Приложение

К статье Сколотневой Е.С., Леоновой И.Н., Букатич Е.Ю., Салиной Е.А. «Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний»

Дополнительные материалы 1

Компоненты буфера для выделения ДНК, оптимизированные в ходе работы

Буфер для экстракции	Рабочий объем (на 50 мл буфера)
100 мМ Tris-HCl, pH 7.5–8.0	5 мл 1 М Трис-HCl pH 7.5–8.0
500 мМ NaCl	5 мл 5 М NaCl
50 мМ EDTA	5 мл 0.5 М EDTA
1.25 % SDS	0.625 г SDS или 3.125 мл 20 % SDS
0.38 % $Na_2S_2O_5$ (пиросульфит натрия)	0.19 г $Na_2S_2O_5$ (пиросульфит натрия)

Дополнительные материалы 2

Состав оптимизированной ПЦР-смеси для маркерного анализа растительных образцов

Компонент ПЦР-смеси	Рабочий объем (на 25 мкл смеси)
ДНК-матрица 50 нг	4 мкл
Primer R/F 0.1 мкмМ	0.5 мкл/0.5 мкл
dNTP 0.2мМ	2.5 мкл
Буфер (с Mg^{2+}1.5мМ)	2.5 мкл
ДНК-полимераза 1 ед.	1 мкл
Вода mQ	14 мкл

Дополнительные материалы 3

Альтернативная ПЦР-смесь, включающая коммерческий реактив БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color

Компонент ПЦР смеси	Рабочий объем (на 25 мкл смеси)
ДНК-матрица 50 нг	4 мкл
Primer R/F 10–15 мкМ	0.5 мкл/0.5 мкл
*БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×)	12.5 мкл
Вода mQ	7.5 мкл

* Реактив фирмы БиоЛабМикс (http://biolabmix.ru).

Дополнительные материалы 4

ПЦР-маркеры, использованные для идентификации генов, определяющих групповую устойчивость к грибным патогенам, и рекомендуемые положительные контроли для изучаемой группы генов

Ген	Источник/ положительный контроль*	Молекулярный маркер	Структура праймеров (5′ – 3′)	Литературный источник	Верификация в отечественных лабораториях
Lr16/Sr23	*Triticum aestivum*/ изогенная линия *TcLr16*	wms210	F-TGCATCAAGAATAGTGTGGAAG R-TGAGAGGAAGGCTCACACCT	Roder et al., 1998	ИЦиГ СО РАН
		pwm6	F-AGTGCAGAGCAGAGGCAAAC R-TGCCATGGGCTCTACCATAC	Kassa et al., 2017	Не проводилась
		pwm16	F-CCTACCTAACCAGCGTGCTC R-CTGTGTAGACGGCGATACGA	»	Не проводилась
Lr24/Sr24	*Thinopyrum elongatum*/ изогенные линии *TcLr24*, *Sr24*	Sr24#12	F-TCGTCCAGATCAGAATGTG R-CTCGTCGATTAGCAGTGAG	Mago et al., 2005	ВИЗР (Садовая и др., 2014) ИЦиГ СО РАН
		SCS73	F-TCGTCCAGATCAGAATGTG R-CTCGTCGATTAGCAGTGAG	Prabhu et al., 2004	ВИЗР (Садовая и др., 2014) ИЦиГ СО РАН
Lr19/Sr25	*Thinopyrum elongatum*/ изогенная линия *TcLr19*, Омская 38, Экада 113, Волгоуральская, Степная 62	wmc 221	F-ACGATAATGCAGCGGGGAAT R-GCTGGGATCAAGGGATCAAT	CIMMYT, personal comm.	ИЦиГ СО РАН
		scs265	F-GGCGGATAAGCAGAGCAGAG R-GGCGGATAAGTGGGTTATGG	Gupta et al., 2006	ВИЗР (Садовая и др., 2014)
		Gb	Lr19gbF-CATCCTTGGGGACCTC Lr19gbR-CCAGCTCGCATACATCCA	Prins et al., 2001	Краснодарский НИИСХ (Давоян и др., 2014)
Lr26/Sr31/ Yr9/Pm8	*Secale cereale*/ изогенная линия *Sr31*, *TcLr26* Родина, Кавказ, Омская 38	scm9	F-TGACAACCCCCTTTCCCTCGT R-CATCGACGCTAAGGAGGACCC	Weng et al., 2007	ВИЗР (Садовая и др., 2014) Краснодарский НИИСХ (Давоян и др., 2014) ИЦиГ СО РАН
Lr37/Sr38/ Yr17	*Aegilops ventricosa*/ изогенная линия *TcLr37*	VENTRIUP-LN2	VENTRIUP-AGGGGCTACTGACCAAGGCT3 LN2-TGCAGCTACAGCAGTATGTACACAAAA	Helguera et al., 2003	ВИЗР (Садовая и др., 2014) Краснодарский НИИСХ (Давоян и др., 2014) ИЦиГ СО РАН
Lr34(=*Sr57/ Yr18/Pm38*)	*Triticum aestivum*/ изогенная линия *TcLr34* Chinese Spring	L34Plus	F-TTGATGAAACCAGTTTTTTTTCTA R-GCCATTTAACATAATCATGATGGA	Lagudah et al., 2009	ИЦиГ СО РАН
		csLV34	F-GTTGGTTAAGACTGGTGATGG R-TGCTTGCTATTGCTGAATAGT		ИЦиГ СО РАН Краснодарский НИИСХ (Давоян и др, 2014)
Lr6Ai#2/ Sr6Ai#2/ Pm6Ai#2	*Thinopyrum intermedium*/ Тулайковская 10	Xicg6A#2	Xicg6A#2_F Xicg6A#2_R	Салина и др., Патент № 2598275	ИЦиГ СО РАН
LrAsp7/ SrAsp7/ PmAsp7	*Aegilops speltoides*/ Линия 11-8	Xicg7S#118	118F-CCTCAAATGATCAATTATGTGCAAC 118R-GTCAGTGTGGACACTTAGTTC	Салина и др., неопубл. данные	ИЦиГ СО РАН

* В случае использования сортов в качестве положительного контроля необходима проверка растительного материала на однородность.

Дополнительные материалы 5

Условия проведения ПЦР

Ген	Маркер	Модифицированные условия ПЦР	Рекомендованная система визуализации маркера
Lr16/*Sr23*	wms210	94 °C – 30 с, далее 45 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 55 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	2 % агарозный гель
Lr24/*Sr24*	Sr24#12	94 °C – 30 с, далее 45 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 55 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	»
	SCS73	94 °C – 30 с, далее 35 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 58 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	»
Lr19/*Sr25*	wmc 221	94 °C – 30 с, далее 35 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 55 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	»
Lr26/*Sr31*/*Yr9*/*Pm8*	scm9	94 °C – 30 с, далее 45 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 50 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	»
Lr37/*Sr38*/*Yr17*	VENTRIUP-LN2	94 °C – 30 с, далее 40 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 65 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	1 % агарозный гель
Lr34(=*Sr57*/*Yr18*/*Pm38*)	L34Plus (=*cssfr1*)	94 °C – 30 с, далее 35 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 55 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	2 % агарозный гель
	csLV34	94 °C – 30 с, далее 35 циклов (94 °C – 1 мин; отжиг – 30 с при 55 °C – 45 с, 72 °C – 30 с); 72 °C – 5 мин	1 % агарозный гель
Lr6Ai#2/*Sr6Ai#2*/*Pm6Ai#2*	Xicg6A#2	94 °C – 3 мин, далее 40 циклов (94 °C – 1 мин, 55 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин), 72 °C – 5 мин	1.5 % агарозный гель
LrAsp7/*SrAsp7*/*PmAsp7*	Xicg7S#118	94 °C – 3 мин, далее 38 циклов (94 °C – 45 с, 55 °C – 45 с, 72 °C – 1 мин), 72 °C – 5 мин	1 % агарозный гель

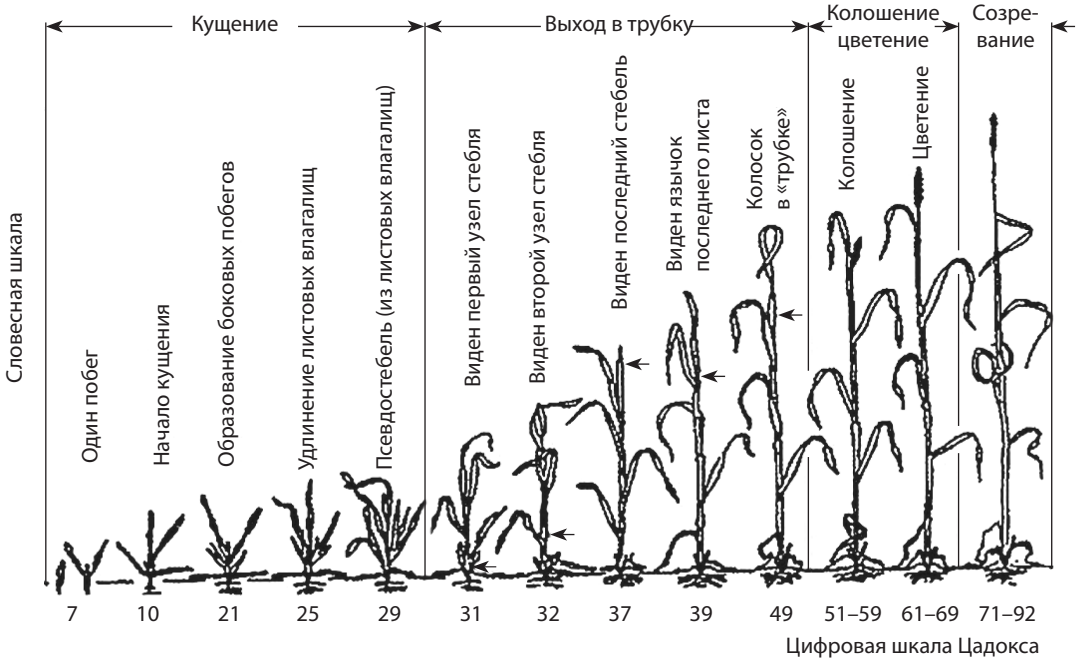
Дополнительные материалы 6

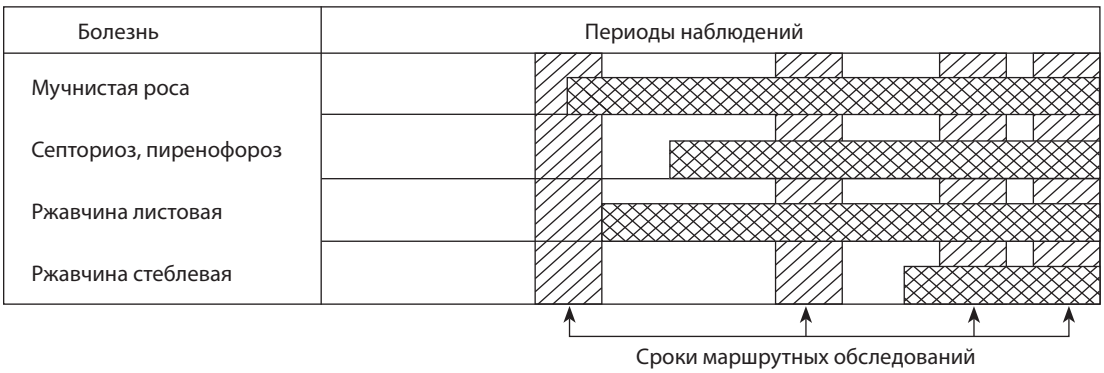
Интерпретация результатов амплификации молекулярных маркеров

Молекулярный маркер	Размер ожидаемых ПЦР-продуктов, п. н.		Гены
wms210 кодоминантный	210	190	
Интерпретация	+	–	*Lr16/Sr23*
Sr24#12 доминантный	500		
Интерпретация	+		*Lr24/Sr24*
SCS73 доминантный	719		
Интерпретация	+		*Lr24/Sr24*
wmc 221 кодоминантный	221	280	
Интерпретация	+	–	*Lr19/Sr25*
scm9* доминантный	207		
Интерпретация	+		*Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (транслокация 1RS.1BL)*
VENTRIUP-LN2 доминантный	259		
Интерпретация	+		*Lr37/Sr38/Yr17*
L34Plus доминантный	517		
Интерпретация	+		*Lr34*(=*Sr57/Yr18/Pm38*)
csLV34 кодоминантный	150	229	
Интерпретация	+	–	*Lr34*(*Sr57/Yr18/Pm38*)
Xicg6A#2 доминантный	331		
Интерпретация	+		*Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*
Xicg7S#118 кодоминантный	680	630	
Интерпретация	+	–	*LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*

* Маркер scm9 может также выявлять транслокацию 1AL.1RS с другими эффективными генами, *Lr* и *Sr*. В этом случае ожидаемая длина фрагмента ПЦР составляет 228 п. н. Если происхождение транслокации неизвестно, следует использовать гели с более высокой разрешающей способностью, чем приведено в Доп. материалах 5.

Дополнительные материалы 7





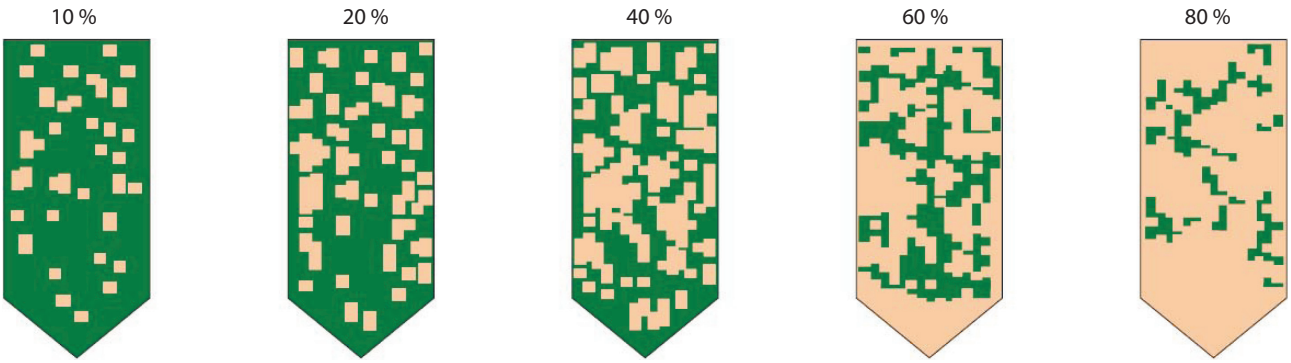
Соответствие стадий развития растений пшеницы и сроков обследований листостебельных заболеваний в Центральном регионе России (Санин, 2010).

Дополнительные материалы 8

Шкала оценки устойчивости пшеницы к мучнистой росе (Мережко, 1999)

Балл	Характер и степень поражения	Устойчивость
9	Единичные подушечки гриба на листьях и междоузлиях нижнего яруса; их может быть и больше, но они очень мелкие – в виде слабого налета; степень поражения до10 %	Очень высокая
7	Умеренное количество подушечек на листьях и междоузлиях нижнего яруса, степень поражения до 20 %	Высокая
5	Подушечки в массе развиваются на нижних листьях и междоузлиях, доходя до верхних ярусов отдельными рассеянными пятнами, степень поражения до 40 %	Средняя
3	Подушечки в изобилии развиваются на листьях и междоузлиях всех ярусов и даже на колосе, степень поражения до 60 %	Низкая
1	Растения полностью покрыты мучнистой росой, степень поражения до 80 %	Очень низкая

Дополнительные материалы 9



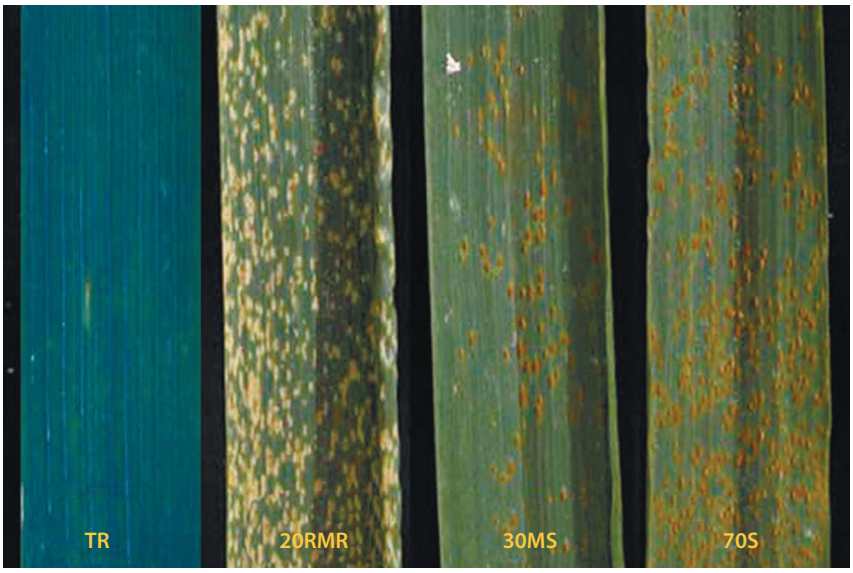
Предложенная CIMMYT шкала для определения степени пораженности листьев пшеницы мучнистой росой (Койшыбаев и др., 2014).

Дополнительные материалы 10

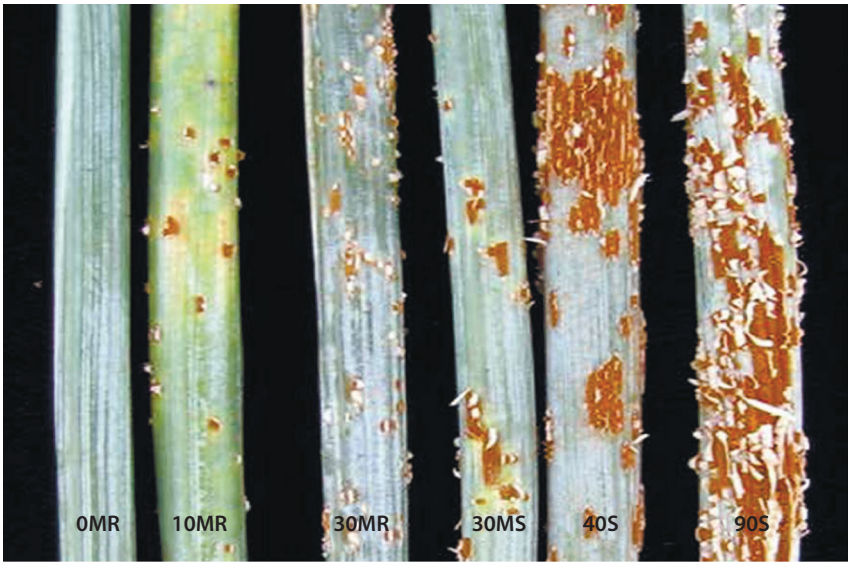
Сравнительная характеристика шкал для определения типа инфекции, реакции и симптомов поражения пшеницы ржавчиной (Койшыбаев и др., 2014)

По (Stakman et al., 1962)			По шкале CIMMYT	
Тип инфекции	Реакция	Симптом	Реакция	Симптом
0	Иммунность	Отсутствие видимых симптомов	0	Иммунность – признаки болезни отсутствуют
	Высокая устойчивость	Гиперчувствительные пятна	R	Устойчивость. Образуются хлорозные пятна, занимающие до 5–10 % поверхности листьев
1	Устойчивость	Мелкие пустулы с некрозом	MR	Средняя устойчивость. Пустулы мелкие, имеются хлоротичные зоны, занимающие не более 10–25 % (R-MR) от 25 до 40 % (MR)
2	Средняя устойчивость	Мелкие, средние пустулы без хлороза		
3	Средняя чувствительность	Среднего размера пустулы без хлороза	MS	Средняя восприимчивость. Пустулы мелкие, занимают до 40–50 % поверхности листьев
4	Чувствительность	Крупные пустулы без хлороза	S	Высокая восприимчивость. Пустулы крупные, занимают до 50–100 % поверхности листьев
X, X+	Гетерогенный тип	Пустулы разного типа	–	–
–	–	–	TS	Чувствительность. Пустулы единичные, без хлороза
–	–	–	TR	Устойчивость. Пустулы единичные, с некрозом

Дополнительные материалы 11



Бурая ржавчина



Стеблевая ржавчина

Шкалы CIMMYT для определения типа реакции и степени пораженности пшеницы бурой и стеблевой ржавчиной в поле (Койшыбаев и др., 2014).

Дополнительные материалы 12

Полевая оценка сибирской коллекции яровой мягкой пшеницы на устойчивость к комплексу грибных заболеваний

Болезнь		Бурая ржавчина			Стеблевая ржавчина			Мучнистая роса		
Сорта и линии мягкой пшеницы	Идентифицируемая группа генов	I*	II	III	I	II	III	I	II	III
Чернява 13	Восприимчивый контроль	90S	70S	80S	30–60MS	50MS	40–60MS	5	5	5
Omskaya 38	*Lr19/Sr25 Lr26/Sr31/Pm8*	R	R	15MR	R	R	10MR			
Lutestsens 11-04-5	*Lr19/Sr25*	M	40MS	25MR	M	R	M			
Lutestsens 54-04-17	»	R	R	5MR	R	R	5MR			
Lutestsens 220-03-45	»	R	R	R	5MR	5MR	M			
Lutestsens 595	»	R	40MS	M	40MR	5MR	M			
Omskaya 41	*Lr26/Sr31/Pm8*	R	R	50MS	R	M	M	7	5	5
Lutestsens 242-97-2-18	»	10MR	R	15MR	R	R	R	7	7	7
Lutestsens 242-97-2-21	»	M	R	R	R	R	R	7	5	9
Lutestsens 307-97-7	»	10MR	R	15MR	R	R	R	7	7	7
Lutestsens 363-96-4	»	15MR	R	10MR	R	R	5MR	7	7	7
LcSr24Ag	*Lr24/Sr24*	5MR	TS	10MR	R	M	60MS			
Sr 24(Agent)9* LMPG	»	R	R	R	R	R	30MR			
Ekada 146	*Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*	60MS	15MR	20MR	R	R	40S	7	5; 7	7
Ekada 121	»	40MS	R	30MR	R	5MS	70S	5	3; 5	5
FKP 109/7	»	30MR	15S	80S	R	10MR	20S	5	5	5
Ekada 85	*Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38) Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/ Pm6Ai#2*	R	R	R	R	R	M	7	7	7
Fiton 41	*Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*	90S	20MS	M	15MR	M	30S	5	3; 5	5
E-607	»	40MR	R	MR	R	R	R	5	5	7
212-02	»	15MR	TR	5MR	R	R	R	7	3	5
IR-43	»	M	R	R	R	R	R	5	3; 5	7
IR-49	»	S	20MR	M	R	R	R	7	7	7
Тулайковская 10	*Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/ Pm6Ai#2*	MR	MR	R	R	R	R	9	9	9
Тулайковская золотистая	*Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/ Pm6Ai#2*	MR	R	MR	R	R	R	9	9	9
11-8	*LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*	R	R	R	R	R	R	7	7	5; 7

* I, II, III – условные обозначения экспериментальных полей СибНИИРС – филиала ИЦиГ СО РАН, где изучали сибирские коллекции яровой мягкой пшеницы. I – инфекционный питомник, II и III – поля с естественным фоном на расстоянии 1–5 км друг от друга.