

ВИКОРИСТАННЯ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ NB ДОМЕНА БІЛКІВ КЛАСУ NB-LRR ДЛЯ СКРИНІНГУ ГЕНІВ СТІЙКОСТІ ДО СТЕБЛОВОЇ ІРЖІ

Стеблова іржа – це хвороба злаків, причиною якої є біотрофний гриб *Puccinia graminis*, яка у роки епіфітотії може призводити до значних втрат врожаю. Поява нового агресивного штаму Ug99 цього фітопатогенного гриба та його поширення з Уганди до Африки та Близького Сходу поставили світове виробництво зернових під загрозу, оскільки на сьогодні до нього не мають стійкості близько 70 % усіх сортів пшениці та ячменю [1]. Найбільш ефективним способом боротьби зі стебловою іржею є пірамідування відповідних генів стійкості. Наразі відомо приблизно про шістьдесят генів стійкості до стеблової іржі, та лише близько десяти з них є ефективними проти Ug99 [2]. Варто зазначити, що до появи штаму Ug99 не було спроб ідентифікувати ці гени стійкості та з'ясувати більш точно їх функції. Але після того, як нещодавно було клоновано гени *Sr33*, *Sr35*, *Sr2* та *Sr50* [3–6], стало відомо, що продукти цих генів належать до класу лейцин-багатих нуклеотид-зв'язуючих (nucleotide-binding leucine rich repeat – NB-LRR) внутрішньоклітинних білкових рецепторів рослин і є основою специфічної стійкості до стеблової іржі. У той же час з'ясувалося, що *Sr2* насправді є кластером генів, що кодує гермін-подібні білки (germin-like protein – GLPs), які забезпечують загальну стійкість до різних патогенів [6]. Крім цього, встановлено, що продукти генів стійкості до стеблової іржі *Rpg5* та *RG1* ячменю теж належать до класу лейцин-багатих нуклеотид-зв'язуючих білків [7, 8]. Також нами було встановлено [9], що схожі послідовності нуклеотид-зв'язуючих доменів білків цих генів наявні у пшениці та інших злаках. Висока консервативність більшості каталітичних мотивів NB-вмісних білків та можливість спільного походження генів стійкості до стеблової іржі у пшениці та ячменю, роблять можливим використання цих послідовностей для пошуку нових генів. Метою нашої роботи став скринінг нових генів стійкості до стеблової іржі у пшениці, із використан-

ням послідовності нуклеотид-зв'язуючих доменів білків генів *Rpg5*, *RG1* та їх гомологів.

Матеріали і методи

Для ідентифікації нових генів стійкості до стеблової іржі були синтезовані нові вироджені праймери:

F1PKRPG5: 5' TTAAAGGNTGGATHGARGAGAA 3'
R1PKRPG5: 5' TGTCITCYTCNACRCARTARCC 3'

Для дизайну праймерів використовували множинне вирівнювання лейцин-багатих нуклеотид-зв'язуючих частин послідовностей відповідних білків, ідентифікованих в попередній роботі [9]. У подальших експериментах було використано 20 сортів пшениці закордонного та вітчизняного походження. Насіння зразків пророщували в горщиках при кімнатній температурі та звичайному восьмигодинному світловому режимі. ДНК та РНК зі зразків виділяли згідно з обраними методиками [10], кДНК отримували з РНК за стандартною методикою [10]. ПЛР проводили, використовуючи 2,5 мкл TaqBuffer10x, 2 мкл 25мМ MgCl₂, 0,2 мкл 25 мМ ДНТф, 1 мкл 10 пМ Forward праймера, 1 мкл 10 пМ Reverse праймера, 1,25 од. полімерази; загальний об'єм реакції складав 25 мкл. Режим ампліфікації був: 95°C – 5 хв; 20 циклів денатурація 95°C – 1 хв, відпал 63°C з пониженням на 0,2°C за цикл, елонгація 72°C – 2 хв 30 с; 72°C – 30 хв для утворення поліА кінців. Отриманий ПЛР продукт розділяли в 1,5 %-ному агарозному гелі в 1xTAE буфері за напруги 150 В протягом 1,5 год. Фрагменти з відповідною молекулярною масою вирізали, виділяли з агарози за допомогою GeneJET Gel Extraction kit згідно з інструкцією виробника. Очищений ПЛР продукт клонували у вектор pTZ57R/T за допомогою набору InsTAclone PCR Cloning Kit за інструкцією. Компетентні клітини штаму DH5a *E. coli* трансформували відповідно до обраної методики [10]. Отримані трансформанти відбирали, колонії дорощували в 15 мл середовища LB при 37°C, плазмідну ДНК виділяли шляхом лужного лізису [10]. Для відокремлення

вставки від вектора використовували ендонуклеази рестрикції *Bam*HI та *Eco*RI. Аналіз проводили за допомогою електрофорезу в агарозному гелі (описано вище). Зразки, які містили вставку, відбирали та сіквенували на генетичному аналізаторі ABI Prism 3130 (США). Отримані послідовності фрагментів використовували для BLAST геномного пошуку схожих послідовностей у *Triticum aestivum*, *Aegilops taushii*, *T. urartu*. Високоідентичні послідовності відбирали та використовували для філогенетичного аналізу. Філогенетичний аналіз виконували, використовуючи пакет програм MEGA6.06 [11]. Для перевірки надійності розміщення OTUs (Operational Taxonomic Units) виконували бутстреп тест (1000 повторів). Розрахунок еволюційних відстаней виконували, використовуючи метод Джона-Тейлора-Торнтонна (JTT) [12]. Древа будували за допомогою методу приєднання сусідів [13].

Результати та обговорення

Завдяки використанню вироджених праймерів, розроблених на основі амінокислотних послідовностей нуклеотид-зв'язуючих доменів білків генів стійкості до стеблової іржі, було виявлено фрагменти нових, неанотованих генів (рис. 1). Загалом було отримано два амплікони з використанням як матриці кДНК та три амплікони з використанням як матриці ДНК. Приблизний розмір фрагментів кДНК складав 700–800 пар нуклеотидів, а фрагментів ДНК – 1200–1400 пар нуклеотидів. Отримані ПЛР продукти клонували в бактеріальних клітинах, а виділену плазмідну ДНК з ПЛР вставками секвенували. У результаті було отримано послідовності ампліфікованих фрагментів можливих генів стійкості до стеблової іржі.

Далі, використовуючи як запит відсеквеновані послідовності, виконали пошук високоідентичних послідовностей в геномах *T. aestivum*, *T. urartu*, *Ae. taushii*. Було виявлено, що послідовності **cDnaWheat1**, **DnaWheat2.1**, **Wheat1.1** добре кластеризуються лише з послідовностями, що були знайдені в геномі *T. aestivum* (рис. 2). Послідовність **cDnaWheat2** більш схожа до послідовностей *T. urartu* (рис. 2). Послідовність **DnaWheat2** має високоідентичні послідовності в усіх трьох досліджених геномах (рис. 2). Було помічено, що серед знайдених послідовностей є послідовності, які розташовані на невеликій відстані одна від одної (десятьки тисяч пар нуклеотидів). Це добре помітно для послідовностей в кладограмі **DnaWheat2.1**. (рис. 2).

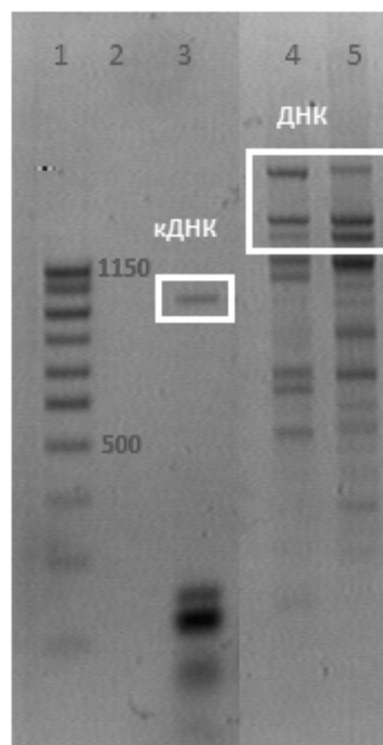


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагментів NB доменів гомологів генів стійкості до стеблової іржі пшениці. 1 – маркер молекулярної маси; 3 – ПЛР фрагмент, отриманий з використанням як матриці кДНК пшениці; 4, 5 – ПЛР фрагменти, отримані з використанням як матриці ДНК пшениці

Спираючись на карту локусів стійкості до Ug99 [14] розроблену для пшениці, можна стверджувати, що розташування **DnaWheat2.1** співпадає з одним із таких локусів на хромосомі 7A. Крім цього, одна з високоідентичних послідовностей до **DnaWheat2.1**, яка розташована на цій же хромосомі, знаходиться дуже близько біля локусу гена *Sr22*, і можливо ці послідовності мають спільне походження. Нещодавно отримані дані по локусам з генами *Sr33*, *Sr35* та *Sr50* вказують на значну кількість паралогів цих генів.

Так, біля гена *Sr33* було виявлено сім генів класу CC-NB-LRR. Два з них виявились ортологами генів *Mla* синтетичного локусу ячменю. *Mla* гени в свою чергу пов'язані зі стійкістю до борошністої роси [4]. Також при пошуку гена *Sr35* було виявлено п'ять інтактних генів класу CC-NB-LRR та два псевдогени, які знаходились недалеко від нього [5]. Згодом була показана наявність семи генів класу CC-NB-LRR, розташованих на невеликій відстані від гена *Sr50* [3]. Ці дані вказують на можливу участь гена, частиною

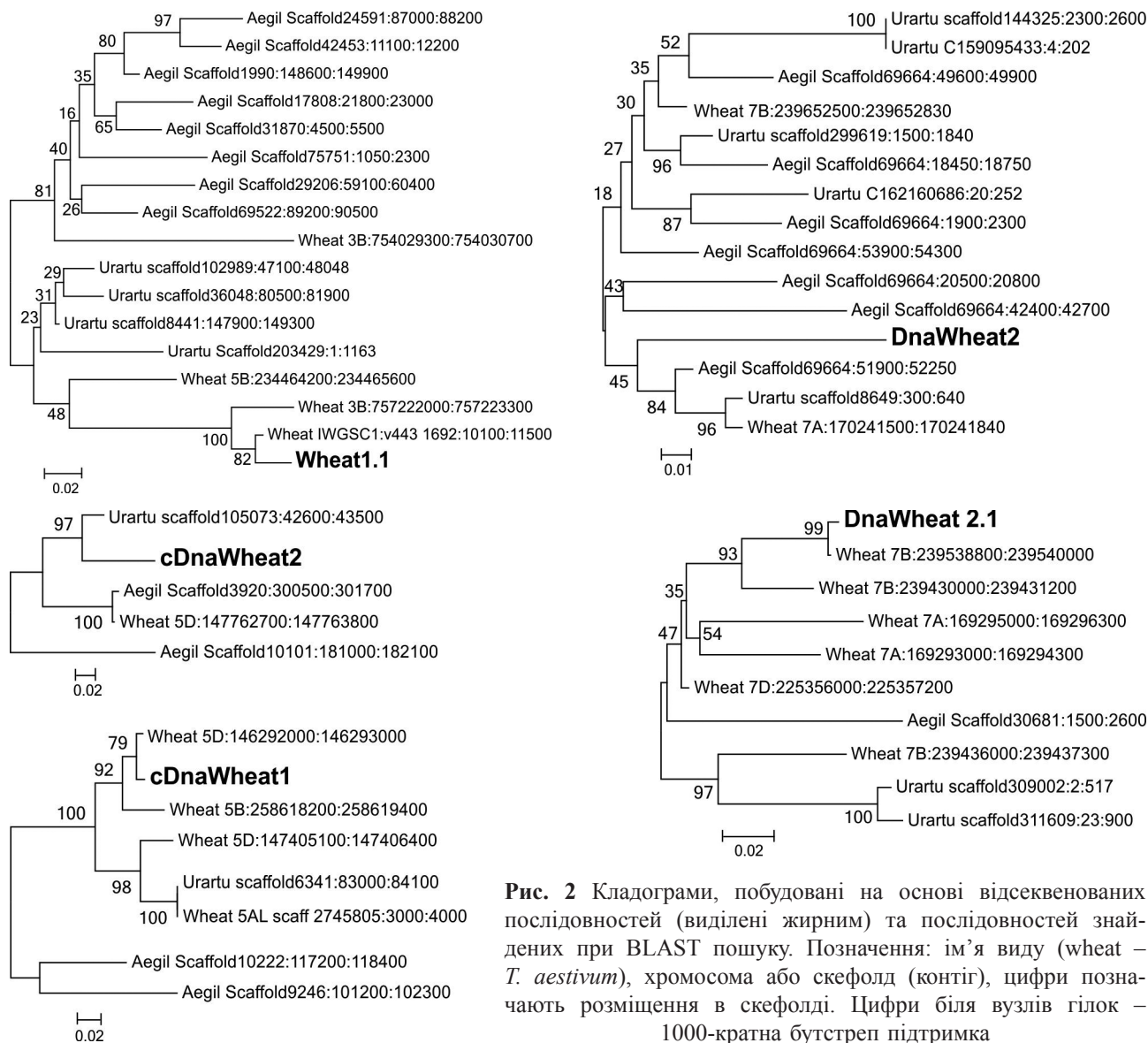


Рис. 2 Кладограми, побудовані на основі відсеквенованих послідовностей (виділені жирним) та послідовностей знайдених при BLAST пошуку. Позначення: ім'я виду (wheat – *T. aestivum*), хромосома або скефолд (контіг), цифри позначають розміщення в скефолді. Цифри біля вузлів гілок – 1000-кратна бутстреп підтримка

послідовності якого є **DnaWheat2.1**, у стійкості до стеблової іржі. Саме для цієї послідовності було виявлено значну кількість високоідентичних послідовностей, що розташовані у кластерах недалеко одна від одної. Можливо, дуплікації генів стійкості є одним із способів реагування рослин на виникнення нових штамів патогена, зміни в генах вірулентності яких сприяють відбору рослин з подібними геномними перебудовами.

Висновки

Було здійснено пошук нових генів кандидатів стійкості до стеблової іржі в геномі *T. aes-*

tivum із використанням послідовності вже відомих генів стійкості пшениці та ячменю до високівірулентних рас стеблової іржі. Були отримані та проаналізовані послідовності, що, можливо, є частинами генів стійкості до стеблової іржі. BLAST пошук показав, що в геномах *T. aestivum*, *T. urartu*, *Ae. taushii* наявні послідовності, високоідентичні до отриманих нами сиквенсів. Філогенетичні методи дозволили кластеризувати ідентифіковані послідовності та показати їх спільне походження.

ЛІТЕРАТУРА

- Schumann L., Leonard J., Stem Rust of Wheat (black rust) [Electronic resource] // The Plant Health Instructor. – 2000. – Mode of access: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/StemRust.aspx>
- McIntosh R., Wellings C., Park R. Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes. – Australia: CSIRO, 1995. – P. 205.
- Mago R., Zhang P., Vautrin S. The wheat *Sr50* gene reveals rich diversity at a cereal disease resistance locus [Electronic resource] // Nature Plants. – 2015. – Mode of access: <http://www.nature.com/articles/nplants2015186>.
- Periyannan S., Moore J., Ayliffe M., Bansal U., Wang X., Huang L., Deal K., Luo M., Kong X., Bariana H., Mago R., McIntosh R., Dodds P., Dvorak J., Lagudah E. The Gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99 // Science. – 2013. – 341, № 6147. – P. 786–788.
- Saintenac C., Zhang W., Salcedo A., Rouse M., Trick H., Akhunov E., Dubcovsky J. Identification of wheat gene *Sr35* that confers resistance to Ug99 stem rust race group // Science. – 2013. – 341, № 6147. – P. 783–786.
- Mago R., Tabé L., Vautrin S., Šimková H., Kubaláková M., Upadhyaya N., Berges H., Kong X., Breen J., Doležel J., Appels R., Ellis J.G., Spielmeier W. Major haplotype divergence including multiple germin-like protein genes, at the wheat *Sr2* adult plant stem rust resistance locus // BMC Plant Biol. – 2014. – 14. – P. 379.
- Brueggeman R., Druka A., Nirmala J., Cavileer T., Drader T., Rostoks N., Mirlohi A., Bennypaul H., Gill U., Kudrna D., Whitelaw C., Kilian A., Han F., Sun Y., Gill K., Steffenson B., Kleinhofs A. The stem rust resistance gene *Rpg5* encodes a protein with nucleotide-binding-site, leucine-rich, and protein kinase domains // Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 2008. – 105, № 39. – P. 14970–14975.
- Wang X., Richards J., Gross T., Druka A., Kleinhofs A., Steffenson B., Acevedo M., Brueggeman R. The *rpg4*-mediated resistance to wheat stem rust (*Puccinia graminis*) in barley (*Hordeum vulgare*) requires *Rpg5*, a second *NBS-LRR* gene, and an actin depolymerization factor // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2013. – 26, № 4. – P. 407–418.
- Ivaschuk B., Samofalova D., Pirkó Ya., Fedak G., Blume Ya. The homologous identification of the stem rust resistance genes *RPG5*, *ADF3* and *RGA1* in the relatives of barley // Cytol. Genet. – 50, № 2. – P. 96–105
- Sambrook J., Russel J.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. – N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 763 p.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: molecular evolution genetics analysis version 6.0. // Mol. Biol. Evol. – 2013. – 30, № 12. – P. 2715–2729.
- Jones D., Taylor W., Thornton J. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences // Computer Appl. Biosci. – 8, № 3. – P. 275–282.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. – 1987. – 4, № 4. – P. 406–425.
- Yu L., Barbier H., Rouse M., Singh S., Singh R., Bhavani S., Huerta-Espino J., Sorrells M. A consensus map for Ug99 stem rust resistance loci in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2014. – 127, № 7. – P. 1561–1581.

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

Institute of Food Biotechnology and Genomics, Nat. Acad. of Sci. of Ukraine, Ukraine, 04123, Kyiv, Osipovskogo str., 2A, e-mail: antutilo@gmail.com

NUCLEOTIDE-BINDING DOMEIN SEQUENCES OF NB-LRR CLASS PROTEIN USAGE FOR SCREENING OF STEM RUST RESISTANCE GENES

Aim. Today, stem rust is one of the greatest threat to wheat production worldwide. Despite the recent discovery of new resistance genes, there is a likelihood of new insensitive stem rust strain emergence. This work is aimed at detecting of new stem rust resistance genes and deepening the knowledge about them. **Methods.** The CTAB-method for the isolation of DNA, PCR amplification with special degenerative primers, electrophoretic analysis, cloning and sequencing were used. **Results.** Five fragments of possible stem rust resistance genes have been coned. BLAST search showed that the genomes of *T. aestivum*, *T. urartu*, *Ae. taushii* contains the sequences that is highly identical to the isolated fragments. Phylogenetic methods allowed to identify the gene clusters with the common evolution origin. **Conclusions.** Using the sequences of known wheat and barley stem rust resistance genes, the search of new candidate genes for stem rust resistance in *T. aestivum* genome have been performed. The sequences that could be the parts of new stem rust resistance genes have been obtained and analyzed. Received information may be useful for the further researches in the field of stem rust resistance genetics.

Keywords: stem rust, resistance genes, *T. aestivum* genome.