

Оценка Местных Сортов Твердой Пшеницы На Наличие В Их Геноме *Nax1* Локуса

З.Д. Сулейманова*, А.Ч. Мамедов

Институт молекулярной биологии и биотехнологии НАН Азербайджана, Проспект Матбуат, 2А, Баку AZ 1073, Азербайджан; *E-mail: jzarifa@yahoo.com

Проведена оценка 19 местных твердых сортов пшеницы на наличие в их геноме маркера, сцепленного с геном *Nax1*, регулирующим содержание ионов натрия в листьях при засолении. ПЦР анализ с использованием gwm312 и wmc170 праймеров выявил присутствие аллели размером в 200 п.н., сцепленного с геном *Nax1* у сортов Баракатли-95, Гарабаг, Шарг, Шираслан-23 и Гырмызы бугда. Идентифицированные сорта могут являться перспективными для использования в селекционной работе.

Ключевые слова: *Triticum durum* Desf., ген *Nax1*, маркер, сцепленный, аллель

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время вопросы солеустойчивости растений привлекают все большее внимание, так как в настоящее время в различной степени засолены около 25% почв земного шара, причем площадь засоленных территорий постепенно увеличивается. Солевой стресс отрицательно влияет на выживаемость и урожай сельскохозяйственных растений и, как следствие этого, приводит к значительным экономическим потерям. Наряду с мероприятиями, направленными на предотвращение и снижение засоленности почв, важным направлением в решении этой проблемы является создание устойчивых сортов. Это, в свою очередь, требует исследования генетического потенциала растительных видов, сортов и форм, поиск эффективных источников и доноров солеустойчивости, изучения генетических систем, обуславливающих эту устойчивость, выявление механизмов их функционирования.

Как известно, в побегах высокие концентрации Na^+ вызывают для растения ряд проблем как осмотического, так и метаболического характера. Одним из важных механизмов солеустойчивости считается способность растений в условиях солевого стресса поддерживать ионный гомеостаз, позволяющий им расти и развиваться на фоне засоления. Большое значение для гликофитов имеет механизм недопущения Na^+ в наиболее чувствительные к засолению ткани, такие как апикальные меристемы, листовые пластинки и генеративные органы (Tester и Davenport, 2003; Munns и Tester, 2008). Предполагается, что метаболическая токсичность Na^+ в большой мере является результатом его способности конкурировать с K^+ за места связывания в

биополимерах, важных для клеточного метаболизма. Калий нужен для активации более чем 50 ферментов, а также для связывания тРНК с рибосомами и, следовательно, для синтеза белка (Tester и Davenport, 2003; Szczerba et al., 2009). Следовательно, при высоком соотношении Na^+/K^+ многие ферментативные процессы в цитоплазме могут быть нарушены. Поэтому способность растительных клеток поддерживать стабильный уровень цитозольного K^+ , в среде с высокой концентрацией Na^+ , также может быть ключевым фактором в определении способности растительных клеток переносить солевой стресс. Путем поддержания низкого уровня Na^+ в цитозоле клетки растений могут выполнять все необходимые метаболические функции.

На примере большого числа сельскохозяйственных культур было показано, что более солеустойчивые виды обладают большей способностью исключать Na^+ из клеток тканей листьев и поддерживать высокий уровень K^+ в них (Munns et al., 2000b; Flowers и Hajibagheri, 2001; Zhu et al., 2001). Поддержание высокого соотношения K^+/Na^+ в цитозоле клеток на фоне засоления принято считать одним из важнейших показателей устойчивого генотипа растений (Yamaguchi и Blumwald, 2005; Hauser и Horie, 2010). Важная роль среди большого набора ионных транспортеров и ионных каналов, обеспечивающих это соотношение, принадлежит протонным насосам и антипортерам плазмалеммы и тонопласта (NHX, HKT, SOS1).

Как правило, солетолерантность представителей *Triticeae* связывается с низкими скоростями транспорта Na^+ от корня к надземным органам и высокой селективностью для ионов K^+ относительно ионов Na^+ . Гены, контролирующие повышенное соотношение ионов K и Na в ли-

стях, обуславливающие более высокую солеустойчивость гексаплоидной пшеницы (геном AABBDD), находятся в длинном плече хромосомы 4D (Dubcovsky et al., 1996b). Примечательно, что этот локус отсутствовал в тетраплоидной пшенице (геном AABB), которая более восприимчива к соли, чем мягкая (Gorham et al., 1997; Munns et al., 2000b). Из-за отсутствия D генома, тетраплоидные пшеницы способны к значительному накоплению Na^+ в листьях.

Для того, чтобы увеличить солетолерантность хлебных злаков, усилия многих исследовательских центров направлены на изучение коллекций генплазмы различного происхождения и выявление новых генетических источников. Так, исследователи CSIRO Plant Industry выделили два гена солеустойчивости (*Nax1* и *Nax2*) из древнего дикорастущего родственника пшеницы *T.monococcum*. Оба гена ингибируют накопление Na^+ , ограничивая его перенос от корней к побегам. Интрогрессией *Nax* генов *T.monococcum* в мягкую пшеницу, концентрация Na^+ в листовой пластинке была снижена на или до 60% и увеличена доля Na^+ в пазухах листьев (James et al., 2011). На основании полевых испытаний, линии твердой пшеницы с геном *Nax2* дают на 25% больше урожая, чем изогенные линии без этого локуса в условиях засоления (Munns et al., 2012). Эти результаты показывают, что *Nax* гены имеют потенциал для улучшения солеустойчивости пшеницы.

Австралийские исследователи вывели новый генетический источник твердой пшеницы Line149, полученной от межвидовых скрещиваний твердой пшеницы и культивируемого предка пшеницы *T.monococcum* (C68-101). Линия 149, также как и мягкая пшеница характеризуется низким накоплением Na^+ и относительно высоким показателем соотношения K^+/Na^+ в листьях. Генетический анализ показал, что низкий уровень Na^+ в листьях контролируется генами *Nax1* и *Nax2*. Они были перенесены в составе транслокаций совместно с геном устойчивости к ржавчине. *Nax1* вовлечен в удаление избыточного Na^+ из ксилемы в нижней части листьев (черешка) или корня, в то время как *Nax2* ответствен за удаление Na^+ из ксилемы только в корне (James et al., 2006). Функция гена *Nax2* эквивалентна функции гена *Kna* мягкой пшеницы.

Три гена являются членами семейства НКТ, кодирующего K^+/Na^+ транспортеры, регулирующие содержание Na^+ в листьях при засолении.

Для отбора и улучшения хозяйственно – полезных признаков перспективных и районированных в Азербайджане сортов твердой пшеницы, также требуется поиск эффективных до-

норов, как в коллекциях твердой пшеницы, так и среди других видов и родов злаков. Перспективным подходом для решения данной задачи является применение молекулярных маркеров, тесно сцепленных с генами, контролирующими конкретно селекционно-важные признаки. Такие маркеры позволяют оценить генетический потенциал сортов, выявить источники генов, влияющих на хозяйственно-ценные признаки, включить их в селекционный процесс и производить отбор перспективных генотипов.

Данная работа посвящена тестированию перспективных местных сортов *твердой пшеницы* на присутствие маркерного локуса, сцепленного с геном *Nax1*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 19 сортов твердой пшеницы, созданные в Научно-исследовательском институте земледелия Азербайджана. В качестве положительного контроля были использованы образцы *T.monococcum*, которые являются донорами гена *Nax1*, а в качестве отрицательного контроля – образцы *T.urartu*, в которых исследуемый ген не выявлен. Семена контрольных растений различного географического происхождения были любезно предоставлены нам М.А.Аббасовым (Институт генетических ресурсов НАН Азербайджана).

ДНК выделяли СТАВ методом из молодых листьев (Murray и Tompson, 1980) с некоторыми модификациями. Идентификацию гена *Nax1* проводили ПЦР анализом с использованием SSR-маркеров *gwm 312* и *wmc 170*, последовательность которых представлена в табл.1 (Röder et al., 1998).

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 25 мкл, содержащей 50 нг (нанограм) геномной ДНК, 0,2мМ каждого дНТФ, 0,25 мкМ каждого праймера, 1,5 мМ MgCl_2 1ед. Таq-полимеразы, согласно следующей схеме: после денатурации в течение 3-х мин. при 94°C проводится 45 циклов – 1 мин. при 94°C, 1 мин. при 58°C, 2 мин. при 72°C и финальной завершающей стадии 10 мин. при 72°C. Продукты реакции амплификации разделяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле с бромистым этидием (1мкг/мл), используя трис-боратный буфер. Документирование результатов электрофореза обеспечивалось при помощи геле-документирующей видеосистемы Jencons (UviPro, Англия). В качестве маркеров массы амплифицированных фрагментов использовали набор GeneRuler 50 и 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности маркеров, сцепленные с геном *Nax1*

| ДНК – маркер | Прямой праймер | Обратный праймер |
|--------------|------------------------------|------------------------------|
| gwm312 | 5'-ATGGCATGATGCACGTAGAG-3' | 5'-ACATGCATGCCTACCTAATGG-3' |
| wmc170 | 5'-ACATCCACGTTTATGTTGTTGC-3' | 5'-TTGGTTGCTCAACGTTTACTTC-3' |

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Эффективному поиску генов устойчивости в настоящее время способствуют современные технологии молекулярных ДНК-маркеров. Использование указанных методов позволяет выявить специфические фрагменты ДНК, тесно сцепленные с определенными генами, влияющими на солеустойчивость пшеницы.

Главный ген *Nax1* (кодирующий транспортер натрия, НКТ7) (Huang et al., 2006), регулирует содержание ионов натрия в клетке и локализован в районе хромосомы 2A у твердой пшеницы Линия 149 (Lindsay et al., 2004). Согласно литературным данным, два SSR локуса (gwm312 и wmc170) тесно сцеплены с геном *Nax1*, кодирующимся в геноме диплоидного вида *T.monococcum*. Эти маркеры имеют диагностическую ценность для детекции гена *Nax1* (Lindsay et al., 2008). С помощью праймеров для соответствующих маркеров можно определить наличие гена *Nax1* в изучаемых образцах при использовании ПЦР с последующим анализом ДНК-фрагментов.

В данной работе, 19 образцов тетраплоидной пшеницы были проанализированы с помощью праймерных пар gwm312 и wmc170. Как

видно из рис.1, изучаемые образцы являются полиморфными по микросателлитному повтору gwm312. Амплификация ДНК образцов с праймерной парой к локусу gwm312 позволила выявить рецессивный (А) и доминантный аллели (В). В статье (Lindsay et al., 2008) указывается, что с геном *Nax1* была сцеплена аллель В, размером 200 п.н. В наших исследованиях такая аллель была амплифицирована у сортов Баракатли-95, Гарабаг, Шарг, Шираслан-23 и Гырмызы бугда. При этом, два из них Баракатли-95 и Гарабаг являются гомозиготными формами по данному аллелю. У сортов Гырмызы бугда, Шарг и Шираслан-23 были обнаружены гетерозиготные спектры, т.е. спектры, в которых присутствовали компоненты двух разных аллелей. У сортов Гырмызы бугда, Гарагылчыг-2, Тартар, Ширван-3 и Ширван-5 был амплифицирован неспецифичный фрагмент размером ~150 п.н., который не обнаруживался у других образцов.

По результатам амплификации с помощью маркера wmc170 выявлены аллельные различия между исследуемыми образцами. Результаты амплификации ДНК с праймером wmc170 совпадают с результатами ПЦР анализа с праймером gwm312. Целевой фрагмент амплификации в 200 п.н. выявлен у выше выделенных сортов (Рис. 1).

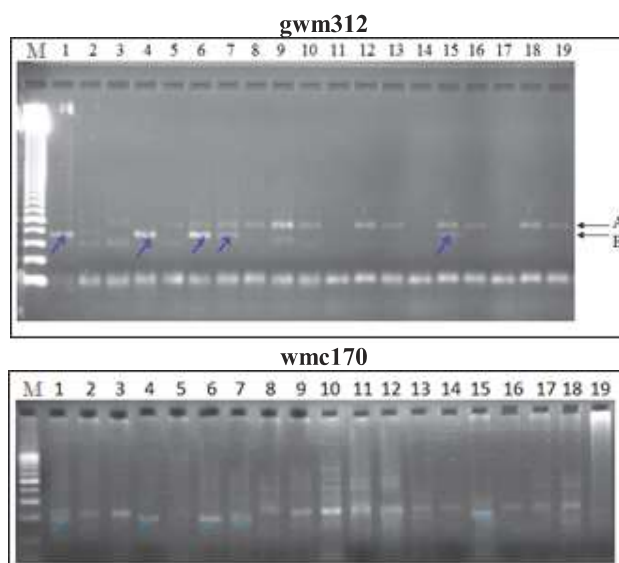


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов амплификации ДНК сортов твердой пшеницы с использованием праймеров gwm312 и wmc170 к локусу *Nax1*. М - маркер молекулярных весов 100 п.н. (gwm312) и 50 п.н. (wmc170) 1. Баракатли-95, 2. Алинджа-84, 3. Гарагылчыг-2, 4. Гарабаг, 5. Тартар, 6. Шираслан, 7. Шарг, 8. Вугар, 9. Ширван-3, 10. Ширван-5, 11. Мирвари, 12. Аг бугда, 13. Мирбашир -50, 14. Тартар-2, 15. Гырмызы бугда, 16. Ягут, 17. Туран, 18. Муган, 19. Кахраба.

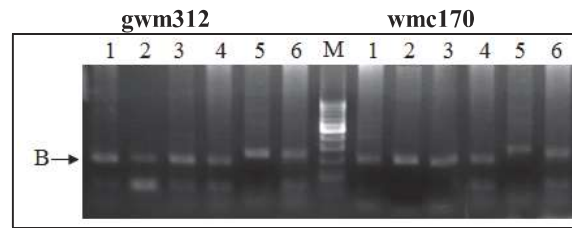


Рис. 2. Электрофоретический анализ ПЦР продуктов в 1,8%-ном агарозном геле с маркерами gwm312 и wmc170 к локусу *Nax1*: М - маркер молекулярных весов 100 п.н. Слева направо: дорожки 1-4 – *T.monococcum*; 5-6 – *T.urartu*

Таким образом, из 19 исследуемых сортов, в 5 образцах была обнаружена аллель в 200 п.н., сцепленная с геном *Nax1* по двум маркерам gwm312 и wmc170. Исследование геномов диплоидных видов пшеницы, включающих 196 образцов *T.monococcum*, *T.boeoticum* и *T.urartu* из генбанка ICARDA показал, что ген *Nax1* присутствует в геноме *T.monococcum* и некоторых образцов *T.boeoticum*. Однако этот ген не обнаружен у образцов *T.urartu* (Abbasov et al., 2011). Сопоставления маркерных аллелей выявленных образцов *T.monococcum* (рис. 2) и исследованных сортов твердой пшеницы наводит на мысль, что у сортов Баракатли-95, Гарабаг, Шираслан-23, Шарг и Гырмызы бугда присутствует ген *Nax1*. Эти сорта могут являться перспективными для дальнейшего использования в селекционной работе в качестве источников гена *Nax1*. Следует отметить, что микросателлитный маркер, входящий в QTL не является самим геном, а лишь сцеплен с ним. Поэтому гарантировать, что данный аллель (200 п.н.) будет нести устойчивость к засолению, возможно лишь при условии изучения экспрессии гена *Nax1* у изученных сортов. Для обоснования достоверности проведенных исследований по идентификации гена *Nax1* в анализируемых сортах необходимо секвенирование амплифицированного целевого фрагмента.

Проведенные исследования показали, что применение ПЦР маркеров позволяет эффективно выявлять хозяйственно полезные аллели в коллекционных образцах тетраплоидной пшеницы без проведения длительного и затратного фенотипического и биохимического анализа.

ЛИТЕРАТУРА

- Abbasov M.A., Akparov Z.I., Street K., Jafarova R., Sheykzamanova F., Rzayeva S., Munns R., Babayeva S. (2011) Molecular physiological testing of diploid wheats (*T. monococcum*, *T. boeoticum* and *T. urartu*) to salinity stress. International conference "Diversity, characterization and utilization of plant genetic resources for enhanced resilience to climate changes" October 3-4, Baku, Azerbaijan, p 119-121.
- Dubcovsky J., Santa Maria G., Epstein E., Luo M.-C., Dvorak J. (1996b) Mapping of the K^+/Na^+ discrimination locus *Knal* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, **92**: 448-454.
- Flowers T.J., Hajibagheri M.A. (2001) Salinity tolerance in *Hordeum vulgare*: ion concentration in root cells of cultivars differing in salt tolerance. *Plant and Soil*, **231**: 1-9
- Gorham J., Bridges J., Dubkovsky J., Dvorak J., Hollingston P. A., Luo M.-C., Khan J. A. (1997) Genetic analysis and physiology of a trait for enhanced K^+/Na^+ discrimination in wheat. *New Phytol.*, **137**: 109-116.
- Hauser F., Horie T. (2010) A conserved primary salt tolerance mechanism for sodium exclusion and maintenance of high K^+/Na^+ ratio in leaves during salinity stress. *Plant Cell Environ.*, **33**: 552-565.
- Huang S., Spielmeyer W., Lagudah E.S., James R.A., Platten J.D., Dennis E.S., Munns R. (2006) A sodium transporter (HKT7) is a candidate for *Nax1*, a gene for salt tolerance in durum wheat. *Plant Physiology*, **142**: 1718-1727.
- James R.A., Blake C., Caitlin S., Byrt C.S., Munns R. (2011) Major genes for Na^+ exclusion, *Nax1* and *Nax2* (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na^+ accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 2939-2947.
- Lindsay M., Lagudah E., Hare R., Munns R. (2004) A locus for sodium exclusion (*Nax1*), a for salt tolerance mapped in durum wheat. *Functional Plant Biology*, **31**: 1105-1114
- Lindsay M., Spielmeyer W., Lagudah E., James R., Munns R., Huang S. (2008). Markers for salinity tolerance in wheat plants and the use thereof in breeding programs. *Patent Application Publication* US2008/0028480 A1

- Munns R., Hare R.A., James R.A., Rebetzke G.J. (2000 b) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, № 51. 69-74.
- Munns R., Hare R.A., James R.A., Rebetzke G.J. (2000b) Genetic variation for improving the salt tolerance of durum wheat. *Australian Journal of Agricultural Research*, 51: 69–74.
- Munns R., James R.A., Xu B., Asmini A., Conn S.J., Jordans C., Byrt C.S., Hare R.A., Tyerman S.D., Tester M., Plett D., Gilliam M. (2012) Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30: 360–364.
- Munns R., Tester M. (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 651-681.
- Murray M.G., Thompson W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids Res.*, 8: 4321-4325
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M-H., Leroy P., Ganal M.W. (1996) A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
- Szcerba M.W., Britto D.T., Kronzucker H.J. (2009) K⁺ transport in plants: physiology and molecular biology. *Journal of plant physiology*. 166: 447-466.
- Tester M., Davenport R. (2003). Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annu. Botany*, 91: 503-527.
- Yamaguchi T., Blumwald E. (2005). Developing salt tolerant crop plants: Challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.*, 10: 615-620.
- Zhu G.Y., Kinet J.M., Lutts S. (2001) Characterization of rice (*Oryza sativa* L.) F-3 populations selected for salt resistance. I. Physiological behavior during vegetative growth. *Euphytica*, 121: 251-263.

Bərk Buğdanın Yerli Sortlarının Genomunda *Nax1* Lokusunun Mövcudluğuna Görə Qiymətləndirilməsi

Z.C. Süleymanova, Ə.Ç. Məmmədov

Azərbaycan MEA Molekulyar Biologiya və Biotexnologiyalar İnstitutu

19 yerli bərk buğda sortlarının genomu, şoranlıq şəraitində yarpaqlarda natrium ionlarının miqdarının tənzimlənməsini idarə edən *Nax1* lokusu ilə ilişikli markerin olmasına görə tədqiq olunmuşdur. gwm312 və wmc170 markerlər ilə aparılan PZR nəticəsində Bərəkətli-95, Garabağ, Şərq, Şiraslan-23 və Qırmızı buğda sortlarında *Nax1* lokusu ilə ilişikli, ölçüsü 200 n.c.-dən ibarət olan fraqment aşkar olunmuşdur. İdentifikasiya olunan sortlar buğda üzrə aparılan seleksiya işlərində perspektiv sortlar kimi istifadə oluna bilər.

Açar sözlər: Bərk buğda sortları, *Nax1* geni, molekulyar marker, ilişikli, allel

Assesment Of The *Nax1* Locus In The Genome Of Local Durum Wheat Varieties

Z.J. Suleymanova, A.Ch. Mammadov

Institute of Molecular Biology & Biotechnology, Azerbaijan NAS

An assessment of the presence of the genome marker linked to the *Nax1* gene, which regulates contents of Na ions in leaves under salinity, has been performed in 19 domestic varieties of *Triticum durum*. Using gwm312 and wmc170 molecular markers 200 bp allele linked to the *Nax1* gene was detected in the Barakatli 95, Garabagh, Sharg, Shiraslan 23 and Gyrgyzy bugda varieties. Identified varieties may be promising for use in breeding.

Keywords: Durum wheat cultivars, the *Nax1* gene, molecular marker, linked, allele