

ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНЕТИЧНОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ ІНТРОГРЕСИВНИХ ЛІНІЙ ПШЕНИЦІ ЗА КОНСЕРВАТИВНИМИ РЕГІОНАМИ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ

Імунна відповідь рослин на біотичні стресові фактори забезпечується продуктами генів стійкості, які на рівні клітини опосередковують розпізнавання патогенних молекул (ефекторів) та регулюють шляхи передачі й активації генів відповіді. Для коректного функціонування генів стійкості (*R*-генів) важливу роль відіграє їхня структура та активні домени, за якими гени стійкості класифікуються. Найбільш поширеним класом *R*-генів є клас NBS-LRR, який включає у себе всі гени, що мають у своїх послідовностях домен NBS (Nucleotide-Binding Site), відповідальний за зміну конформації білка, та LRR (Leucine-Rich Repeats) рецепторний регіон, що забезпечує розпізнавання й взаємодію протеїну з ефектором [1]. У свою чергу, клас NBS-LRR поділяється на два підкласи, до одного з яких (CC-NBS-LRR) належать *Pm* гени, які контролюють ознаку стійкості до борошністої роси у пшениці [2].

Гени стійкості є однією із консервативних і одночасно дуже пластичних генних родин, адже, з одного боку, від наявності консервативних ключових доменів залежить ефективність імунітету рослини, а з іншого – необхідна певна варіабельність у цих регіонах, яка б уможливила формування нових варіантів генів у відповідь на виникнення нових рас патогенів. Відомо, що більшість генів стійкості у геномі рослин організована кластерно, і лише невеликий відсоток генів розташовується поодинокі [3]. Між кластерами генів розташовані ген-зубожілі регіони, у яких можуть міститися мікросателітні послідовності, мобільні генетичні елементи, псевдогени та інші послідовності, що відіграють важливу роль як джерела мінливості для еволюції *R*-генів [4]. Зараз вже встановлено, що гени родини NBS-LRR мають регіони, цільові для перебудов за рахунок рекомбінації та конверсії генів [5]. Наприклад, виявлено, що регіон NBS та локальні точки у LRR частині алелів гена *Pm3* містять гарячі точки рекомбінації [2].

Методика Resistance Gene Analog Polymorphism (RGAP) є зручною для виявлення та дослідження генів стійкості, оскільки вона дозволяє побачити широкий спектр компонентів, асоційованих із представленими у геномі генами стійкості. Принцип методики полягає у використанні дегенеративних праймерів до висококонсервативних послідовностей генів стійкості, таких, як кіназні й інші мотиви NBS домену (P-loop або Kinase-1, Kinase-2, Kinase-3a, GSPLA, MHD) та послідовностей у LRR регіоні. Метою нашої роботи є дослідження RGAP спектрів інтрогресивних ліній пшениці, що демонстрували стійкість до збудника борошністої роси та раніше аналізувалися за мікросателітними локусами, для виявлення імовірних компонентів спектра, які можуть бути асоційовані зі стійкістю.

Матеріали і методи

RGAP аналіз проводився на основі створених комбінацій із 9 праймерів, специфічних до консервативних регіонів генів стійкості. На основі літературних даних було відібрано 6 праймерів, послідовність та походження яких наведені у табл. 1. За допомогою BLAST було проведено біоінформатичний аналіз гена *Pm8* (1RS·1BL) та алелів *Pm3* (1AS). На основі отриманих даних, з використанням програмного забезпечення Primer3 [6], [7], було розроблено пару праймерів до їхніх консервативних послідовностей у LRR регіоні (розмір очікуваного продукту – 474 п.н.) та один праймер до MHD регіону гена *Pm8*. У табл. 2 наведена характеристика цих праймерів.

Було проаналізовано 16 інтрогресивних ліній, похідних від схрещування сорту м'якої пшениці Аврора (AABBDD) із геномно заміщеними формами Аврозис (AABBS^{sh}S^{sh}) та Авролати (AABBUU) за 18-ма RGAP комбінаціями: з них три лінії (res113, res141, res143) – похідні Аврозису за 12-ма RGAP комбінаціями та 13 ліній – похідних Авролати за 6-ма RGAP комбінаціями. Використані комбінації наведені у табл. 3.

Таблиця 1

Характеристика використаних RGAP праймерів, відібраних за літературними даними

RGAP праймер	Послідовність	Домен	Ген	Організм	Джерело
RLRR rev	ACACTGGTCCATGAGGTT	LRR	<i>Rps2</i>	Арабідопсис	[8]
RLRR for	CGCAACCACTAGAGTAAC	LRR	<i>Rps2</i>	Арабідопсис	[8]
Cre3-k3	CTGCAGTAAGCAAAGCAACG	Kinase-3	<i>Cre3</i>	М'яка пшениця	[9]
Cre3Lr-F	CACACACTCGTCAGTCTGCC	LRR	<i>Cre3</i>	М'яка пшениця	[10]
Cre3 P-loop	GCGGGTCTGGGAAATCTACC	P-loop	<i>Cre3</i>	М'яка пшениця	[11]
XLRR rev	CCCATAGACCGGACTGTT	LRR	<i>Xa21</i>	Рис	[8]

Таблиця 2

Характеристика розроблених праймерів, специфічних до консервативних послідовностей генів стійкості до борошністої роси у пшениці (*Pm8* та алелів *Pm3*)

Праймер	Температура плавлення	Вміст GC пар (%)	Послідовність
Pm8-LRR-L	59.07	45.00	GCATGCCTTGAAGCTTTGTA
Pm8-LRR-R	60.02	50.00	CTGTGCGCAAACAGAAGTCCA
Pm8-MHD-L	55.87	38.10	CGATCTTATGCATGATATTGC

Таблиця 3

Використані RGAP комбінації для ліній – похідних Аврозису та Авролати

12 RGAP комбінації для ліній – похідних Аврозису		6 RGAP комбінації для ліній – похідних Авролати
Pm8 LRR-L–XLRR rev	RLRR rev–RLRR for	Pm8 LRR-L–XLRR rev
Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R	Cre3 k3–Cre3 Lr-L	Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R
Pm8 MHD-L–RLRR rev	Cre3 k3 –Pm8 LRR-L	Pm8 MHD-L–RLRR rev
Pm8 LRR-R–Cre3 Lr-L	Pm8 MHD-L–Cre3 P-loop	Cre3 Lr-L–Pm8 LRR-R
Cre3 P-loop–RLRRrev	Cre3 k3–Pm8 LRR-R	Cre3 P-loop–RLRRfor
Cre3 P-loop–RLRRfor	Cre3 P-loop–XLRR rev	Cre3 P-loop–XLRRrev
Pm8 LRR-L–XLRR rev	RLRR rev–RLRR for	Pm8 LRR-L–XLRR rev

Реакційну ПЛР-суміш готували за модифікованою методикою Рьодер [12]. Умови проходження ПЛР описані Ченом [8]. Отримані результати ампліфікації візуалізували методом електрофорезу в 1,9 % агарозному гелі.

Результати та обговорення

У цьому дослідженні за RGAP-праймерами були проаналізовані лінії інтрогресивного походження, геноми яких під час свого формування зазнали геномного шоку. Всі лінії у 2009 році демонстрували стійкість до борошністої роси, на відміну від батьківських форм, що вражаються патогеном. Таким чином, усі відмінності, що спостерігаються у спектрах ліній порівняно із спектрами їхніх батьківських форм, можуть бути асоційовані з ознакою стійкості до борошністої роси. Однак, враховуючи специфіку RGAP методики, необхідно брати до уваги той факт, що ампліфікуватися можуть не лише фрагменти генів стійкості, а й фрагменти їхніх псевдогенів, ге-

нів рецепторних кіназ із LRR регіонами та інші, – тому встановлення зв'язку між наявними компонентами та ознакою потребує подальшого аналізу популяцій, що розщеплюються.

Серед 12 комбінацій, за якими аналізували лінії – похідні Аврозису, вісім показали відмінності у спектрах ліній порівняно до спектрів їхніх батьківських форм. За цими комбінаціями спектри інтрогресивних ліній здебільшого виявили подібність до спектру Аврори, за винятком варіації кількості компонентів та їх присутності/відсутності у певних лініях. Наприклад, для лінії *res143* характерними є унікальні компоненти у спектрах за комбінаціями: Pm8 LRR-R–Cre3 Lr-L (компонент із розміром приблизно 570 п.н.), Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R (компонент із приблизним розміром 580 п.н., дещо довший, ніж такий у спектрі батьківських форм та інших ліній), Pm8 LRR-L–XLRR rev (відсутність одного з мажорних компонентів із розміром 245 п.н., що присутній у спектрах обох батьківських форм

та інших ліній, та наявність трьох відмінних мінорних компонентів із розмірами приблизно 590 п.н., 400 п.н., 350 п.н.), Cre3 k3–Pm8 LRR-L (наявність двох унікальних компонентів: довшого із розміром приблизно у 730 п.н. та коротшого – довжиною 242 п.н.), Cre3 k3–Pm8 LRR-R (наявність двох відмінних компонентів із розміром у межах 750–800 п.н., компонент із довжиною приблизно 750 п.н. також наявний і в двох інших інтрогресивних лініях). Для лінії res113 за комбінацією Cre3 P-loop–RLRR for спектр представлений частиною, ідентичною спектра Аврори, за винятком наявності компонента (розміром приблизно 250 п.н.), відмінного від спектрів батьківських форм та інших ліній. За комбінацією Pm8 MHD-L–Cre3 P-loop спектри всіх трьох ліній виявили відмінності: наявність у всіх лініях довгого компонента (приблизно 730 п.н.) та двох мінорних компонентів, ідентичних до спектру Аврозису, із розміром у 500 п.н. та 147 п.н.; у спектрі лінії res113 наявний ще один компонент (приблизний розмір – 330 п.н.), ідентичний до такого у спектрі Аврозису, та унікальний компонент із розміром приблизно 220 п.н. За комбінацією Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R у всіх лініях, а також у Аврори та амфідиплоїда Аврозису був наявний очікуваний компонент довжиною 474 п.н. За комбінацією Cre3 k3–Cre3 Lr-L спектр Аврозису перекривався із спектром Аврори, але містив менше компонентів, спектри ліній res113 та res141 за кількістю компонентів були подібні до спектру Аврозису.

RGAP аналіз ліній – похідних Авролати, також показав, що спектрам інтрогресивних ліній притаманна подібність до спектру Аврори за всіма RGAP комбінаціями, однак так само їм характерна присутність відмінних компонентів. Спектр Авролати за більшістю комбінацій перекривається зі спектром Аврори, лише у двох комбінаціях (Cre3 Lr-L–Pm8 LRR-R та Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R) у спектрі наявні й відмінні компоненти.

У спектрі Cre3 P-loop–XLRR rev усім лініям характерні компоненти, ідентичні спектрам Аврори та Авролати, окрім 6 ліній, спектри яких мали два компоненти, проти одного у спектрах батьківських форм, із розміром у межах 800 п.н.; три із цих ліній (res207, res 215, res221b) також характеризувалися подвійним компонентом, ідентичним до такого у спектрі Авролати, із розміром 280 та 245 п.н. Спектри усіх ліній за комбінацією Cre3 P-loop–RLRR for характеризуються наявністю основного компонента із розміром

850 п.н. У цілому, спостерігали шість відмінних компонентів у спектрах ліній, два з них були наявні у спектрах 9-ти ліній з 13-ти. Один компонент (важчий від 1kb) був наявний у всіх лініях, крім res166; компонент довжиною приблизно 650 п. н. був наявний у 10 ліній, окрім нього у спектрах двох ліній (res207 та 2599) був наявний компонент масою приблизно 600 п.н. Три лінії (res215, res217, res221z) демонстрували у своїх спектрах компонент, важчий за 900 п.н. Спектр Cre3 Lr-L–Pm8 LRR-R у ліній м'якої пшениці характеризується наявністю таких основних компонентів: групи із 5 близько розташованих компонентів (розмір від 500 до 700 п.н.) та двох окремих компонентів із розмірами 340 та 300 п.н. Виявлено 3 специфічні компоненти у спектрі лінії res216, в її ж спектрі відсутній другий мажорний компонент (приблизно 650 п.н.) із групи основних компонентів. Однаковий важчий компонент (близько 1kb) спостерігався у лініях res212 та res215. Компонент, ідентичний до такого у спектрі Авролати, наявний у геномах трьох ліній (res190, res207, res215). Спектр Аврори за комбінацією Pm8 LRR-L–XLRR rev характеризується наявністю чотирьох основних компонентів (розміром приблизно 320, 350, 550 та 650 п.н.) та двох мінорних. У спектрах ліній за цією комбінацією спостерігається варіабельність за основними компонентами спектру. Так компонент із довжиною 320 п.н. відсутній у двох лініях (res212, res166); компонент із розміром 350 п.н. відсутній у 3 лініях (res216, res221z, res222); компонент із розміром 550 п.н. відсутній у лінії res166, а компонент із масою 650 п.н. відсутній у 3-х лініях (res216, res212, res166). Окрім того, виявлено 4 специфічні компоненти у лініях res221b, res221z; три – у лініях res215, res207; та два – у лініях res217, res206. Електрофореграма продуктів ампліфікації ДНК ліній за цією комбінацією наведена на рис. 1. За спектром Pm8 MHD-L–RLRR rev комбінації спектр Авролати перекривається зі спектром Аврори. Більшість ліній проявляє ідентичність до спектру Аврори, за винятком кількох ліній, що мають відмінні компоненти – це лінія res215, яка має 4 відмінні компоненти, та 5 ліній (res206, res207, res212, res215, res217), що мають один відмінний компонент. У 6 ліній (res166, res190, res206, res216, res222, res254) спостерігалася відсутність частини компонентів, характерних спектру Аврори.

Розроблена нами RGAP комбінація Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R праймерів має очікуваний продукт із розміром 474 п.н. У спектрах, які ми

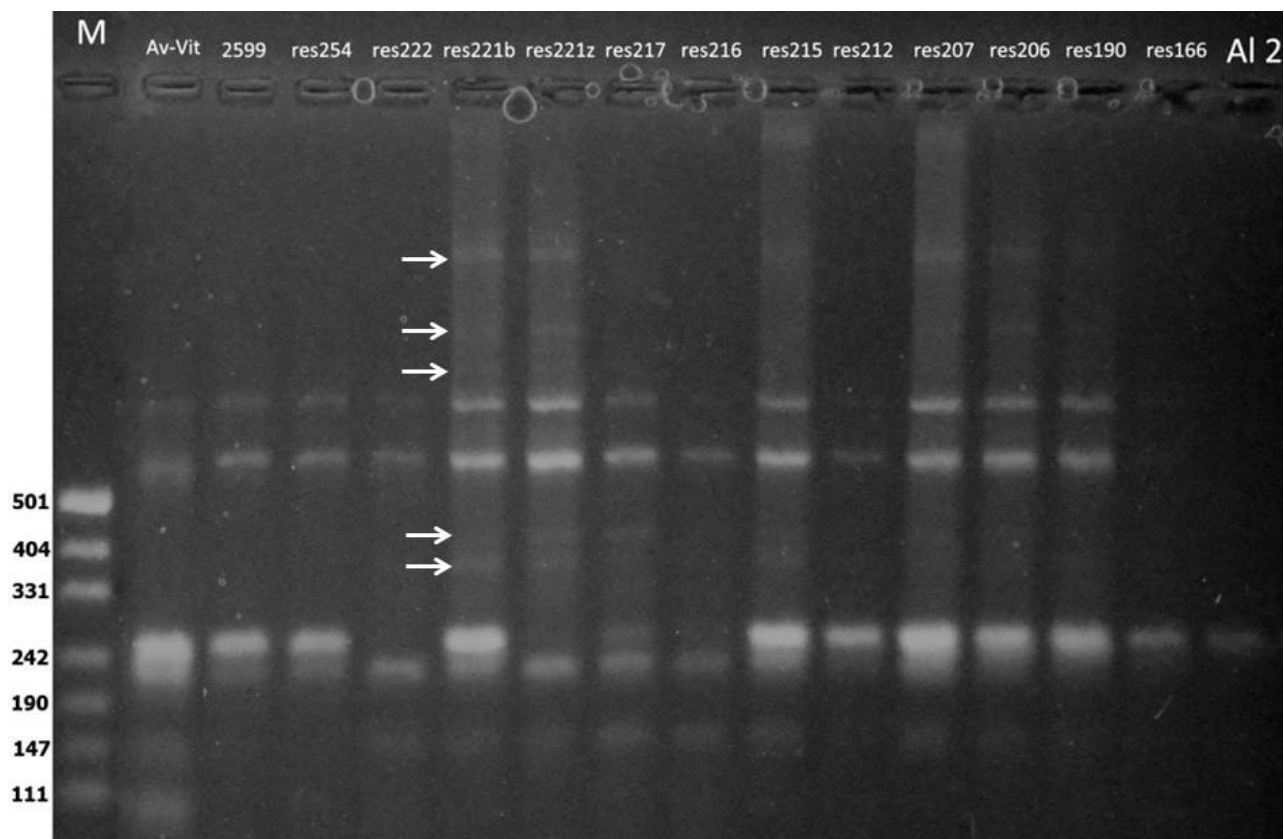


Рис. 1. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК ліній-похідних Авролати за RGAP комбінацією Pm8 LRR-L–XLRR rev. Підписані робочі назви інтрогресивних ліній *res*, Av-Vit – спектр сорту м'якої пшениці Аврора, A12 – спектр амфідиплоїда Авролата. Стрілками вказані компоненти, специфічні для спектрів інтрогресивних ліній

спостерігали у інтрогресивних лініях та їхніх батьківських формах, скрізь був наявний компонент очікуваної довжини – основний компонент. Це свідчить про наявність у їхніх геномах гену Pm8 (оскільки така довжина є очікуваною саме для нього). Окрім того, у спектрах наявні чіткі компоненти, близькі за розміром до основного, що, очевидно, свідчить про наявність інших генів/алелів Pm у досліджуваних генотипах. Якраз за частиною цих компонентів і спостерігається варіабельність поміж лініями (рис. 2). Наприклад, три лінії (*res206*, *res207*, *res212*) демонструють наявність дещо коротшого компонента від основного; у інших трьох лініях (*res190*, *res221b*, 2599) спостерігається присутність компонента трохи довшого від основного. Десять ліній демонстрували у свої спектрах наявність двох компонентів (розміром приблизно 590 і 610 п.н.), ідентичних до таких компонентів у спектрі Авролати, тоді як інші лінії мали лише один (довший) із них, ідентичний до такого у спектрі Аврори. Лінія 2599 має відмінний компонент.

Із даних усіх спектрів, що містили розроблені праймери до частин гена *Cre3* спектрів, можна припустити, що у геномах усіх досліджуваних ліній він присутній. Ген *Cre3* забезпечує стійкість до цист нематод, у геномі пшениці він локалізований на 2DL хромосомі [13].

Наразі, за оцінкою стійкості (2014 рік) резистентних інтрогресивних ліній до борошнистої роси, частина досліджуваних ліній *res* виявила чутливість до захворювання. Серед таких ліній: лінія – похідна Аврозису *res113* (40–60 % ураження) та 8 ліній – похідних Авролати *res166* (20–40 %), *res212* (40 %), *res216* (40 %), *res217* (40 %), *res222* (20–40 %), *res254* (20–40 %), *res221z nal* (=gl-ness) (40 %), *res221bez nal* (40 %). Такі дані свідчать про дві ймовірні причини. По-перше, про виникнення нових рас патогенів, що обійшли наявні гени стійкості у генотипах рослин. По-друге, про те, що у геномах інтрогресивних ліній може продовжуватися транскриптомний шок та зміна стану ДНК, що є характер-

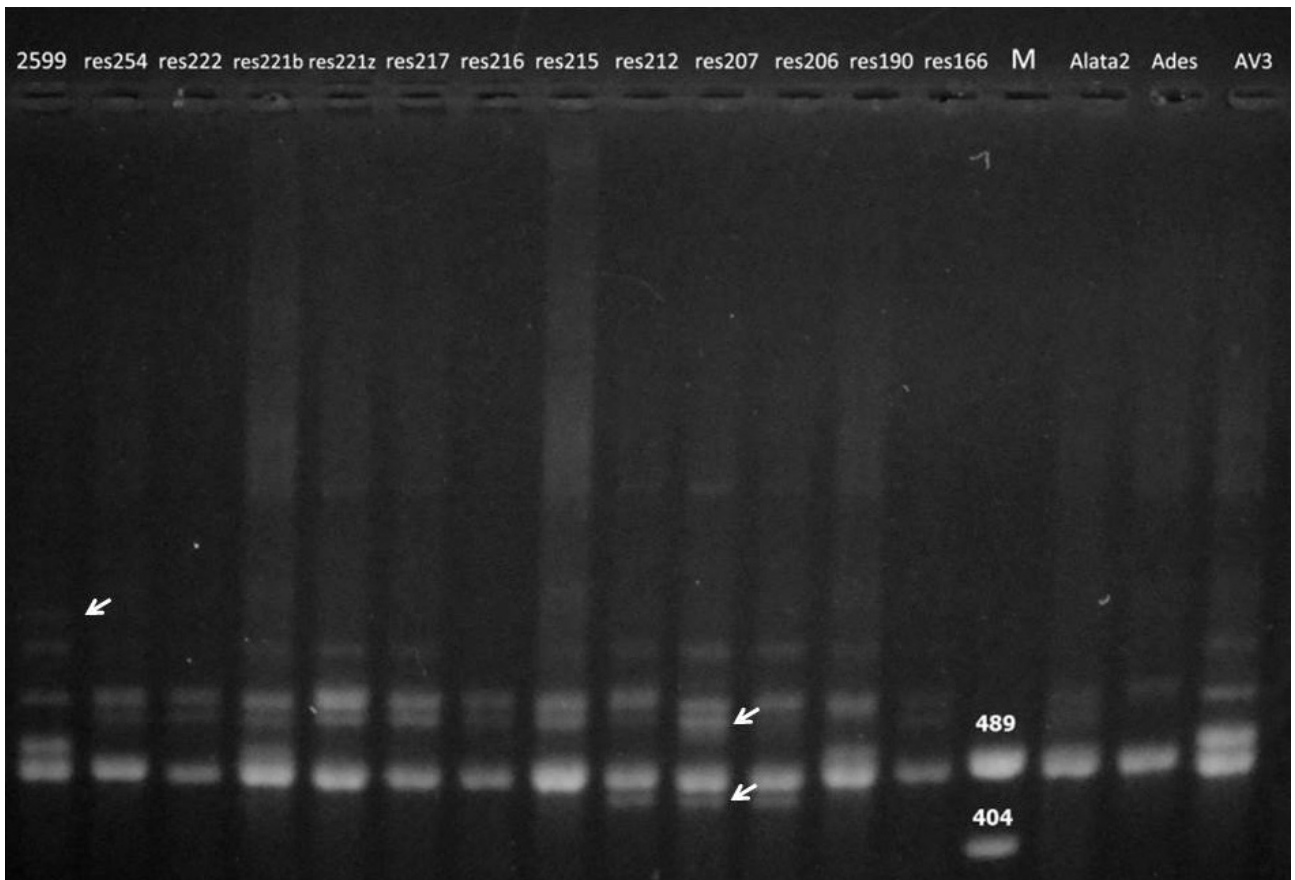


Рис. 2. Електрофоретичний спектр продуктів ампліфікації ДНК ліній-похідних Авролати за RGAP комбінацією Pm8 LRR L–Pm8 LRR R. Підписані робочі назви інтрогресивних ліній res, AV3 – спектр сорту м'якої пшениці Аврора, Alata2 – спектр амфідиплоїда Авролата. Стрілками вказані компоненти, специфічні для спектрів інтрогресивних ліній

ним для нащадків гібридів міжвидового схрещування.

Висновки

Проаналізовані дані свідчать, що у всіх лініях похідних Аврозису та Авролати спостерігаються спектри із відмінними компонентами щодо спектрів їхніх батьківських форм. У всіх досліджуваних лініях за RGAP комбінацією Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R було виявлено очікуваний продукт масою 474 п.н., що, очевидно, вказує на наявність гена Pm8 у геномах усіх ліній. Однак,

стійкість ліній проти польових рас збудника борошнистої роси забезпечується не цим геном, оскільки сорт Аврора та обидва амфідиплоїди, у спектрах яких наявний такий компонент, є чутливими до цього захворювання. Ідентифікована варіабельність за компонентами у спектрах ліній, порівняно із спектрами їхніх батьківських форм, може бути асоційована з ознакою стійкості ліній до борошнистої роси. Встановлення цього зв'язку забезпечить подальший RGAP аналіз популяцій F2 інтрогресивних ліній res, що розщеплюються за ознакою стійкості до борошнистої роси.

ЛІТЕРАТУРА

1. McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards // *Genome Biology*. – 2006. – 7, No 212 – P. 1–11.
2. Srichumpa P., Brunner S., Keller B., Yahiaoui N. Allelic series of four powdery mildew resistance genes at the Pm3 locus in hexaploid bread wheat // *Plant Physiology*. – 2005. – 139. – P. 885–894.
3. Leister D. Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes // *Trends in Genetics*. – 2004. – 20, No 3. – P. 116–122.
4. Michelmore R.W., Meyers B.C. Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and birth-and-death process // *Genome Research*. – 1998. – 8, No 11. – P. 1113–1130.
5. Paape T., Zhou P., Branca A., Briskine R., Young N., Tiffin P. Fine-scale population recombination rates, hotspots, and correlates of recombination in the *Medicago truncatula* genome // *Genome Biology and Evolution*. – 2012. – 4, No 5. – P. 726–737.
6. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – 40, No 15. – e115. – P. 1–12.
7. Koressaar T., Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3 // *Bioinformatics*. – 2007. – 23, No 10. – P. 1289–1291.
8. Chen X.M., Line R.F., Leung H. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis // *Theoretical and Applied Genetics*. – 1998. – 97, No 3. – P. 345–355.
9. Cheng P., Chen X.M. Molecular mapping of a gene for stripe rust resistance in spring wheat cultivar IDO377s // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2010. – 121, No 1. – P. 195–204.
10. Yan G., Chen X. Molecular mapping of the *rps1.a* recessive gene for resistance to stripe rust in BBA2890 barley // *Phytopathology*. – 2007. – 97, No 6. – P. 668–673.
11. Shi Z.X., Chen X.M., Line R.F., Leung H., Wellings C.R. Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust // *Genome*. – 2001. – 44, No 4. – P. 509–516.
12. Röder M.S., Korzun V., Wendehake K. A microsatellite map of wheat // *Genetics*. – 1998. – 149, No 4. – P. 2007–2023.
13. Lagudah E.S., Moullet O., Appels R. Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide binding domain and a leucine-rich region at the *Cre3* nematode resistance locus of wheat // *Genome*. – 1997. – 40, No 5 – P. 659–665.

SHTEFIUK T.V., MYKHAILYK S.YU., ANTONYUK M.Z., TERNOVSKA T.K.

National University of “Kyiv-Mohyla Academy”,

Ukraine, 04070, Kyiv, Skovorody str., 2, e-mail: taniashtefyuk@gmail.com

CHARACTERISTICS OF GENETIC DIVERSITY IN THE INTROGRESSIVE WHEAT LINES BY R GENES CONSERVATIVE REGIONS

Aim. To investigate RGAP spectra of resistant to powdery mildew wheat introgressive lines in order to identify components that can be associated with resistance. **Methods.** Resistance Gene Analog Polymorphism (RGAP) technique.

Results. Introgressive lines originated from Aurolata and Aurosis demonstrate variation in their spectra by 15 RGAP combinations. The expected component (474 bp) from combination Pm8 LRR-L–Pm8 LRR-R was discovered in all lines.

Conclusions. Obviously, the variable components of the spectra are related to introgressive nature of investigated lines and can be associated with resistance to powdery mildew. Probably, both susceptible parental forms and their derivative lines contain *Pm8* in their genomes; therefore, obtained lines' resistance is not provided by this gene.

Keywords: RGAP, introgressive wheat lines, powdery mildew.