

УДК 633.15+575.22

Н. Е. Кожухова, канд. біол. наук, заст. директора, Ю. М. Сиволап, д-р біол. наук, проф., академік УААН
Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН
Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна; (0482) 395-274; e-mail: natavolk@rambler.ru

ДНК-МАРКЕР СТІЙКОСТІ КУКУРУДЗИ ДО ФУЗАРІОЗНИХ ГНИЛЕЙ ТА РОЛЬ МОБІЛЬНИХ ЕЛЕМЕНТІВ В СТІЙКОСТІ ДО ФІТОПАТОГЕНІВ

За допомогою ДНК-технології виявлений кодомінантний маркер RGA11 локусу, що відповідає за стійкість кукурудзи до *Fusarium spp.*, локалізований на короткому плечі хромосоми 1 на відстані 18,3 сМ. Проведене секвенування 240 п.н.-алеля, характерного для стійких генотипів. Нуклеотидна послідовність є комплементарною ретротранспозону Grande (ZDGRANDE1). Показаний можливий вплив мобільних елементів на прояв ознаки стійкості до фітопатогенів.

Ключові слова: ДНК-маркер, стійкість, кукурудза, *Fusarium*, мобільні елементи.

Мігруючі (транспозонні) генетичні елементи (МГЕ) складають більше 60% геномної ДНК еукаріот [1]. Найчисленнішим і широко поширеним класом транспозонів є ретропозони або ретротранспозони [2]. Ретротранспозони використовуються деякими РНК-вірусами і еукаріотними об'єктами як проміжний етап життєвого циклу копіювання своєї РНК за допомогою зворотної транскрипції і ферменту РНКазин Н в копію ДНК, яка вбудовується в ДНК хазяїна за допомогою інтегрази IN. МГЕ розповсюджені по всьому геному і знаходяться у всіх хромосомах.

Ретротранспозони класифіковані в три групи: ретровірус-подібні елементи, що містять довгі кінцеві повтори (Long Terminal Repeats, LTR), не-LTR-ретротранспозони — довгі дисперговані повтори (Long Interspersed Elements) і короткі дисперговані повтори (Short Interspersed Elements).

Нові ретротранспозиції в геномі хазяїна, залежно від локалізації можуть приводити до змін активності генів [3, 4] і навіть індукувати хромосомні зміни. LTR ретротранспозонів несуть регуляторні сайти, що розпізнаються деякими хімічними компонентами ядра [5].

До сімейств ретротранспозонів у кукурудзи відносять наступні: *Cin* [6], *Bs1* [7], *Huck*, *Kake*, *Fourf*, *Milt*, *Reina*, *Victim*, *Ji* [8], *Magellan* [9], *Zeon-1* [10], *Opie-1* [11], *PREM* [12], *Grande-1* [12], *Stonor* [13], *Cinful-1* [14], *Tekay* [15], *ISAAC-CACTA* [16]. В таблиці 1 наведені властивості деяких ретротранспозонів геному кукурудзи. Значний

вміст ретропозуючих елементів в геномі дозволяє широко використовувати їх послідовності як молекулярні маркери [17].

Таблиця 1

Характеристика деяких ретротранспозонів кукурудзи

Ретро-транспозон	Розмір, тис. п.н.		Кількість копій	Локалізація	РНК-транскрипт	Коментарі
LTR-ретротранспозони						
<i> copia</i> -подібні						
<i>Bs1</i>	3.2	0.302	1-5	-	-	Не містять послідовностей зворотної транскриптази; мають придбані консервативні трансмембранні домени цитоплазматичного мембранного протона гена АТФази.
<i>Opie-1</i>	8.7	1.256	понад 3000	міжгенний розподіл	коріння, листя, волоть	Активні останні 2-6 млн. років; переважно вбудовуються в LTR інших ретропозонів.
PREM-2	9.5	1.307	понад 10000	дисперговані	мікроспори	Активні в найближчому минулому; інсерції в 5'-флаанкуючих регіонах <i>polgal</i> -генів; складають близько 5 % генома.
<i> gypsy</i> -подібні						
<i>Cinful-1</i>	8.6	0.586	20000	-	листя	Містять <i>envelope</i> -подібні послідовності.
<i>Grande-1</i>	13.5	0.600	понад 1300	дисперговані	-	Містять значний по довжині 3'-регіон (більше 7 тис. п. н.). ймовірно, який захищає придбаний цитоплазматичний ген, який продукує 900 п.н.-транскрипт у всі тканини.
<i>Zeon-1</i>	7.3	0.648	понад 1250	-	ендосперм	Не містить послідовностей зворотної транскриптази; продукує gag-білок, який детектується антитілами.
Не-LTR-ретротранспозони						
<i>Cin4</i>	1-6.8	-	50-100	-	-	Містять сімейство обрізаних 5'-кінців.

Рослини використовують різні типи генів стійкості до хвороб і шкідників, по-перше, для детекції присутності патогена і, по-друге,

для індукції відповідних захисних реакцій. На даний час для багатьох видів рослин ідентифіковані численні гени стійкості (R-гени) до різних патогенних організмів — бактерій, грибів, вірусів, комах і нематод. Завдяки досягненням молекулярної генетики (зокрема, повному секвенуванню ДНК модельних рослин — гірчиці і рису) досягнуто величезного прогресу у вивченні структури і функцій R-генів, їх класифікації та визначенні кодованих продуктів [18].

ДНК-технології, зосновані на методі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), — ефективний засіб виділення генів стійкості. Більшість R-генів кодуєть обмежене число консервативних регіонів, і ці регіони можуть бути використані для проектування вироджених праймерів, щоб ампліфікувати будь-які невідомі аналоги генів стійкості (R-gene analogs, RGAs). Виділення і картування аналогів генів стійкості за допомогою ДНК-технологій здійснене для багатьох рослин, в тому числі для кукурудзи [19, 20].

За допомогою ПЛР-підходу нами виявлений кодомінантний ДНК-маркер RGA11 до локусу, що відповідає за стійкість кукурудзи до фузаріозної гнилі, картування якого дозволило локалізувати його на короткому плечі хромосоми 1 на відстані 18,3 сМ дистальніше від маркера RGA11 [21].

Мета даного дослідження — вдосконалення ДНК-маркера RGA11 локусу стійкості до фузаріозної гнилі. Для досягнення поставленої мети виконували наступні задачі: оцінка ідентифікуючої здатності маркера RGA11, визначення послідовності фрагментів ампліфікації локусу RGA11; оцінка ступеня гомології даного фрагменту з відомими послідовностями кДНК рослин, конструювання праймерів, оцінка ідентифікуючої здатності розробленого маркера та порівняння її з такою попереднього маркера.

Матеріал і методи дослідження

Рослинний матеріал. 52 інбредні лінії, що різняться стійкістю до фузаріозної гнилі: стійкі лінії — ГК26, ОК124, ДК277-10, П343, ОК104-4, ОК109-6, БК440, Одеська 329, W59, НМv2/75, П502, Одеська 386, ХЛГ100, F2, Ік107-1, Ух562, F564, R1-2, W401, С103, П346, П149, Одеська 221, Одеська 308, ДК429, Одеська 139; сприйнятливі лінії — ДС10/3, ВІР27, Одеська 222, ОК39, Т135, Бс0135, ХЛГ457, Т22ТВ, Т22, R221, ХЛГ1360, ЕА2087, Дк66, Дк322, ІкТ235, Вір27/7, ЮВ3, Т13, ДС103, W275, W374, Чк62, СА33, Одеська 109, ДС9МВ, Одеська 306.

Виділення ДНК здійснювали з 7-добових етіюльованих паростків за модифікованою методикою [22].

Полімеразну ланцюгову реакцію проводили в 0,5 мкл-мікропробирках в термоциклері "Терцик" ("ДНК-технологія", Росія). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила буфер (0,05 М КСl; 0,02 М Тріс-НСl рН 8,4; 0,002 М MgCl₂; 0,01% Твін-20); по 0,2 мМ ко-

жного dATP, dCTP, dTTP, dGTP; 0,25 мкМ праймера; 20 нг ДНК; 2 одиниці ДНК-полімерази Taq. На реакційну суміш нашаровували 20 мкл мінерального масла. Температурний режим ампліфікації наступний: перша денатурація 94°C 2 хв; фінальна елонгація 72°C 3 хв; 30 основних циклів: денатурація 94°C 1 хв; відпалювання праймерів 52°C 1 хв; елонгація 72°C 2 хв.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації. Продукти ПЛР (5 мкл-аліквоти ПЛР-суміші) фракціонували в 10,0% поліакриламідном (ПАА) гелі в ТВЕ-буфері при постійній напрузі 500 В і температурі 60°C 3 год в апараті для вертикального гелелектрофорезу. Продукти ампліфікації візуалізували фарбуванням нітратом срібла.

Документування. Відеозображення електрофоретичних профілів ампліфікованої ДНК та оцінку довжини продуктів ампліфікації одержували за допомогою системи документації і аналізу гелів "Image Master VDS" ("AmershamPharmaciaBiotech", ОКВ) згідно з керівництвом користувача обладнання.

Результати досліджень та їх обговорення

Маркер RGA11, локалізований на відстані 18,3 сМ від локусу стійкості до фузаріозної гнилі, розроблений для попереднього скринінгу генотипів кукурудзи на стійкість: амплікон довжиною 240 п. н., характерний для стійких генотипів; амплікон довжиною 265 п. н. — для сприйнятливих. Для перевірки ідентифікуючої здатності даного маркера провели ПЛР-аналіз локусу RGA11 у вибірці 50 ліній кукурудзи, що різняться за стійкістю до фузаріозної гнилі. На рис. 1 наведено електрофореграму розподілу продуктів ампліфікації локусу RGA11.

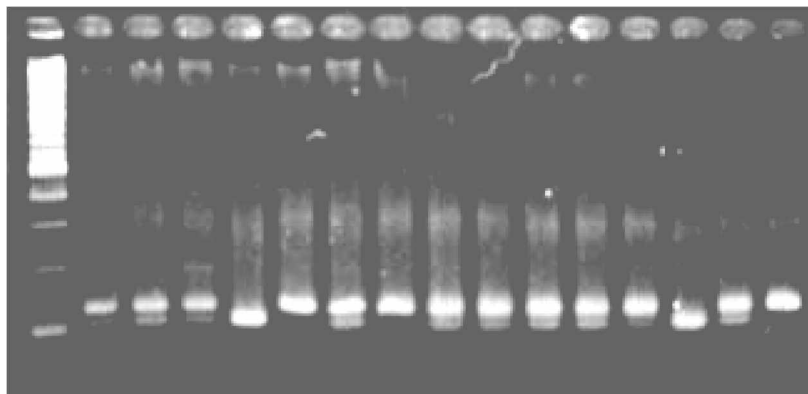


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації локусу RGA11 ліній кукурудзи 1 — ДС10/3, 2 — ВІР27, 3 — Одеська 222, 4 — ГК26, 5 — ДС9МВ, 6 — Одеська 308, 7 — ХЛГ457, 8 — ОК39, 9 — Т135, 10 — Бс0135, 11 — Т22ТВ, 12 — Т22, 13 — Ік107-1, 14 — ХЛГ1360, 15 — Одеська 306

З 25 ліній, оцінених фенотипово як стійкі, у 19 відмічена наявність фрагмента ампліфікації довжиною 240 п. н. При ПЛР-аналізі локусу RGA11 25 ліній, сприйнятливих до фузаріозної гнилі, у 18 був присутній фрагмент розміром 265 п. н. У 13 випадках виявлена невідповідність між алельним складом генотипу за локусом RGA11 і стійкістю/сприйнятливістю до фузаріозу. Шість ліній за даним локусом проявили гетерозиготність. RGA11-маркер ефективний в 74% порівнянь.

Для підвищення ідентифікуючої здатності маркера RGA11 провели секвенування алеля локусу RGA11 довжиною 240 п. н., що маркує стійкі генотипи. Дана робота складалася з наступних етапів. Продукти ампліфікації ДНК стійких генотипів з праймером RGA11 напрацьовували в препаративних кількостях і проводили електроелекцію 240 п.н.-амплікону з агарозного геля. Гомогенність виділеного фрагмента перевіряли за допомогою електрофорезу в 10% ПАА гелі. Секвенування амплікона довжиною 240 п. н. люб'язно здійснено к. б. н., доцентом Р. М. Календарем (Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Гельсинки, Фінляндія). Нуклеотидну послідовність аналізували за допомогою комп'ютерної програми "FastPCR" для оцінки ступеня гомології даного фрагмента з відомими ділянками кДНК рослин і ядерних білків, що синтезуються, а також для прогнозування наявності зон екзонів, інтронів, промоторів.

Нуклеотидна послідовність 240 п. н.-RGA11-алеля виявилася комплементарною ретротранспозону Grande (ZDGRANDE1) (рис. 2).

```

aactcgagagagcaagaggaagaccgaggccgaggagaaggaagggggcg
tagatcacggactcatgggtatcctctatcgggacagtgaccccatggcaaatc
cgccaagagcagagctccctcgggggaagaaccccgatggacacgaggtgg
aagagttcgggctcggagatgacagacatgtggtacctgcgaaaggcaactg
gtgggccttctcttgctctctcgagtt
    
```

Рис. 2. Послідовність (5'>3') клонованого і секвенованого фрагмента ампліфікації 240 п.н.-алеля локусу RGA11. Жирним курсивом відмічені місця комплементарності секвенованого фрагмента ретротранспозону Grande (ZDGRANDE1).

Дані про нуклеотидну послідовність використовували для конструювання пар праймерів до кінцевих ділянок даного фрагмента ДНК за допомогою комп'ютерної програми "OLIGO". Послідовності (5' > 3') праймерів наступні: прямого — ААСТСГАГАГАГСААГА-ГГААГГСС і зворотного — ГГССТТСТТСТТГСТТСТТСТГААТТ.

За допомогою ПЛР з розробленими праймерами, які позначили RGA11/1, протестували генотипи кукурудзи, контрастні за стійкістю до фузаріозної гнилі, а саме: батьківські інбредні лінії Одеська 139 і R221, які використано для створення популяції, що розщеплюється, для маркування стійкості, суміші ДНК гомозиготних рос-

лин; 50 інбредних ліній, що різняться за стійкістю до фузаріозної гнилі. При ампліфікації ДНК "стійких" генотипів отримано фрагмент довжиною 198 п.н., "сприйнятливих" — розміром 215 п. н. У таблиці 2 наведено дані порівняльного аналізу результатів ампліфікації локусу RGA11.

Таблиця 2

Порівняння фенотипової оцінки стійкості ліній з даними ПЛР-аналізу за праймерами RGA11 і RGA11/1

Характеристика ліній за стійкістю (кількість ліній)	Кількість ліній, для яких детектовано					
	алелі, характерні для «стійких» генотипів		алелі, характерні для «сприйнятливих» генотипів		обидва фрагменти	
	RGA11 (240 п.н.)	RGA11/1 (198 п.н.)	RGA11 (265 п.н.)	RGA11/1 (215 п.н.)	RGA11 (240 п.н., 265 п.н.)	RGA11/1 (198 п.н., 215 п.н.)
Стойкі (25)	19	21	6	3	2	0
Сприйнятливі (25)	7	4	18	22	4	0

Маркер RGA11/1 має певні переваги порівняно з первісним маркером RGA11, а саме проявляє меншу кількість невідповідностей у порівнянні маркер-ознака; має менші розміри ампліфікованих алелів. Даний маркер може бути використаний в селекції при доборі генотипів кукурудзи, стійкість яких регулюється даним геном. До переваг виявленого маркера можна віднести його кодомінантність, що дозволяє тестувати як стійкі, так і сприйнятливі генотипи кукурудзи.

Згідно з даними літератури, мобільні елементи можуть змінювати довжину генів стійкості і їх експресію, вбудовуючись в структурну або регуляторну частину гена, навіть до повної його інактивації [23]. Наприклад, транспозон довжиною 315 п. н. гена *Hm1* стійкості кукурудзи до *Cochiobolus carbonum*; транспозонні елементи в двох мутантних генах L6 стійкості льону до *Melampso lini* [24]. Мобільні елементи є одним з основних чинників варіабельності сімейства Ха21-генів рису: 17 транспозонів детектовано в Ха21-локусі, з яких два формували нову відкриту рамку зчитування в кодуючих регіонах, що приводило до зміни експресії кодованих білків і відповідно до зниження стійкості [25, 26]. Показано, що інокуляція різними вірусними, бактеріальними або грибовими патогенами активує транскрипцію ретротранспозонів [27]. Прикладом може бути активація промотора *Tnt1* ретротранспозону в томаті після інокуляції його грибним патогеном *Cladosporium fulvum* [28]. Можливо, ретротранспозон у складі розробленого нами маркера формує нову відкриту рамку зчитування R-гена, що приводить до зміни експресії кодованих білків і відповідно до зниження стійкості.

Висновки

Просеквеновано алель RGA11 локусу, що є маркером гена стійкості кукурудзи до *Fusarium spp.*, характерного для стійких генотипів. Нуклеотидна послідовність є комплементарною ретротранспозону Grande (ZDGRANDE1). Вдосконалено маркер RGA11 і розроблено маркер RGA11/1, що має певні переваги. Показаний можливий вплив мобільних елементів на стійкість до фітопатогенів.

Література

1. Kumar A., Bennetzen J. Plant retrotransposons // Annu. Rev. Genet. — 1999. — Vol. 33, N 3. — P. 479–532.
2. Тоцький В. М. Генетика: Підручник // Одеса: Астропринт. — 2002. — 712 с.
3. Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence / R. Kalendar, J. Tanskanen, S. Immonen, E. Nevo, A. Schulman // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, N 12. — P. 6603–6607.
4. Clegg M., Durbin M. Flower color variation: A model for the experimental study of evolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97, N 13. — P. 7016–7023.
5. Tikhonov A., Bennetzen J., Avramova Z. The Plant Cell. — 2000. — Vol. 12, N 2. — P. 249–264.
6. *Cin4*, an insert altering the structure of the *Al* gene of *Zea mays*, exhibits properties of nonviral retrotransposons / Z. Schwarz-Sommer, L. Leclercq, E. Gobel, H. Saedler // EMBO J. — 1987. — Vol. 6. — P. 3873–3880.
7. Jin Y., Bennetzen J. Structure and coding properties of Bsl a maize retransposon-like transposon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1989. — Vol. 86. — P. 6235–6239.
8. Peterson P. Transposons in Maize and Their Role in Creating Variability // In: International Crop Science I. — 1993. — P. 641–645.
9. Purugganan M., Wessler S. Molecular evolution of magellan, a maize Ty3/gypsy-like retrotransposon // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1994. — Vol. 91. — P. 11674–11678.
10. Hu W., Das O., Messing J. Zeon-1, a member of a new maize retrotransposon family // Mol. Gen. Genet. — 1995. — Vol. 248. — P. 471–480.
11. Nested retrotransposons in the intergenic regions of the maize genome / P. SanMiguel, A. Tikhonov, Y. Jin, N. Motchoulskaia, D. Zakharov et al. // Science. — 1996. — Vol. 274. — P. 765–768.
12. PREM-2, a copia-type retroelement in maize is expressed preferentially in early microspores / M. Turcich, A. Bokharririza, D. Hamilton, C. He, W. Messier et al. // Sexual Plant Reprod. — 1996. — Vol. 9. — P. 65–74.
13. Martinez-Izquierdo J., Garcia-Martinez J., Vicent C. What makes Grandel retrotransposon different? // Genetica. — 1997. — Vol. 100. — P. 15–28.
14. Marillonnet S., Wessler S. Retrotransposon insertion into maize waxy gene results in tissue-specific RNA processing // Plant Cell. — 1997. — Vol. 9. — P. 967–978.
15. SanMiguel P., Bennetzen J. Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons // Ann. Bot. — 1998. — Vol. 81. — P. 37–44.
16. Isaac-CACTA transposons: new genetic markers in maize and sorghum / J. Lee, S. Kwon, K. Park, N. Kim // Genome. — 2005. — Vol. 48, N 3. — P. 455–460.
17. Genetic mapping of the Isaac-CACTA transposon in maize / J. Lee, K. Park, J. Kim, S. Kwon, J. Shin, S. Hong, H. Min, N. Kim // Theor. Applied Genet. — 2006. — Vol. 113, N. 1. — P. 16–22.

18. *Genome-wide isolation of resistance gene analogs in maize (Zea mays L.)* / X. Wenkai, M. Xu, J. Zhao, F. Wang, J. Li, J. Dai // *Theor. Appl. Genet.* — 2006. — Vol. 113, N 1. — P. 63–72.
19. *The isolation and mapping of disease resistance gene analogs in maize* / N. Collins, C. Webb, S. Seah, J. Ellis, S. Hulbert, A. Pryor // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1998. — Vol. 11, N 10. — P. 968–978.
20. *Mapping of genome-wide resistance gene analogs (RGAs) in maize (Zea mays L.)* / X. Wenkai, Z. Jing, F. Shengci, L. Lin, D. Jinrui, X. Mingliang // *Theor. Appl. Genet.* — 2007. — Vol. 115, N 4. — P. 501–508.
21. *Маркування локусів, що детермінують стійкість кукурудзи до фузаріозних гнилей* / Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, В. Ф. Вареник, В. М. Соколов // *Цитология и генетика.* — 2007. — № 2. — С. 37–41.
22. *Сиволап Ю. М., Календарь Р. Н. Генетический полиморфизм ячменя, детектируемый ПЦР с произвольными праймерами* // *Генетика.* — 1995. — Т. 31, № 10. — С. 1358–1364.
23. *Yu J. Structure and evolution of resistance genes in plant* // *Proceedings of International Agro-biotechnology Conference.* — China. — 2005. — P. 37–42.
24. *The L6 gene for flax rust resistance is related to the Arabidopsis bacterial resistance gene RPS2 and tobacco viral resistance gene* / G. Lawrence, E. Finnegan, M. Aylive, J. Ellis // *Plant Cell.* — 1995. — Vol. 7, N 8. — P. 1195–1206.
25. *Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family* / W. Song, L. Pi, G. Wang, J. Gardner, T. Holsten, P. Ronald // *Plant Cell.* — 1997. — Vol. 9. — P. 1279–1287.
26. *Xa21 D encodes a receptor-like molecule with a leucinerich repeat domain that determines racespecific recognition and is subject to adaptive evolution* / G. Wang, D. Ruan, W. Song, S. Sideris, L. Chen et al. // *Plant Cell.* — 1998. — Vol. 10. — P. 765–779.
27. *Pouteau S., Grandbastien M., Voccara M. Microbial elicitors of plant defense response activate transcription of a retrotransposon* // *Plant J.* — 1994. — Vol. 5. — P. 535–542.
28. *Mhiri C., De Wit P., Grandbastien M. Activation of the promoter of the Tnt1 retrotransposon in tomato after inoculation with the fungal pathogen Cladosporium fulvum* // *Mol. Plant-Microbe Interact.* — 1999. — Vol. 12. — P. 592–603.

Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина

ДНК-МАРКЕР УСТОЙЧИВОСТИ КУКУРУЗЫ К ФУЗАРИОЗНЫМ ГНИЛЯМ И РОЛЬ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В УСТОЙЧИВОСТИ К ФИТОПАТОГЕНАМ

Резюме

С помощью ДНК-технологии выявлен кодоминантный маркер RGA11 локуса, отвечающего за устойчивость кукурузы к *Fusarium* spp., на коротком плече хромосомы 1 на расстоянии 18,3 сМ. Проведено секвенирование 240 п.н.-аллеля, характерного для устойчивых генотипов. Нуклеотидная последовательность комплементарна ретротранспозону Grande (ZDGRANDE1). Показано возможное влияние мобильных элементов на устойчивость к фитопатогенам.

Ключевые слова: ДНК-маркер, устойчивость, кукуруза, *Fusarium*, мобильные элементы.

N. E. Kozhukhova, Yu. M. Sivolap
South Plant Biotechnology Center UAAN,
Ovidiopolskaya Dor. 3, Odessa, 65036 Ukraine

**DNA-MARKER OF MAIZE RESISTANCE TO FUSARIUM ROT AND
MOBILE ELEMENTS ROLE IN RESISTANCE TO
PHYTOPATHOGENES**

Summary

By DNA-technology codominant marker of RGA11 locus for maize resistance to *Fusarium* spp., on the short shoulder of chromosome 1 in the distance 18,3 cM. 240 bp-allele, characteristic for resistance genotypes, was sequenced. The sequence was complement to Retrotransposon Grande (ZDGRANDE1). Possible effect of mobile elements on resistance to phytopathogene is discussed.

Keywords: DNA-marker, resistance, maize, *Fusarium*, mobile elements.