «відсутності експресії пов'язаних із патогенезом протеїнів групи 1» (nonexpressor of pathogenesis-related proteins 1, *NPR1*) [13–15]. Для помірно стійких до фузаріозу колоса європейських генотипів пшениці Caro та SVP72017 було проведено вивчення взаємодії рослин із грибами видів *F. graminearum* та *F. culmorum* на рівні експресії [19]. У результаті дослідження виявлено зв'язок алельних станів двох подібних до *NPR1* гомеологічних генів *TDF_076_2D* і *TDF_076_2A* на хромосомах 2D і 2A пшениці зі стійкістю за типом II на рівні 14,2 % та 3 %, відповідно, та алельні стани цих генів, що відповідають стійкості й чутливості до збудників фузаріозу колоса. Було розроблено молекулярні маркери для цих алельних станів [15].

Отже, метою роботи було визначення генетичних передумов для стійкості до фузаріозу колоса у сортів пшениці м'якої Лісостепової зони. Для досягнення цієї мети використано молекулярно-генетичний маркер гена *TDF_076_2D*, що забезпечує помірну стійкість (толерантність) до грибів видів *F. graminearum* та *F. culmorum*.

© КАРЕЛОВ А. В., КОЗУБ Н. О., КУЧЕРЯВИЙ І. І., СОЗІНОВА О. І., СОЗІНОВ І. О., РЯБЧУН В. К., БЛЮМ Я. Б.

Матеріали і методи

Були досліджені сорти пшениці озимої м'якої, створені в Інституті фізіології рослин і генетики НАН України (ІФРiГ, табл.). Зерно зразків було отримано з колекції Національного центру генетичних ресурсів рослин України (Інститут рослинництва ім. В. Я. Юр'єва НААН). Для виділення ДНК використовували комерційний набір на основі силікату NeoPrep_100 (Неоген™, Україна). ДНК виділяли з наважок масою 20–35 мг, відібраних із розтертого матеріалу 8–10 зернівок пшениці. Був використаний молекулярний маркер *INDELI*, який косягує із геном *TDF_076_2D*; праймери *INDELI-F* (5'tcatgcagtgcttgctgatct3') та *INDELI-R* (5'scattcaacttgagcaactcc3') додавали у кінцевій концентрації 0,5 пМ, відповідно до [15]. Для полімеразної ланцюгової реакції використовували суміш реагентів для ампліфікації ДНК PCR MIX 2x HOT (Неоген™, Україна). ПЛР проводили в термоциклері-ампліфікаторі Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler з наступним режимом, згідно з [15]: початкова денатурація 12 хв при 95°C, 30 циклів (денатурація 30 сек за 94°C, відпал у циклі 30 сек за 60°C, елонгація в циклі 30 сек за 72°C), фінальна елонгація 7 хв при 72°C. У результаті ПЛР отримували продукти ПЛР довжиною 212 та 221 п. н. у випадку чутливого алельного стану (S), а також поліморфізму дослідженого матеріалу, наявність

лише одного ампліфікованого фрагменту довжиною 212 п. н. відповідає алелю стійкості до фузаріозу колоса (алель R). Отримані в результаті ПЛР фрагменти розділяли в 3% агарозному або 10% поліакриламідному гелях та візуалізували шляхом фарбування бромистим етидієм. В якості маркерів молекулярних мас використовували O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder із різницею в довжині фрагментів 100 п. н. (100, 200, 300 п. н. і так далі до 1000 п. н.). Для фотографування та збереження результатів використовували систему для гелі-документації VISION Gel.

Результати та обговорення

Проведено дослідження колекції сортів пшениці м'якої озимої селекції ІФРiГ. Застосування 3 % агарозного гелю виявилось зручним для ідентифікації алелів та забезпечувало роздільну здатність, порівняльну з використанням поліакриламідного геля.

На рис. наведено електрофореграму продуктів ампліфікації для сортів м'якої озимої.

Ампліфікація двох фрагментів 221 і 212 п. н. вказувала на алель чутливості (S), наявність лише фрагмента 212 п. н. – алель стійкості (R), згідно з роботою Diethelm et al. [15] (рис.). В таблиці наведений повний перелік досліджених сортів та алельний стан маркера гена інтересу.

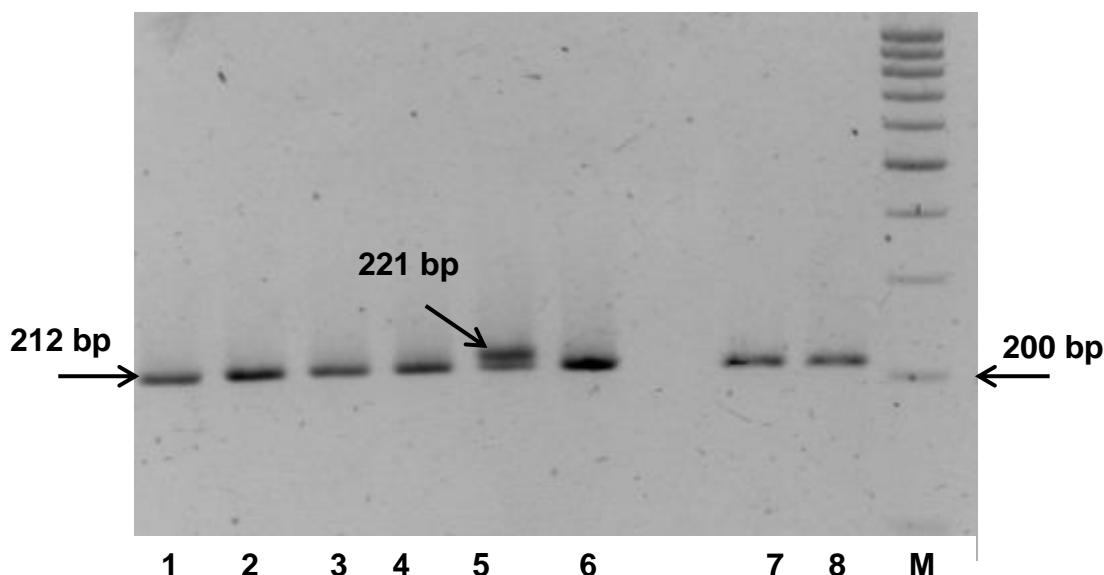


Рис. Електрофореграма продуктів ампліфікації з праймерами до маркера *INDELI* гена *TDF_076_2D*. для сортів м'якої озимої: 1 – Веста; 2 – Вінок Поділля; 3 – Володарка; 4 – Волошкава; 5 – Гілея; 6, 7 – Гомін; 8 – Городниця; M – 100 bp DNA Ladder.

Таблиця. Алельний стан маркера *INDEL1* гена *TDF_076_2D* у сортів пшениці м'якої озимої селекції ІФРІГ НАН України (PM – гетерогенність)

Назва сорту	Алель маркера	Назва сорту	Алель маркера
Астарта	R	Мирлена	R
Богдана	R	Миронівська ранньостигла	R
Бондарівна	R	Еритроспрмум 53320	R
Борія	S	Наталка	R
Боровиця	R	Нива Київщини	R
Бужанка	R	Новокиївська	R
Веснянка	R	Новосмуглянка	S
Веста	R	Орійка	R
Вінок поділля	R	Пам'яті ремесла	R
Володарка	R	Переяславка	R
Волошкова	R	Пивна	PM
Гілея	S	Подолянка	R
Гомін	R	Полтавка	S
Городниця	R	Полянка	S
Даринка київська	S	Почайна	R
Дарунок поділля	R	Почаївка	R
Добірна	S	Придніпровська	R
Доброслова	R	Райгородка	R
Достаток	R	Ремеслівна	R
Збруч	R	Рея	R
Здоба київська	R	Серпанок київський	S
Зимоярка	R	Славна	R
Злука	R	Смуглянка	R
Золото України	R	Снігурка	R
Золотоколоса	S	Сніжана (Венера)	S
Золотоножка	R	Солоха	R
Зореслава	R	Сонечко (Білобока)	R
Каланча	R	Сотниця	R
Калинова	R	Софія київська	R
Київська 7	S	Спасівка	R
Київська 8	R	Стрітенська	R
Київська остиста	PM	Трудівниця	R
Колос миронівщини	R	Фаворитка	R
Колумбія	S	Феофанія	S
Коляда	R	Хазарка	R
Краснопілка	R	Хмельничанка	R
Крижинка	R	Хоревиця	R
Ладижинка	R	Хуртовина	R
Лазурна	R	Циганка	R
Ласуня?	R	Чигиринка	R
Либідь	R	Чорнява; Кармен	R
Лимарівна	PM	Ювіляр Миронівський	R
Мадярка	R	Яворина (Унікум)	S
Маланка	R	Ясногірка	R
		Ятрань 60	S

Частота алеля стійкості за маркером гена помірної стійкості до грибів роду *Fusarium* *TDF_076_2D* у колекції сортів ІФРiГ становила 0,802 (табл.). Раніше нами було встановлено, що частка зразків із алелем стійкості у вибірці озимих сортів селекції Степової зони, створених у різні роки, становила 0,489; частка зразків у вибірці озимих сортів Лісостепової зони, створених у різні роки, становила 0,745; частка зразків із алелем стійкості у загальній вибірці озимих сортів складала 0,671; частка зразків у вибірці українських ярих сортів різних зон, створених у різний час, становила 0,833 [16, 17]. За результатами, отриманими в цьому дослідженні, можемо стверджувати, що з-поміж сортів селекції ІФРiГ алель стійкості гена інтересу зустрічається значно частіше, ніж з-поміж сортів селекції Степової зони України. Також досліджена вибірка має дещо вищу частоту зустрічання алеля стійкості, ніж загальна вибірка озимих сортів української селекції чи вибірка сортів Лісосте-

пової зони, створених у різних установах. Такі закономірності можуть бути пояснені особливостями вихідного генетичного матеріалу та сприятливими селективними умовами в процесі створення сортів у ІФРiГ НАН України.

Висновки

Визначено генотипи за маркером *INDEL1* гена помірної стійкості до збудників фузаріозу колоса *TDF_076_2D* у 91 сорту селекції ІФРiГ НАН України. Більшість сортів пшениці м'якої в дослідженій вибірці несуть алель стійкості маркера гена інтересу. Отримані дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень для ширшої вибірки озимих українських сортів, створених раніше, а також ярих сортів. Сорти, у яких був визначений алель стійкості, можуть виявляти нижчий ступінь ураження фузаріозом колоса в полі, а також слугувати джерелами гена для селекції за допомогою молекулярних маркерів.

References

1. Retman S.V., Shevchuk O.V., Gorbacheva N.P. Diseases of leaves and ear. *Karantyn i zakhyst roslyn*. 2011. № 4. P. 25–27. [in Ukrainian] / Ретьман С.В., Шевчук О.В., Горбачова Н.П. Хвороби листя і колоса. *Карантин і захист рослин*. 2011. № 4. С. 25–27.
2. Kovalyshina H.M., Murashko L.A., Kovalyshyn A.B. Spike diseases in winter wheat of the Forest Steppe of Ukraine. *Visnyk Ukrainського tovarystva genetykiv i seleksioneriv*. 2008. Vol. 6, № 2. P. 223–239. [in Ukrainian] / Ковалишина Г.М., Мурашко Л.А., Ковалишин А.Б. Хвороби колоса у озимій пшениці Лісостепу України. *Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів*. 2008. Т. 6, № 2. С. 223–239.
3. Grytsiuk N.V. Resistance of winter wheat varieties against *Fusarium* infections at different infection periods. *Karantyn i zahust roslyn*. 2013. № 10. P. 1–3. [in Ukrainian] / Грицюк Н.В. Стійкість сортів пшениці озимі проти фузаріозних інфекцій за різних строків ураження. *Карантин і захист рослин*. 2013. № 10. С. 1–3.
4. Yarynchyn A.M. Resistance of winter wheat varieties against *Fusarium* infections of the spike. *Zakhyst i karantyn roslyn*. 2009. № 4. P. 13–15. [in Ukrainian] / Яринчін А.М. Стійкість сортів озимі пшениці проти ураження збудниками фузаріозу колоса. *Захист і карантин рослин*. 2009. № 4. С. 13–15.
5. Babayants O.V. Immunological characteristics of plant genetic resources and substantiation of genetic protection against causative agents of fungal diseases in the Steppe of Ukraine. Author's abstract of dissertation for the degree of Doctor of biological sciences: 06.01.11. Kyiv, 2011. 50 p. [in Ukrainian] / Бабаянц О.В. Імунологічна характеристика рослинних ресурсів пшениці та обґрунтування генетичного захисту від збудників хвороб грибної етіології у степу України: автореф. дис. ... д-ра біол. Наук: 06.01.11. К., 2011. 50 с.
6. Leonard K.J., Bushnell W.R. *Fusarium* head blight of wheat and barley. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 2003. 512 p.
7. Salgado J.D., Madden L.V., Paul P.A. Quantifying the effects of *Fusarium* head blight on grain yield and test weight in soft red winter wheat. *Phytopathology*. 2015. Vol. 105, No. 3. P. 295–306. doi: 10.1094/PHYTO-08-14-0215-R.
8. Mesterhazy A., Bartok T., Mirocha C.G., Komoroczy R. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breed.* 2008. Vol. 118. P. 97–110.
9. Glazebrook J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. Vol. 43. P. 205–227. doi: 10.1007/s00122-002-1137-4.
10. del Blanco I.A., Froberg R.C., Stack R.W., Berzonsky W.A., Kianian S.F. Detection of QTL linked to *Fusarium* head blight resistance in Sumai 3-derived North Dakota bread wheat lines. *Theor. Appl. Genet.* 2003. Vol. 106, No. 6. P. 1027–1031. doi: 10.1007/s00122-002-1137-4.
11. Cuthbert P.A., Somers D.J., Thomas J., Cloutier S., Brulij-Babel A. Fine mapping *Fhb1*, a major gene controlling *Fusarium* head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 2006. Vol. 112, № 8. P. 1465–1472. doi: 10.1007/s00122-006-0249-7.
12. Golkari S., Gilbert J., Ban T., Procnier J.D. *QTL-specific* microarray gene expression analysis of wheat resistance to *Fusarium* head blight in Sumai-3 and two susceptible NILs. *Genome*. 2009. Vol. 52, № 5. P. 409–418. doi: 10.1139/g09-018.
13. Zhu Q.H., Stephen S., Kazan K., Jin G., Fan L., Taylor J., Dennis E.S., Helliwell C.A., Wang M.B. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq. *Gene*. 2013. Vol. 512. P. 259–266. doi: 10.1016/j.gene.2012.10.036.

14. Gao C.S., Kou X.J., Li H.P., Zhang J.B., Saad A.S.I., Liao Y.-C. Inverse effects of *Arabidopsis NPR1* gene on *Fusarium* seedling blight and *Fusarium* head blight in transgenic wheat. *Plant Pathol.* 2013. Vol. 62, № 2. P. 383–392. doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02656.x.
15. Diethelm M., Schmolke M., Groth J., Friedt W., Schweizer G., Hartl L. Association of allelic variation in two *NPR1*-like genes with *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Mol Breeding.* 2014. Vol. 34, № 1. P. 31–43. doi: 10.1007/s11032-013-0010-2.
16. Kozub N.A., Sozinov I.A., Karelov A.V., Blume Ya.B., Sozinov A.A. Diversity of Ukrainian winter common wheat varieties with respect to storage protein loci and molecular markers for disease resistance genes. *Cytol Genet.* 2017. Vol. 51, № 2. P. 117–129. doi: 10.3103/S0095452717020050.
17. Karelov A., Kozub N., Sozinov I., Sozinova O., Mavromatis A.G., Xynias I.N. Molecular detection of resistance to biotic stress conditions in spring bread wheat cultivars. *Innovative Approaches and Applications for Sustainable Rural Development*, A. Theodoridis et al. (eds.). Springer Earth System Sciences, Springer Nature Switzerland AG, 2019. P. 305–324. doi: 10.1007/978-3-030-02312-6_18.

KARELOV A.V.^{1,2}, KOZUB N.A.^{1,2}, KUCHERIAVYI I.I.¹, SOZINOVA O.I.^{1,2}, SOZINOV I.A.¹, RIABCHUN V.K.³, BLUME Ya.B.²

¹ *Institute of Plant Protection NAAS,*

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylkivska str., 33, e-mail: natalkozub@gmail.com

² *Institute of Food Biotechnology and Genomics, NAS of Ukraine,*

Ukraine, 04123, Kyiv, Osyповskogo str., 2a

³ *The Plant Production Institute nd. a. V.Ya. Yuryev of NAAS,*

Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovsky ave., 142

GENETIC BACKGROUND FOR MODERATE RESISTANCE AGAINST FUSARIUM HEAD BLIGHT AMONG WINTER WHEAT DEVELOPED IN THE FORREST STEPPE OF UKRAINE

Aim. The aim of the work was to evaluate the genetic background of resistance to *Fusarium* head blight in common winter wheat cultivars based on the allelic state of the *TDF_076_2D* gene conferring tolerance against *Fusarium graminearum* Schwabe and *F. culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. fungi. **Methods.** We studied 91 winter common wheat cultivars developed in the Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS of Ukraine. A silica-based commercial kit was used for DNA extraction. For the allelic state detection, the *INDEL1* marker co-segregating with the *TDF_076_2D* gene was used. **Results.** The frequency of the resistance allele according to the marker for the gene conferring moderate resistance to the *Fusarium* fungi made up 0.802. **Conclusions.** The majority of the common wheat cultivars from the studied sample carry the resistance allele of the gene of interest. The data obtained are consistent with the results of previous research for the wider sample of the winter and spring common wheat cultivars. The cultivars with confirmed resistance allele might show lower infection level in the field and serve as a source of the gene in marker assisted selection.

Keywords: common wheat, disease resistance genes, *Fusarium* head blight, molecular markers.