

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 vulgare*) 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 листові іржі, стеблові іржі 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 ХХ 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 – домінуючий ген, оригінальним джерелом якого є сорт ячменю Kindred [2]. Оскільки він забезпе-

чував 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 фосфорилується вже через 5 хв. після інокуляції авірулентними урединоспорами, що нашоухує на думку про його роль у ранній відповіді на інфекцію стебловою 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.

## Матеріали і методи

У роботі було використано зразки 60 сортів ярого ячменю вітчизняної селекції, отриманих в Селекційно-генетичному інституті – Національному центрі насіннєзнавства та сортовивчення НААН України. Як контроль використовували канадські сорти ячменю: для виявлення «стійкого» алеля – Oxbow і Bonanza; для аналізу наявності «чутливого» алеля – Harrington і Hiproly.

ДНК виділяли з насіння за допомогою набору NeoPrep<sup>50</sup>DNA (NEOGENE<sup>®</sup>) за інструкцією виробника. Для ідентифікації «стійкого» алеля за допомогою ПЛР використовували праймери з наступними нуклеотидними послідовностями: форвардний праймер RPG1RF – (GGCTAATCASCATCAAGTAA), реверсний праймер RPG1RR – (TTCTCCATTGTCCAACCTC). Довжина продукту ампліфікації – 610 п.н. Для ідентифікації «чутливого» алеля були задіяні наступні праймери: форвардний – RPG1SF (GGCTAATCASCATCAAGGTT) та реверсний – RPG1SR (CCACGACCAATTATGTTCTG). Довжина продукту ампліфікації – 487 п.н. [5]

Реакційна суміш об'ємом 25 мкл для визначення наявності «стійкого» алеля містила 0,1% БСА, 10 мМ Тріс-НСL, рН 8,8, 50 мМ КСL, 1,125 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мкМ дНТФ, 1 пМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК полімерази (Fermentas) і 60–100 нг ДНК, а для встановлення наявності «чутливого» алеля: 10 мМ Тріс-НСL, рН 8,8, 50 мМ КСL, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мкМ дНТФ, 10 пМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК полімерази

(Fermentas), і 60–100 нг ДНК. Параметри режиму для проведення ампліфікації (Thermal cycler 2720 Applied Biosystems) були наступними: 94 °С – 4 хв; 35 циклів: 94 °С – 30 с., 56 °С – 45 с., 72 °С – 60 с.; 72 °С – 10 хв.

Продукти ампліфікації візуалізували за допомогою бромистого етидію в 1,5%-ному агарозному гелі.

## Результати та обговорення

Згідно проведеного аналізу 60-ти сортів ярого ячменю вітчизняної селекції було встановлено, що жоден сорт не є носієм «стійкого» алеля гена *Rpg1*. Отриманий результат є доволі очікуваним, оскільки в Україні відсутнє широке розповсюдження вірулентних рас стеблової іржі, що складають епідеміологічну загрозу, і тому направлена селекція на отримання стійких сортів ячменю в минулому не здійснювалась. Лише у 16 сортах був виявлений чутливий алель гена *Rpg1*. Більшість з них походять від сортів ячменю одеської селекції. На рисунку наведена електрофореграма продуктів ПЛР для детекції «чутливого» алеля гена *Rpg1* частини сортів, для яких проводився відповідний аналіз.

Узагальнені дані щодо аналізу алельного стану українських сортів ячменю наведено нижче в таблиці. Варто зазначити, що «чутливий» алель, знайдений нами в українських сортах, не обов'язково є ідентичним за походженням до «чутливого» алеля, який був виявлений в канадських чи американських сортах [5].

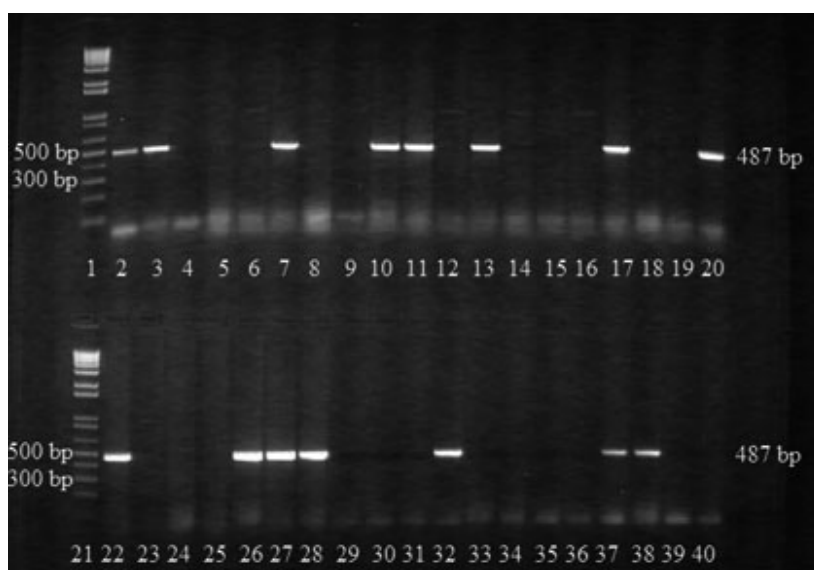


Рис. Продукт ампліфікації фрагмента гена *Rpg1* («чутливий» алель): 1, 21 – маркери молекулярної маси, 2 – сорт Harrington, 3 – сорт Hiproly, 4 – негативний контроль, 7 – Одеський 9, 10 – Южний, 11 – Степовий, 13 – Одеський 36, 17 – Одеський 69, 20 – Нутанс 518, 22 – Дружба, 26 – Романтик, 27 – Тайфун, 28 – Одеський 115, 32 – Паллідум 107, 37 – Переможний, 38 – Гамбринус

Таблиця. Алельний стан гена Rpg1 у досліджених сортів ячменю

Сорт	Алельний стан гена Rpg1	Сорт	Алельний стан гена Rpg1	Сорт	Алельний стан гена Rpg1
Паллідум 32	відсутні алелі	Романтик	-	Зоряний	відсутні алелі
Медікум 46	відсутні алелі	Тайфун	-	Південний	-
Одеський 9	_*	Одеський 115	-	Гетьман	відсутні алелі
Одеський 14	відсутні алелі	Итиль	відсутні алелі	Оболонь	відсутні алелі
Одеський 18	відсутні алелі	Прерія	відсутні алелі	Чудовий	відсутні алелі
Южний	-	Рось	відсутні алелі	Вакула	відсутні алелі
Степовий	-	Паллідум 107	-	Селеніт	відсутні алелі
Нутанс 106	відсутні алелі	Одеський 131	відсутні алелі	Чарівний	відсутні алелі
Одеський 36	-	Одеський 151	відсутні алелі	Казковий	-
Чорноморець	відсутні алелі	Гермес	відсутні алелі	Водограй	відсутні алелі
Нутанс 244	відсутні алелі	Престиж	відсутні алелі	Геліос	відсутні алелі
Славутич	відсутні алелі	Дерибас	відсутні алелі	Командор	відсутні алелі
Одеський 69	-	Переможний	-	Еней	відсутні алелі
Одеський 70	відсутні алелі	Гамбринус	-	Всесвіт	відсутні алелі
Одеський 82	відсутні алелі	Едем	відсутні алелі	Святогор	відсутні алелі
Нутанс 518	-	Сталкер	відсутні алелі	Воєвода	відсутні алелі
Дружба	-	Незалежний	відсутні алелі	Лука	відсутні алелі
Одеський 100	відсутні алелі	Адапт	відсутні алелі	Аватар	відсутні алелі
Вестник	відсутні алелі	Галатея	відсутні алелі	Галичанин	-
Одеський 111	відсутні алелі	Галактик	відсутні алелі	Мерлін	відсутні алелі

Примітка: \* – позначено «чутливий» алель.

Тут мається на увазі, що тринуклеотидна інсерція, що відрізняє «чутливий» алель гена Rpg1 від «стійкого», може бути притаманна всім варіантам гена Rpg1, які не надають стійкості до високовірulentних рас стеблової іржі чи інших хвороб, але білковий продукт цього гена конститутивно використовується так чи інакше в сигнальних шляхах активації імунітету рослин. Більшість з наведених в таблиці сортів, для яких доведена наявність «чутливого» алеля, мають у своїх родоводах сорт Одеський 9 та сорт Одеський 115. Хоч джерело знайденого «чутливого» алеля в цих двох сортах невідоме, можна припустити, що батьківські форми ячменю, використані при виведенні цих двох сортів, могли взагалі не мати «стійкого» алеля гена Rpg1. Так поява стійкості в культурі, яка дала початок сорту Kindred, як наслідок випадкової мутації, є швидше виключенням, ніж правилом для культурних рослин. Адже мало ймовірно, що в природних популяціях злакових за умов постійного тиску патогену існує лише один варіант захисту від нього. Нині зрозуміло, що виявлення нових генів на зразок

Rpg1, який навряд чи є високо поліморфним за своєю природою, і який з певною мірою впевненості можна віднести до генів «горизонтальної» стійкості, поглибить розуміння механізмів імунного захисту рослин, і надасть можливість створювати сорти з довготривалою стійкістю до широкого кола хвороб.

#### Висновки

У результаті проведеного аналізу сортів ячменю української селекції на наявність та встановлення алельного стану гена Rpg1, який забезпечує стійкість до одного з найнебезпечніших для врожаю зернових збудників стеблової іржі – *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* – визначено, що жоден досліджений сорт не містить «стійкого» алеля цього гена, натомість 16 сортів містять «чутливий» алель. Аналіз їх родоводів вказує на спорідненість цих сортів за ідентифікованим «чутливим» алелем. Найбільш вірогідними сортами, від яких вони могли успадкувати «чутливий» алель гена Rpg1, є Одеський 9 та Одеський 115. Отримана інформація вказує на потребу залучення нових джерел стійкості до стеблової іржі при прове-

денні селекційної роботи з вітчизняними сортами ячменю, оскільки в разі загрози епіфітотій (у зв'язку з поступовою зміною клімату), може

постраждати значна частина врожаїв цієї широко культивованої в Україні рослини.

### Література

1. Schumann G.L., Leonard K.J.. Stem rust of wheat (black rust) [Електронний ресурс] // The Plant Health Instructor. – 2000. – Режим доступу: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/StemRust.aspx>
2. Steffenson B.J. Analysis of durable resistance to stem rust in barley // *Euphytica*. – 1992. – 63. – P. 153–167.
3. Nirmala J., Brueggeman R., Maier C., Clay C., Rostoks N., Kannangara C.G., von Wettstein D., Steffenson B.J., Kleinhofs A. Subcellular localization and functions of the barley stem rust resistance receptor-like serine/threonine-specific protein kinase Rpg1 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2006. – 103. – P. 7518–7523.
4. Stam M., Mol J.N.M., Kooter J.M. Review article: The silence of genes in transgenic plants. // *Ann. Bot.* – 1997. – 79. – P. 3–12.
5. Eckstein P., Rosnagel B., Scoles G. Allele-specific markers within the barley stem rust resistance gene (Rpg1) [Електронний ресурс] // *Barley Genetics Newsletter*. – 2003. – 33. – Режим доступу: <http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/bgn/33/PE1TXT.htm>
6. Brueggeman R., Rostoks N., Kudrna D., Kilian A., Han F., Chen J., Druka A., Steffenson B., Kleinhofs A. The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – 99. – P. 9328–9333.

### IVASCHUK B.V., PIRKO YA. V., BLUME YA.B.

*Institute of Food Biotechnology and Genomics, Natl. Acad. Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osypovskogo str., 2a, e-mail: yavp@mail.ru*

### IDENTIFICATION OF RPG1 GENE ALLELIC VARIATIONS IN THE UKRAINIAN BARLEY CULTIVARS

**Aim.** Because of providing a valuable resistance to the different pathotypes of stem rust just gene Rpg1 was selected for the molecular analysis. Determination of Rpg1 gene presence and its allelic condition in the Ukrainian barley cultivars were the objectives of this work. **Method.** Sixty spring *Hordeum vulgare* variety were chosen for the analysis. The PCR with specific primer were used to distinguish different allele of resistance. **Results.** Analysis of sixty Ukrainian barley cultivars defined that no one had the Rpg1 gene «resistant» allele. Also, «susceptible» allele was presented only in sixteen cultivars. The pedigree analysis indicates the kinship between the barley samples with the «susceptible» allele. Odesskaya 9 and Odesskaya 115 are the most reliable cultivars of all that could be the origins of «susceptible» allele. But there is no data that these cultivars were crossed with the foreign resistance sources. So it could be another variant of Rpg1 «susceptible» allele that is somehow involved in the signaling plant immunity pathway. **Conclusion.** Spring barley is a wide grown plant in Ukraine and the gradual global climate changes might be a cause of stem rust epidemic emergence in this country. It is necessary that new resistance cultivars of barley are produced in order to avoid future barley harvest loss.

**Key words:** barley, stem rust, Rpg1 gene, susceptible and resistant alleles.

### УДК 575.17 + 575.174.015.3

КОЗУБ Н.О.<sup>1,2</sup>, СОЗІНОВ І.О.<sup>1</sup>, БІДНИК Г.Я.<sup>1,2</sup>, ДЕМ'ЯНОВА Н.О.<sup>1,2</sup>, СОЗІНОВ О.О.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: sia1@i.com.ua

<sup>2</sup> ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»,

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

### РІЗНОМАНІТНІСТЬ ЗА ЛОКУСАМИ ЗАПАСНИХ БЛІКІВ ПОПУЛЯЦІЙ *AEGILOPS BIUNCIALIS* VIS. ЗАХІДНОГО УЗБЕРЕЖЖЯ КРИМУ

Дикі види є важливим джерелом для збагачення генофонду культурної пшениці за

генами стійкості до абіотичних та біотичних факторів та генами інших господарчо-важливих