

УДК 575+577.1 : 633.1

**ПОЛІМОРФІЗМ МАРКЕРА ГЕНА *TDF\_076\_2D* ПОМІРНОЇ  
СТІЙКОСТІ ПРОТИ ФУЗАРІОЗУ КОЛОСУ СЕРЕД СОРТІВ  
ПШЕНИЦІ М'ЯКОЇ (*TRITICUM AESTIVUM L.*) СТЕПОВОЇ ЗОНИ  
УКРАЇНИ**

**А. В. КАРЕЛОВ**, науковий співробітник,

**Н. О. КОЗУБ**, кандидат біологічних наук, ,

**І. О. СОЗІНОВ**, старший науковий співробітник,

**О. І. БОРЗИХ**, академік НААН,

*Інститут захисту рослин НААН*

**Я. Б. БЛЮМ**, доктор біологічних наук, академік НАН,

*ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки НАНУ»*

*Досліджували 56 сортів озимої пшениці (*Triticum aestivum L.*), створених у Степовій зоні України, за допомогою маркера *INDEL1* на основі послідовності подібного до *NPR1* гена *TDF\_076\_2D*, асоційованого з помірною стійкістю проти фузаріозу колоса за типом II. Визначили асоційований зі стійкістю алель у 40% досліджених сортів. Сорти, у яких був виявлений пов'язаний зі стійкістю алель маркера, можуть використовуватись як джерело помірної стійкості проти фузаріозу.*

**Ключові слова:** *м'яка пшениця, фузаріоз колосу, молекулярні маркери.*

Фузаріоз колоса – небезпечна хвороба злаків, збудниками якої є некротрофні гриби роду *Fusarium* [2, 8, 9, 25]. На території України вони здебільшого представлені видами *F. graminearum*, *F. sambucinum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. sporotrichiella*, *F. moniliforme*, одним із домінуючих видів є *F. graminearum*. [2, 4]. Вірогідність і ступінь ураження й втрати урожаю пшениці від фузаріозу колосу залежать від погодних умов, фізичних параметрів та часу цвітіння рослин кожного сорту [27]. Вважають, що фактори стійкості проти грибів цього роду є здебільшого кількісними

(QTL), що означає їх адитивний ефект і забезпечення лише визначеного відсотку стійкості відносно рослин, які таких факторів не мають [18, 21, 27]. Стійкість проти фузаріозу колосу класифікують так: тип I (стійкість проти первинної інфекції), тип II (стійкість проти поширення симптомів у колосі), тип III (стійкість проти інфікування насінин), тип IV (толерантність) і тип V (стійкість проти токсинів шляхом їх розкладання) [10, 19]. Добре дослідженими джерелами стійкості за типом II є китайські сорти, Sumai-3, Wuhan-1 та Ning 7840: ідентифіковано п'ять регіонів, асоційованих із цим типом стійкості, серед яких головну роль відіграють QTL на хромосомах 3В і 5А, які експресуються за адитивним і домінантним типом [15, 18, 23]. Нещодавно проведено асоціативне картування факторів стійкості серед європейських сортів озимої пшениці за допомогою значної кількості мікросателітних маркерів і виявлено нові локуси, які позитивно чи негативно впливають на стійкість рослин проти грибів роду *Fusarium* [27].

Проводяться дослідження модельних рослин для визначення ролі різноманітних генів, продукти яких мають регуляторні функції, у патогенезі некрототрофів і, зокрема, грибів роду *Fusarium* [12, 13, 20]. 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*) [11, 14, 24]. Було показано, що для рослин виду *Arabidopsis thaliana* функціональний продукт цього гена відіграє ключову роль у експресії генів, що кодують PR-1 та «перемиканні» між зумовленими жасминовою та саліциловою кислотою шляхами захисної відповіді [22, 26]. Також було проведено дослідження ролі *NPR1* у патогенезі грибів роду *Fusarium* шляхом перенесення гена *A. thaliana* у пшеницю й дослідження взаємодії трансгенних рослин із грибами; визначено, що на стадії проростків ген забезпечує підвищену чутливість до *Fusarium asiaticum*, тоді як дорослим рослинам навпаки забезпечує стійкість що свідчить про біфункціональну роль гена в стійкості пшениці [17].

Для помірно стійких до фузаріозу колосу європейських генотипів пшениці Саро та 'SVP72017' було проведено дослідження взаємодії рослин із грибами видів *F. graminearum* та *F. culmorum* на рівні експресії. Визначили зв'язок алельних станів двох подібних до *NPRI* гомеологічних генів на хромосомах 2D і 2A пшениці (*TDF\_076\_2D* та *TDF\_076\_2A*) зі стійкістю за типом II на рівні відповідно 14,2% та 3% [9]. Алельні стани генів відрізняються за трьома інсерціями-делеціями в інтронах. Зокрема, з праймерами, що фланкують першу інсерцію-делецію (починаючи з 5'-кінця гена, далі – *INDEL1*), ампліфікуються фрагменти довжиною 212 п.н. на відповідній ділянці гена *TDF\_076\_2A* в обох алельних станах, проте на ділянці гена *TDF\_076\_2D* у алельному стані, асоційованому з чутливістю (далі – алель 1) утворюються амплікони довжиною 221 п.н.; у випадку алельного стану гена *TDF\_076\_2D*, асоційованого зі стійкістю (далі – алель 2) довжина ампліконів також становить 212 п.н. [9].

**Мета роботи** – охарактеризувати сорти пшениці м'якої української селекції за допомогою маркера гена *TDF\_076\_2D* помірної стійкості проти фузаріозу колосу.

**Матеріали та методи дослідження.** Досліджували зразки ДНК, виділені з зерен 56 сортів пшениці, створених у Селекційно-генетичному інституті Національному центрі сортовивчення НААН України, м. Одеса (далі СГІ). Повний перелік сортів наведений у таблиці. Виділяли ДНК із наважки масою 25-35 мг, отриманої із 5 зерен кожного сорту. Виділення здійснювали за допомогою наборів Diatom™ DNA Prep100 за стандартною методикою. ПЛР проводили на ампліфікаторі 2720 GeneAMP System за допомогою наборів GenPak® PCR Core за методикою виробника. Для визначення алельного стану маркера *INDEL1* використовували пару праймерів INDEL1-F (5'- TCATGCAGTGTGCTTGATCT-3') та INDEL1-R (5'-CCATTCACTTGAGCAACTTCC-3'), із якими отримували продукти довжиною 212 п.н. у випадку алеля 2 і фрагменти довжиною 212 та 221 п.н. – у випадку алеля 1 маркера [23].

Фрагменти, отримані в результаті ПЛР, розділяли у 10%-ному поліакриламідному гелі (ПААГ) і фарбували 0,01%-ним розчином  $\text{AgNO}_3$  за стандартною методикою [5].

**Результати дослідження** наведено в таблиці, а приклад електрофореграми – на рисунку

У 22 досліджуваних сортів був ідентифікований алель, асоційований із помірною стійкістю проти фузаріозу колоса за типом II на рівні 14,2%, що становить близько 40% від досліджених сортів (див. таблицю).

Алельний стан маркера *INDEL1* гена *TDF\_076\_2D* у досліджених сортах

Сорт	Алель маркера	Сорт	Алель маркера
Альбатрос	1	Княгиня Ольга	1
Антонівка	1	Косовиця	1
Безмежна	2	Куяльник	2
Благодарка	1	Ластівка	1
Борвій	2	Леся	2
Бунчук	2	Литанівка	1
Ватажок	1	Ліана	2
Вдала	1	Ліона	1
Вікторія	1	Місія одеська	1
Годувальниця	2	Небокрай	1
Голубка одеська	1	Никонія	1
Господиня	1	Одеська 267	2
Гурт	2	Одеська червоноколоса	2
Дальницька	2	Оксамитна	1
Доброполька	1	Отаман	2
Дюк	1	Писанка	1
Епоха	1	Повага	1
Жайвір	2	Подяка	2
Журавка	2	Польовик	1
Заможність	1	Пошана	1
Запорука	2	Селянка	2
Землячка	1	Сирена	2
Зміна	1	Скарбниця	1
Знахідка одеська	1	Служениця	1
Зорепад	2	Супутниця	2
Зустріч	1	Турунчук	1
Істина	1	Ужинок	2
Кирия	2	Українка одеська	1

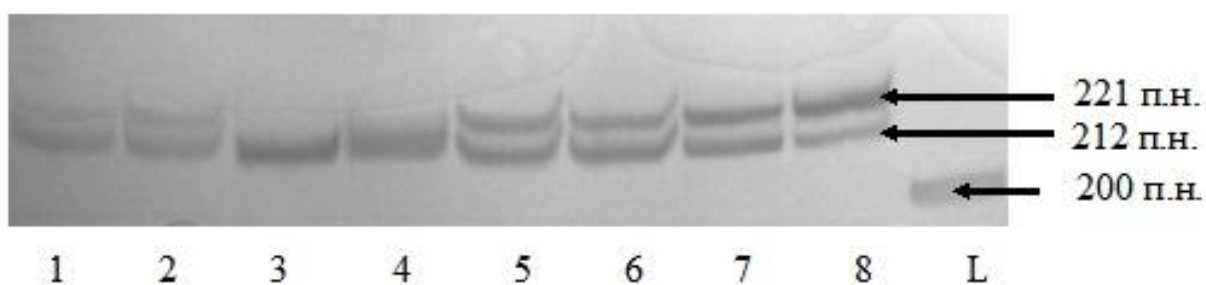


Рис. Електрофореграма із фрагментами, отриманими в результаті ПЛР із праймерами, що фланкують маркер *INDEL1* в 10%-ному ПААГ. 1 – Альбатрос; 2 – Антонівка; 3 – Безмежна; 4 – Знахідка одеська; 5 – Місія одеська; 6 – Косовиця; 7 – Господиня; 8 – Зміна; L – 100 bp ladder (маркер молекулярних мас, ціна поділки – 100 п.н.)

За порівнянням алельного стану маркера із стійкістю/чутливістю сортів, встановленою різними дослідниками фітопатологічним шляхом (безпосередня взаємодія між грибами роду *Fusarium* та рослинами пшениці) [22, 24, 27], чіткої відповідності результатів із алельним станом маркера *INDEL1* не спостерігали. Очевидно, це пов'язано із наявністю інших факторів стійкості/чутливості, які експресувались сильніше в умовах проведених польових тестів. За результатами асоціативного картування вірогідний QTL, зумовлений геном *TDF\_076\_2D*, виявляється за різних умов [27].

Таким чином, хоча алель інтересу дослідженого маркера і гена присутній серед сортів пшениці української селекції, його відбір при створенні нових сортів без тестування за допомогою молекулярно-генетичних методів є проблематичним. Разом із тим алель забезпечує на 14,2% нижче інфікування колосків пшениці грибами роду *Fusarium* порівняно із носіями чутливого алеля, не впливаючи при цьому на інші властивості рослин, як це характерно для надзвичайно стійкого, але непродуктивного сорту Sumai-3 [Dr. George Fedak, особисте повідомлення].

Тринадцять сортів, у яких виявили алель 2 маркера, також несуть пов'язаний зі стійкістю алель молекулярних маркерів гена *Lr34/Yr18/Pm38/Sr57* помірної

стійкості проти іржастих грибів, борошнистої роси та жовтої карликовості ячменю [3, 6]. У 16 сортів, у яких був виявлений алель 2 маркера *INDEL1*, раніше визначили пов'язаний із нечутливістю до токсину А *Pyrenophora tritici-repentis* алель маркера *fcp623* гена *Tsn1* [1].

Отже сорти, у яких був виявлений пов'язаний зі стійкістю алель маркера, можуть використовуватись як джерело помірної стійкості проти фузаріозу та інших фітопатогенів.

### Висновки

1. Алель помірної стійкості II типу проти фузаріозу колосу виявлено у 40% досліджених сортів.
2. Сорти пшениці м'якої української селекції можуть слугувати джерелами комплексної помірної стійкості проти біотрофних та некротрофних фітопатогенів.
3. Варто дослідити окремі сорти за допомогою маркерів, асоційованих із QTL та іншими генами-кандидатами, пов'язаними із цим та іншими типами стійкості для визначення генетичних передумов особливостей взаємодії цих сортів із грибами роду *Fusarium*.

### Список літератури

1. Алельний стан маркерів гена, асоційованого із чутливістю до токсину А *Pyrenophora tritici-repentis* і *Stagonospora nodorum*, серед сортів м'якої пшениці степової зони України / А.В. Карелов, Н.О. Козуб, І.О. Созінов, О.О. Созінов // Захист і карантин рослин. – 2014. – Вип. 60 – С. 106–113.
2. Грицюк Н.В. Стійкість сортів пшениці озимої проти фузаріозних інфекцій за різних строків ураження / Н.В. Грицюк // Карантин і захист. – 2013. № 10. С. 1–3.
3. Идентификация аллельного состояния гена устойчивости к бурой ржавчине *Lr34* у сортов озимой мягкой пшеницы украинской селекции / А.В.

Карелов, Я.В. Пирко, Н.А. Козуб [и др.] // Цитология и генетика. – 2011. – Т. 45, №5. – С. 3–10.

4. Ковалишина М. Хвороби колосу у озимой пшениці лісостепу України / М. Ковалишина, Л.А. Мурашко, А.Б. Ковалишин // Вісник українського товариства селекціонерів і генетиків. – 2008. – Т. 6, № 2. – С. 223–239.

5. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: пер. с англ. / Т.Маниатис, Э. Фитч, Дж. Сэмбрук – М.: Мир, 1984. – 480 с.

6. Характеристика українських сортів м'якої пшениці (*Triticum aestivum* L.) за допомогою новітніх молекулярних маркерів генів помірної стійкості проти іржастих грибів / А.В. Карелов, Н.О. Козуб, І.О. Созінов [та ін.] // Захист і карантин рослин. – 2013. – Вип. 59, – С 128–137.

7. Яринчин А.М. Стійкість сортів озимой пшениці проти ураження збудниками фузаріозу колосу / А.М. Яринчин // Захист і карантин, 2009. – №4. – С. 13–15.

8. An adaptive evolutionary shift in *Fusarium* head blight pathogen populations is driving the rapid spread of more toxigenic *Fusarium graminearum* in North America / T.J. Ward, R.M. Clear, A.P. Rooney [et al.] // Fungal Genet Biol. – 2008. – Vol. 45, No 4. P. – 473–484.

9. Association of allelic variation in two *NPR1*-like genes with *Fusarium* head blight resistance in wheat / M. Diethelm, M. Schmolke, J. Groth [et al.] // Mol Breeding. – 2014. – Vol. 34, Iss. 1. – P. 31–43.

10. Bai. G. Management and resistance in wheat and barley to *Fusarium* head blight / G. Bai, G. Shaner // Annu. Rev. Phytopathol. – 2004. – Vol. 42. – P. 135–161.

11. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance / [H. Cao, S.A. Bowling, A.S. Gordon, X. Dong] // Plant Cell. – 1994. – Vol. 6. – P. 1583–1592.

12. Characterization of the defense transcriptome responsive to *Fusarium oxysporum*-infection in *Arabidopsis* using RNA-seq / Q.-H. Zhu, S. Stephen,

K. Kazan [et al.] // Gene. – 2012. – (электронный ресурс, доступный онлайн за адресою: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.10.036> )

13. Comparative analysis of PR gene expression in tomato inoculated with virulent *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and the biocontrol strain *F. oxysporum* Fo47 / [S. Aime, C. Cordier, C. Alabouvette, C. Olivain] // Physiological and Molecular Plant Pathology. – 2008. – Vol. 73. – P. 9–15.

14. Delaney T.P. *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance / T.P. Delaney, L. Friedrich, J.A. Ryals // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1995. – Vol. 92. – P. 6602–6606.

15. Detection of QTL linked to *Fusarium* head blight resistance in Sumai 3-derived North Dakota bread wheat lines / I.A. del Blanco, R.C. Froberg, R.W. Stack [et al.] // Theor Appl Genet. – 2003. – Vol. 106, No 6. – P. 1027–1031.

16. Genetic dissection of a major *Fusarium* head blight QTL in tetraploid wheat / C.D. Otto, S.F. Kianian, E.M. Elias [et al.] // Plant Molecular Biology. – 2002. – Vol. 48. – P. 625–632.

17. Inverse effects of *Arabidopsis NPR1* gene on fusarium seedling blight and fusarium head blight in transgenic wheat / C.-S. Gao, X.-J. Kou, H.-P. Li [et al.] // Plant Pathology. – 2013. – Vol. 62, Iss. 2. – P. 383–392.

18. Liu.S. Marker assisted evaluation of *Fusarium* head blight resistant wheat germplasm / S. Liu, J. A. Anderson // Crop Science. – Vol. 43, No. 3. – P. 760–766.

19. Mesterhazy A. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat / A. Mesterhazy // Plant Breeding. – 1995. – Vol. 114, Iss. 5. – P. 377–386.

20. Mutations in the *Arabidopsis* homoserine kinase gene *DMR1* confer enhanced resistance to *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* / H.C. Brewer, N.D. Hawkins, K.E Hammond-Kosack // BMC Plant Biology. – 2014. – Vol.14. (электронный ресурс, доступный онлайн за адресою: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/14/317> )



21. Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding / [A. Mesterhazy, T. Bartok, C. G. Mirocha, R. Komoroczy] // Plant Breeding. – 2008. – Vol. 118. – P. 97–110.
22. *NPR1* modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol / S.H Spoel, A. Koornneef, S.M.C. Claessens [et al.] // The Plant Cell. – 2003. – Vol. 15. – P. 760–770.
23. RLFP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat / B. L. Waldron, B. Moreno-Sevilla, J. A. Anderson // Crop Science. – 1999. – Vol. 39. – P. 805–811.
24. Shah J. Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene / J. Shah, F. Tsui, D.F. Klessig // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1997. – Vol. 10. – P. 69–78.
25. Snijders C.H.A. Effects of head blight caused by *Fusarium culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels / C.H.A. Snijders, J. Perkowski // Phytopathology. – 1990. – Vol. 79. – P. 455–469.
26. The coactivator function of *Arabidopsis NPR1* requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines / A. Rochon, P. Boyle, T. Wignes [et al.] // The Plant Cell. – 2006. – Vol. 18. – P. 3670–3685.
27. Whole genome association mapping of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.) / S. Kollers, B. Rodemann, J. Ling [et al.] // PLoS ONE – 2013. – Vol. 8, Iss. 2. – e57500. doi:10.1371/journal.pone.0057500.

**ПОЛИМОРФИЗМ МАРКЕРА ГЕНА *TDF\_076\_2D* УМЕРЕННОЙ  
УСТОЙЧИВОСТИ К ФУЗАРИОЗУ КОЛОСА СРЕДИ СОРТОВ  
ПШЕНИЦЫ МЯГКОЙ (*TRITICUM AESTIVUM* L.) СТЕПНОЙ ЗОНЫ  
УКРАИНЫ**

**А.В.Карелов, Н.А.Козуб, И.А.Созинов, А.И. Борзых, Я.Б.Блюм**

*Исследовали 56 сортов озимой пшеницы (Triticum aestivum L.), созданных в Степной зоне Украины, при помощи маркера INDEL1 на основе последовательности подобного NPR1 гена TDF\_076\_2D, ассоциированного с умеренной устойчивостью к фузариозу колоса по типу II. Определена ассоциированная с устойчивостью аллель у 40% исследованных сортов. Сорта, у которых была выявлена связанная с устойчивостью аллель маркера, могут быть использованы как источники умеренной устойчивости к фузариозу.*

**Ключевые слова:** *мягкая пшеница, фузариоз колоса, молекулярные маркеры*

**POLYMORPHISM OF THE *TDF\_076\_2D* GENE CONFERRING  
MODERATE *FUSARIUM* HEAD BLIGHT RESISTANCE AMONG  
COMMON WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) CULTIVARS OF THE  
STEPPE ZONE OF UKRAINE**

**A.V. Karelov, N.A. Kozub, I.A. Sozinov, A.I. Borzykh,**

**Yu.B. Blume**

*Fifty six common wheat (Triticum aestivum L.) cultivars developed in the Steppe zone of Ukraine were studied using the marker INDEL1 on the basis of the sequence of NPR1-like TDF\_076\_2D gene associated with moderate type II Fusarium head blight resistance. We discovered the resistance associated allele in 40% of the cultivars studied. The cultivars with the resistance associated allele of the marker may be used as the source of moderate resistance against Fuasarium head blight.*

**Key words:** *common wheat, Fusarium head blight, molecular markers*