

Использование молекулярно-генетического и фитопатологического методов для идентификации генов эффективной устойчивости к листовой ржавчине у образцов эгилопсов

DOI: 10.30901/2227-8834-2020-2-87-95

УДК 633.11:632.937.14

Поступление/Received: 13.01.2020

Принято/Accepted: 09.06.2020



Л. Г. ТЫРЫШКИН, М. А. КОЛЕСОВА

Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44
✉ tyryshkinlev@rambler.ru

The use of molecular-genetic
and phytopathological methods to identify
genes for effective leaf rust resistance
in *Aegilops* accessions

L. G. TYRYSHKIN, M. A. KOLESOVA

N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources,
42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia
✉ tyryshkinlev@rambler.ru

Актуальность. Идентификация генов устойчивости к болезням является важнейшим этапом при рекомендации для использования образцов в селекции на резистентность. Для этого применяются три метода: гибридологический анализ, фитопатологический тест и ДНК-маркирование. Метод ПЦР-маркеров для идентификации генов устойчивости пшеницы и ее родичей к листовой ржавчине широко используется в нашей стране. Однако наличие фрагмента амплификации определенной длины вряд ли может рассматриваться как доказательство наличия гена устойчивости (вследствие рекомбинаций и мутаций в течение эволюции вида). Цель настоящего исследования – сравнение молекулярно-генетического и фитопатологического методов идентификации эффективных генов ювенильной устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* и *Lr41* у образцов трех видов рода *Aegilops* L. **Материалы и методы.** Идентифицировали гены устойчивости *Lr9* и *Lr41* у сорока образцов рода *Aegilops* с помощью ПЦР при использовании праймеров J13 и GDM35 соответственно. Фитопатологический тест проводили при заражении проростков популяцией возбудителя и клонами гриба, вирулентными к линии пшеницы с геном *Lr9*. **Результаты и выводы.** По результатам молекулярного маркирования ген *Lr41* присутствует у двенадцати образцов *Ae. tauschii* Coss.; *Lr9* – у четырех образцов *Ae. umbellulata* Zhuk. и четырех образцов *Ae. biuncialis* Vis. Все образцы *Ae. tauschii*, два образца *Ae. umbellulata* и три *Ae. biuncialis*, у которых по результатам молекулярного тестирования имеются эффективные гены резистентности, поражались популяцией патогена. Для трех образцов *Ae. umbellulata*, не имеющих гена *Lr9* по результатам ДНК-маркирования, показано его наличие фитопатологическим тестом. Таким образом, наблюдаются значительные различия в постулировании генов резистентности к ржавчине *Lr9* и *Lr41* у образцов *Aegilops* при использовании фитопатологического теста и ДНК-маркирования.

Ключевые слова: *Aegilops*, ювенильная устойчивость, молекулярно-генетический анализ, фитопатологический тест.

Background. Identification of effective genes for disease resistance in resistant plant samples is the most important step toward recommending them for breeding. There are three main methods for such identification: hybridological analysis, phytopathological test, and DNA marking. The method of PCR markers is widely used in Russia to identify resistance genes in wheat relatives, including the genus *Aegilops* L. for resistance to leaf rust. From a theoretical viewpoint, the presence of a certain amplification fragment can hardly be interpreted as a definite proof of the presence of a resistance gene: during the species evolution, recombination and mutations could occur, resulting in disturbance of the fragment's presence and phenotypic expression of its connection with resistance. The purpose of this work was a comparison between molecular-genetic and phytopathological methods to identify leaf rust resistance genes *Lr9* and *Lr41* in three *Aegilops* species. **Materials and methods.** We identified leaf rust resistance genes *Lr9* and *Lr41* in forty *Aegilops* accessions using PCR with J13 and GDM35 primers, respectively. In the phytopathological test, the seedlings were infected with the pathogen population (avirulent to *Lr9* and *Lr41* genes) and the fungus clones virulent to the wheat line with the *Lr9* gene. **Results and conclusions.** According to the data of molecular marking, the *Lr41* gene was present in twelve *Ae. tauschii* Coss. accessions; *Lr9* in four *Ae. umbellulata* Zhuk. accessions and four of *Ae. biuncialis* Vis. All accessions of *Ae. tauschii*, two of *Ae. umbellulata*, and three of *Ae. biuncialis*, possessing effective resistance genes according to the molecular testing, were susceptible to the pathogen population. For three *Ae. umbellulata* accessions resistant to the population, where DNA marking failed to identify an *Lr9* gene, the presence of this gene was shown by a phytopathological test. Thus, there were significant differences in the postulation of effective *Lr9* and *Lr41* leaf rust resistance genes in *Aegilops* accessions after a phytopathological test and the use of DNA markers.

Key words: juvenile resistance, leaf rust, molecular-genetic analysis, phytopathological test.

Введение

Листовая (бурая) ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) – высоко вредоносная болезнь мягкой пшеницы, распространенная практически во всех регионах возделывания культуры. Наиболее экономически выгодным и экологически безопасным методом борьбы с данным заболеванием является возделывание устойчивых сортов. Несмотря на то что количество генов резистентности пшеницы к листовой ржавчине весьма велико (только генов с постоянными символами *Lr* более 77), запас высокоэффективных генов устойчивости в генофонде *Triticum aestivum* L. крайне мал; по нашим данным, в настоящее время к отдельным популяциям возбудителя из России в ювенильной фазе высокоэффективны только гены *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr41* (= *Lr39*), *Lr47*, причем три первых уже потеряли свою эффективность в ряде регионов нашей страны. Выращивание сортов, защищенных единичными олигогенами устойчивости, часто приводит к быстрому накоплению вирулентных генотипов патогена и, следовательно, фенотипической потере устойчивости. Вследствие этого, поиск и создание доноров новых эффективных генов резистентности – крайне актуальная задача.

Межвидовая и межродовая гибридизация рассматривается как важный подход к расширению генетического разнообразия пшеницы по устойчивости к листовой ржавчине. Значительный интерес для интрогрессии представляют виды рода *Aegilops* L.: так, в настоящее время от *Ae. tauschii* Coss. в мягкую пшеницу переданы четыре гена устойчивости с постоянными символами (*Lr21*, *Lr22a*, *Lr32*, *Lr39* [= *41*]); от *Ae. speltoides* Tausch – шесть генов (*Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51* и *Lr66*); от *Ae. umbellulata* Zhuk. – два гена (*Lr9* и *Lr76*); по одному гену устойчивости привнесены в геном мягкой пшеницы от *Ae. ventricosa* Tausch (*Lr37*), *Ae. kotschy* Boiss. (*Lr54*), *Ae. sharonensis* Eig (*Lr56*), *Ae. geniculata* Roth (*Lr57*), *Ae. triuncialis* L. (*Lr58*), *Ae. peregrina* (Hack.) Maire et Weiller (*Lr59*), *Ae. neglecta* Req. ex Bertol. (*Lr62*) (McIntosh et al., 2013; McIntosh et al., 2016).

В нашем исследовании при изучении проростковой устойчивости к листовой ржавчине у образцов *Ae. tauschii*, *Ae. umbellulata* и *Ae. biuncialis* Vis. из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР) были выделены устойчивые формы (Tyryshkin et al., 2006; Tyryshkin et al., 2012; Kolesova, Tyryshkin, 2015; Kolesova, 2017).

Изучение генетического контроля устойчивости у выделенных резистентных образцов является важнейшим этапом при их рекомендации для использования в селекции, так как позволяет избежать широкого вовлечения в селекционный процесс одних и тех же генов устойчивости, оптимизировать схемы скрещиваний и отбора в расщепляющихся популяциях. Особенно важна идентификация генов устойчивости у родичей пшеницы, поскольку интрогрессивная гибридизация – это долговременный, трудоемкий и дорогостоящий процесс, и нежелательно вовлекать в него источники одних и тех же генов резистентности.

Для изучения генетического контроля устойчивости к листовой ржавчине и идентификации генов в настоящее время используются три основных метода: гибридологический анализ, фитопатологический тест и молекулярное (ПЦР / ДНК) маркирование. Гибридологический анализ, несмотря на надежность его результатов, весьма трудоемок и долгов, особенно для ди-

ких родичей пшеницы. Проведение фитопатологического теста при изучении высокоэффективной резистентности возможно только при наличии генотипов возбудителей болезней, маркированных вирулентностью к эффективным генам резистентности. С нашей точки зрения, это весьма надежный метод идентификации конкретных генов устойчивости (Tyryshkin, 2006, 2010), хотя в работах отечественных исследователей в последнее время указывается на его слабую информативность для характеристики генетической детерминации устойчивости у изучаемого материала без использования молекулярных подходов (Shishkin et al., 2018; Gulyaeva et al., 2019).

Метод использования ПЦР-маркеров для идентификации генов устойчивости пшеницы и ее родичей, в том числе и представителей рода *Aegilops*, к листовой ржавчине в последнее время достаточно широко используется в нашей стране (Dzhenin et al., 2009; Davoyan et al., 2012; Gulyaeva et al., 2014).

Однако следует отметить, что с теоретической точки зрения наличие фрагмента амплификации определенной длины вряд ли может рассматриваться как окончательное доказательство наличия функционального аллеля гена устойчивости, поскольку в течение эволюции вида могли происходить рекомбинации и мутации, приводящие к нарушению связи наличия фрагмента амплификации и фенотипического проявления резистентности.

Цель настоящего исследования – сравнение молекулярно-генетического и фитопатологического методов идентификации эффективных генов ювенильной устойчивости к листовой ржавчине *Lr9* и *Lr41* у образцов *Ae. tauschii*, *Ae. umbellulata* и *Ae. biuncialis*.

Материалы и методы

Материал исследования включал двадцать четыре образца *Ae. tauschii*: к-82, к-113, к-163, к-277, к-285, к-336, к-341, к-342, к-467, к-632, к-768, к-840, к-1031, к-1098, к-1112, к-1227 (Азербайджан), к-426 (Туркменистан), к-525, к-1159, к-1202, к-1564 (Армения), к-677 (Кыргызстан), к-997 (Афганистан) и к-3604 (Иран); десять образцов *Ae. umbellulata*: к-1283 (Армения), к-1461 (Азербайджан), к-2023, к-2029, к-2745 (Иран), к-3284, к-3287, к-3294, к-3312, к-3325 (Турция); шесть образцов *Ae. biuncialis*: к-3, к-644, к-2531, к-3003 (Россия), к-2892, к-2900 (Болгария), из коллекции генетических ресурсов растений ВИР. В качестве контрольных носителей генов *Lr41* и *Lr9* использовали образцы мягкой пшеницы KS90W-GRC10 (ген *Lr41*) (Singh et al., 2004) и почти изогенную линию сорта 'Тэтчер' ThLr9 соответственно.

Для идентификации эффективных генов устойчивости методом молекулярно-генетического маркирования тотальную ДНК выделяли суммарно из пяти листьев 10-дневных проростков микрометодом в пробирках типа Eppendorf по методике, предложенной К. Эдвардс с соавторами (Edwards et al., 1991) в модификации Д. Б. Дорохова и Э. Клоке (Dorokhov, Klocke, 1997).

Скрининг образцов *Ae. tauschii* на наличие гена *Lr41* проводили при помощи пары праймеров к микросателлитному локусу *Xgdm35*: GDM35-L (5'-CCTGCTCTGCCCTA-GATACG-3') и GDM35-R (5'-ATGTGAATGTGATGCATGCA-3'), тесно сцепленному с данным геном резистентности у образцов мягкой пшеницы (Pestsova et al., 2000; Singh et al., 2004). При изучении образцов *Ae. umbellulata*

и *Ae. biuncialis* для ПЦР-анализа использовали пару праймеров к высокоспецифичному у мягкой пшеницы, по литературным данным, STS-маркеру эффективного гена устойчивости *Lr9* (Schachermayr et al., 1994). Последовательности праймеров J13/1 – 5'-TCCTTTTATTCCG CACGCCGG-3'; J13/2 – 5'-CCACACTACCCCAAAGAGACG-3'. Данные праймеры ранее уже были использованы для идентификации этих генов резистентности у образцов рода *Aegilops* (например, Dzhenin et al., 2009; Davoyan et al., 2012).

Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 2 мкл раствора ДНК (50 нг/мкл), 0,2 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 2,5 мкл 10× реакционного ПЦР-буфера, предложенного фирмой – производителем фермента, 1,25 мкл каждого праймера (5 мМ), 1 мкл (2,5 мМ) раствора дезоксинуклеотидов (Chelkowski et al., 2003).

Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе iCycler Bio- Rad (США) по следующим программам: с праймерами Xgdm35 – 4 мин при температуре 94°C; 30 циклов (30 с – 94°C, 30 с – 55°C, 30 с – 72°C); финальная элонгация 5 мин при 72°C (Pestsova et al., 2000); с праймерами J13 – 94°C – 6 мин, 45 циклов (92°C – 60 с, 62°C – 60 с, 72°C – 120 с), 72°C – 4 мин (Schachermayr et al., 1994).

Электрофорез амплифицированных фрагментов проводили в 2-процентном агарозном геле в 1× TBE-буфере, окрашивали этидиум бромидом и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Для оценки размера амплифицированных фрагментов после ПЦР с праймерами J13 и Xgdm35 использовали маркеры молекулярной массы FastRuler™, 50–1500 пн (Fermentas) и GeneRuler™ Plus, 100 пн (Fermentas) соответственно.

Сорок образцов рода *Aegilops*, а также почти-изогенные по генам устойчивости к листовой ржавчине линии серии Тэтчер и образцы с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr9* – *Lr13*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15* – *Lr21*, *Lr22a*, *Lr22b*, *Lr23* – *Lr26*, *Lr29*, *Lr27+31*, *Lr32* – *Lr37*, *Lr41*, *Lr44* – *Lr49*, *Lr52*, *Lr57*, *Lr60* и *Lr64* были изучены по ювенильной устойчивости к листовой ржавчине. По 15–30 семян каждого образца высевали в кюветы на смоченную водой вату; кюветы с наклюнувшимися семенами переносили на светостановку с освещенностью 2500 люкс и температурой 20–22°C. Интактные растения в стадии 1–2 листьев,

включая те проростки, от которых отбирался материал для молекулярного маркирования, опрыскивали из пульверизатора водной суспензией уредоспор возбудителя болезни (30 тыс. спор/мл). Для инокуляции использовали сборную популяцию *P. tritricina* (смесь сборов с нескольких восприимчивых сортов пшеницы; Северо-Западный регион России, Северный Кавказ, Поволжье). Зараженные растения накрывали полиэтиленовой пленкой на одни сутки. Типы реакции учитывали на 12-е сутки после заражения по общепринятой шкале (Mains, Jackson, 1926) с модификациями, где 0 – отсутствие симптомов; 0 – некротические пятна без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – крупные пустулы без некроза; е.п. – единичные пустулы без некроза; х – на одном листе присутствуют пустулы восприимчивого и устойчивого типа. Типы реакции 0, 0; и 1 соответствуют высокой устойчивости, 2, е.п. и х – среднему уровню устойчивости и 3 – восприимчивости. Все формы, выделившиеся по устойчивости в одном эксперименте, оценивали не менее чем в трех дополнительных независимых опытах.

Образцы *Ae. umbellulata* также заражали тремя монопустульными изолятами патогена, ранее независимо выделенными в популяции *P. tritricina* из Западной Сибири, вирулентными к линии пшеницы с геном *Lr9*. Для заражения использовали отрезки листьев тех растений, которые были использованы для проведения молекулярного маркирования.

Результаты

У двенадцати из двадцати четырех изученных образцов *Ae. tauschii* выявлены фрагменты ожидаемого размера 190 пн после амплификации их ДНК с праймерами к микросателлитному локусу *Xgdm35*; соответственно, согласно результатам молекулярно-генетической идентификации, можно предполагать, что образцы к-336, к-341, к-342, к-632, к-768, к-840, к-1098, к-1159, к-1112, к-1202, к-1564 и к-3604 имеют функциональный аллель гена *Lr41* (табл. 1). Электрофореграмма продуктов амплификации у пяти образцов представлена на рисунке 1.

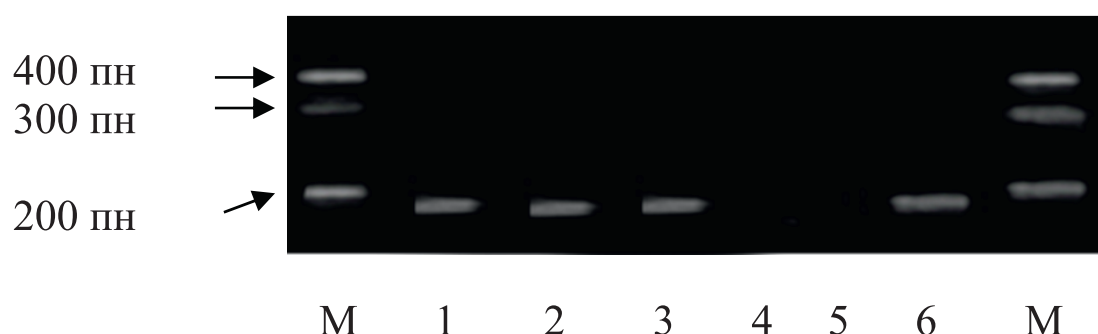


Рис. 1. Продукты амплификации микросателлитного маркера Xgdm35:

М – маркер молекулярной массы, пн; мягкая пшеница 1 – KS90WGRC10; образцы *Aegilops tauschii*: 2 – к-336, 3 – к-341, 4 – к-82, 5 – к-1227, 6 – к-3604

Fig. 1. Amplification products of the microsatellite marker Xgdm35:

М – marker of molecular weight, bp; bread wheat 1 – KS90WGRC10; *Aegilops tauschii* accessions: 2 – к-336, 3 – к-341, 4 – к-82, 5 – к-1227, 6 – к-3604

Таблица 1. Характеристика образцов *Aegilops tauschii* по наличию специфического амплифицированного фрагмента микросателлитного локуса *Xgdm35* и ювенильной устойчивости к листовой ржавчине**Table 1.** Characterization of *Aegilops tauschii* accessions for the presence of an amplified fragment of the microsatellite locus *Xgdm35* and juvenile resistance to leaf rust

№ по каталогу ВИР	Тип реакции на заражение сборной популяцией	Наличие амплифицированного фрагмента
82	3	–
113	3	–
163	3	–
277	3	–
285	3	–
336	3	+
341	3	+
342	3	+
426	3	–
467	3	–
525	3	–
632	3	+
677	3	–
768	3	+
840	3	+
997	3	–
1031	3	–
1098	3	+
1159	3	+
1112	3	+
1202	3	+
1227	3	–
1564	3	+
3604	3	+

Специфический продукт амплификации длиной 1100 пн, характерный для образцов мягкой пшеницы, имеющих ген устойчивости *Lr9*, был выявлен у четырех из десяти изученных образцов *Ae. umbellulata* – к-3294, к-1461, к-3284, к-3287 – после амплификации с праймерами J13 (табл. 2, рис. 2). Таким образом, согласно данным ДНК-маркирования, эти образцы должны иметь данный ген резистентности.

У четырех образцов *Ae. biuncialis* из шести изученных выявлен продукт амплификации размером 1100 пн после ПЦР с праймерами J13 (табл. 3), то есть согласно данным молекулярного маркирования эти образцы защищены данным геном устойчивости.

Заражение проростков линий и сортов пшеницы с известными сорока тремя *Lr*-генами устойчивости показало, что только гены *Lr9*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr41* и *Lr47* были

Таблица 2. Характеристика образцов *Aegilops umbellulata* по наличию специфического амплифицированного фрагмента после ПЦР с праймерами J13 и ювенильной устойчивости к популяции и изолятам возбудителя листовой ржавчины

Table 2. Characterization of *Aegilops umbellulata* accessions for the presence of a specific amplified fragment after PCR with J13 primers and juvenile resistance to leaf rust

№ по каталогу ВИР	Тип реакции на заражение, инокулюм				Наличие амплифицированного фрагмента
	Популяция	Клоны, вирулентные к <i>Lr9</i>			
		1	2	3	
1283	3	3	3	3	–
1461	0	3	3	3	+
2023	3	3	3	3	–
2029	3	3	3	3	–
2745	0	3	3	3	–
3284	3	3	3	3	+
3287	0	3	3	3	+
3294	3	3	3	3	+
3312	0	3	3	3	–
3325	0	3	3	3	–
Th <i>Lr9</i>	0	3	3	3	+

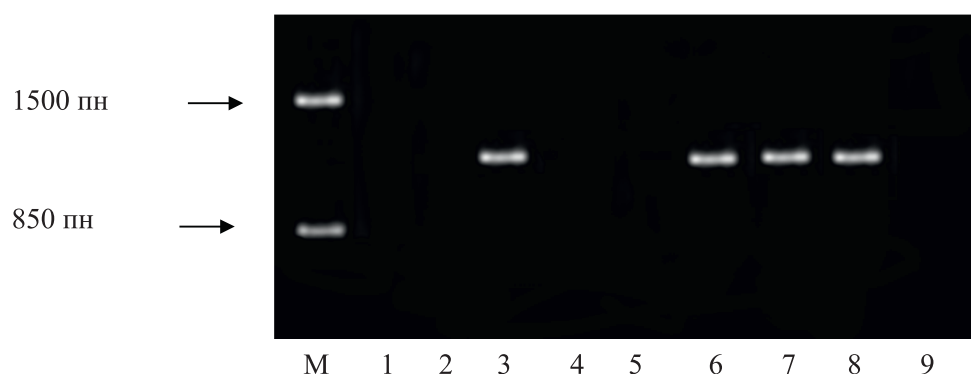


Рис. 2. Продукты амплификации после ПЦР с использованием праймеров J13:

М – маркер молекулярного веса, пн, 2 – Thatcher, 3 – ThLr9.

Образцы *Aegilops umbellulata*: 1 – к-3325, 4 – к-2029, 5 – к-3312, 6 – к-1461, 7 – к-3284, 8 – к-3287, 9 – к-2745

Fig. 2. Amplification products after PCR with primers J13:

M – marker of molecular weight, bp, 2 – Thatcher, 3 – ThLr9.

Aegilops umbellulata accessions: 1 – k-3325, 4 – k-2029, 5 – k-3312, 6 – k-1461, 7 – k-3284, 8 – k-3287, 9 – k-2745

Таблица 3. Характеристика образцов *Aegilops biuncialis* по наличию амплифицированного фрагмента после ПЦР с праймерами J13 и ювенильной устойчивости к листовой ржавчине**Table 3.** Characterization of *Aegilops biuncialis* accessions for the presence of an amplified fragment after PCR with J13 primers and juvenile resistance to leaf rust

№ по каталогу ВИР	Тип реакции на заражение сборной популяцией	Наличие амплифицированного фрагмента
3	X	+
644	X	+
2531	0	–
2892	0	–
2900	0	+
3003	3	+
ThLr9	0	+

высокоэффективны против популяции возбудителя листовой ржавчины, используемой в данном исследовании (типы реакции 0 и 0;).

К этой популяции возбудителя болезни были восприимчивы все изученные образцы *Ae. tauschii* (тип реакции 3), включая двенадцать, которые имели эффективный ген *Lr41* по результатам молекулярной идентификации. Таким образом, по результатам заражения патогеном ни один из этих образцов не мог иметь данный ген резистентности.

Из образцов *Ae. umbellulata* к используемой в работе популяции патогена были устойчивы (тип реакции 0) пять (к-1461, к-2745, к-3287, к-3312 и к-3325); образцы к-1283, к-2023, к-2029, к-3284, к-3294 были восприимчивы, причем два последних имеют эффективный ген *Lr9* согласно данным молекулярного маркирования.

Результаты искусственного заражения популяцией патогена указывают на отсутствие эффективных генов резистентности у образцов к-1283, к-2023, к-2029, к-3284, к-3294. Все устойчивые генотипы поражались тремя монопустульными изолятами *P. tritici*, вирулентными к линии пшеницы с геном *Lr9* (см. табл. 2), что с высокой долей вероятности указывает на наличие у них этого гена резистентности, причем только у двух из них (к-1461 и к-3287) данный ген идентифицируется по результатам ДНК-маркирования.

Три образца *Ae. biuncialis* (к-2900, к-2892, к-2531) были высокоустойчивы в стадии проростков к листовой ржавчине; (тип реакции 0). Образцы к-3, к-644 были среднеустойчивы (тип реакции X), а образец к-3003 восприимчив (тип реакции 3) к сборной популяции патогена (см. табл. 3), что доказывает отсутствие у них эффективных против данной популяции генов резистентности; однако по результатам анализа продуктов амплификации каждый из них имеет ген *Lr9*.

Обсуждение

Главной, если не единственной целью идентификации известных эффективных генов устойчивости к болезням у сородичей пшеницы является выявление тех образцов, которые имеют новые, до сих пор не интродуцированные в геном культурного вида гены резистен-

тности. Достаточно очевидно, что если выделенный устойчивый образец имеет один высокоэффективный ген устойчивости и этот ген уже присутствует у линий мягкой пшеницы, его повторная интрогрессия в результате долгого трудоемкого процесса межродовой (межвидовой) гибридизации с практической точки зрения не имеет смысла. Так, например, до сих пор эффективный на территории РФ ген *Lr41* был передан в мягкую пшеницу по крайней мере от пяти образцов *Ae. tauschii* различного географического происхождения и одного образца *Ae. cylindrica* Host (Singh et al., 2004). С помощью гибридологического и молекулярного анализов показана идентичность либо аллельность генов *Lr39* и *Lr41* (Singh et al., 2004).

В настоящее время существуют три основных способа идентификации известных генов резистентности (в том числе и к листовой ржавчине). Гибридологический анализ у диких родичей, в отличие от культурного вида, достаточно технически сложен и, главное, трудноприменим, поскольку требует наличия тестера конкретного гена резистентности. Данная проблема у мягкой пшеницы легко решается путем применения в скрещиваниях почти изогенных по конкретному *Lr*-гену линий; в случае дикого родича идеальным было бы использование того образца, от которого ген резистентности был передан в геном *T. aestivum*, что практически не всегда возможно.

Фитопатологический тест позволяет узнать, является ли изучаемый образец устойчивым к данной популяции патогена, а также одинаково ли «узнается» ген резистентности изучаемого устойчивого образца и известный ген резистентности.

Анализ продуктов амплификации (наличие / отсутствие, размер) после ПЦР с конкретной парой праймеров (в том числе и использованных в настоящем исследовании) во многих работах отечественных исследователей рассматривается как надежный метод идентификации генов устойчивости к листовой ржавчине как в образцах мягкой пшеницы, так и среди ее родичей, в том числе и представителей рода *Aegilops*. Преимуществом данного метода является быстрота, возможность выделения ДНК и ее использования в работе в любое время, отсутствие необходимости поддержа-

ния в живом виде генотипов патогена, отсутствие влияния факторов среды на результаты. Единичные молекулярные маркеры широко используются для идентификации генов устойчивости пшеницы к листовому ржавчине (например, Urbanovich et al., 2006; Gajnullin et al., 2007; Gulyaeva et al., 2019), хотя достаточно очевидно, что амплификация фрагмента ДНК определенного размера вряд ли может рассматриваться как окончательное доказательство наличия гена устойчивости (вследствие рекомбинаций и мутаций в течение эволюции вида).

В нескольких работах отечественных исследователей данный подход был применен для идентификации эффективных генов резистентности к листовому ржавчине и у образцов *Aegilops* (Dzhenin et al., 2009; Davoyan et al., 2012; Gulyaeva et al., 2014).

Так, с использованием ДНК-маркеров, тесно сцепленных с генами устойчивости *Lr28*, *Lr35* и *Lr47*, провели идентификацию этих генов резистентности у тринадцати образцов *Ae. speltooides* и девяти образцов *Ae. tauschii* (Gulyaeva et al., 2014). Отмечена нестрогая специфичность маркеров генов *Lr28* и *Lr35*. Маркер PS10 гена *Lr47* характеризовался высокой эффективностью, однако никаких доказательств этой эффективности для образцов вида – донора гена в статье не приведено.

В работе Дженина с соавторами (Dzhenin et al., 2009) на основе присутствия специфического продукта амплификации было постулировано наличие гена *Lr9* у образца к-1652 *Ae. triuncialis*; однако, этому выводу противоречили результаты заражения этого образца и линии пшеницы с данным геном тест-клонами патогена.

С помощью диагностических молекулярных маркеров, сцепленных с известными генами устойчивости к листовому ржавчине *Lr9*, *Lr35* и *Lr47*, был проведен скрининг образцов ДНК диких сородичей, синтетических форм и интрогрессивных линий мягкой пшеницы (Davoyan et al., 2012). Ген *Lr9* был идентифицирован в геноме всех изученных образцов вида *Ae. umbellulata*, гены *Lr35* и *Lr47* – в *Ae. speltooides*. Отметим, что ранее была показана восприимчивость к ржавчине одного из этих образцов *Ae. umbellulata* – к-1283 (Kolesova, Tyryshkin, 2015), что противоречит выводу о наличии у него данного гена резистентности.

По результатам настоящей работы наблюдаются значительные различия в постулировании эффективных генов резистентности к листовому ржавчине *Lr9* и *Lr41* у представителей рода *Aegilops* при использовании фитопатологического теста и ДНК-маркирования.

Ранее в нашей работе было показано, что микросателлитный локус *Xgdm35* не может быть использован для его идентификации у резистентных образцов *Ae. tauschii* (Tyryshkin, Kolesova, 2009). Так, у двух высокоустойчивых к листовому ржавчине форм к-624 и к-3299 отсутствовали амплифицированные фрагменты локуса *Xgdm35*. При этом с помощью фитопатологического теста и гибридологического анализа было доказано наличие у них именно эффективного гена ювенильной устойчивости *Lr41* (Kolesova, Tyryshkin, 2012).

Результаты настоящей работы также указывают на значительные расхождения в идентификации эффективных генов устойчивости к листовому ржавчине у образцов трех видов рода *Aegilops* с помощью ПЦР-маркеров и фитопатологического изучения.

Так, специфический продукт амплификации, тесно сцепленный с геном устойчивости *Lr41*, обнаружен

у двенадцати образцов *Ae. tauschii*. Поскольку используемая в работе популяция патогена не поражала линию пшеницы с данным геном, на основании молекулярного маркирования можно было бы предположить, что все эти образцы высокоустойчивы к данной популяции. Однако фитопатологический тест доказал их восприимчивость.

Продукт амплификации размером 1100 пн, характерный для образцов мягкой пшеницы, имеющих ген устойчивости *Lr9*, был выявлен у четырех из десяти изученных образцов *Ae. umbellulata* после амплификации ДНК с праймерами J13. Данный ген устойчивости являлся эффективным против сборной популяции возбудителя в настоящей работе, и следовательно, эти образцы должны быть резистентными. Однако образцы к-3294 и к-3284 по результатам фитопатологического тестирования оказались восприимчивыми. Среди пяти устойчивых образцов специфический продукт амплификации обнаружен только у двух. Это позволяет предполагать, что образцы к-3325, к-2745 и к-3312 не имеют гена *Lr9* и, следовательно, имеют новые эффективные гены резистентности, перспективные для переноса в геном мягкой пшеницы. Результаты заражения этих образцов тремя независимо выделенными изолятами *P. triticina*, вирулентными к изогенной линии с геном *Lr9*, наоборот, позволяют предполагать наличие у них этого гена. В пользу этого вывода указывают ранее полученные данные о моногенном характере наследования резистентности к болезни у образцов к-3287 (*Lr9*) и к-3312, а также отсутствию расщепления по признаку в комбинациях их скрещивания между собой (Kolesova, Tyryshkin, 2015).

Среди изученных шести образцов *Ae. biuncialis* у четырех выявлен диагностический маркер гена *Lr9*, однако три формы поражились ржавчиной, то есть функциональный аллель этого гена не может присутствовать у них.

Достаточно резкие отличия результатов молекулярного маркирования и фитопатологического теста, очевидно, указывают на высокую частоту ошибочного постулирования эффективных генов резистентности к листовому ржавчине у образцов рода *Aegilops* с помощью первого метода.

Таким образом, мы считаем, что использование только анализа наличия / отсутствия продуктов амплификации с конкретными праймерами не может надежно определять наличие или отсутствие эффективных генов устойчивости у образцов диких родичей пшеницы. Более надежные результаты могут быть получены с помощью фитопатологического теста, которые по возможности должны подкрепляться и гибридологическим анализом.

Заключение

Метод ДНК-маркеров широко используется в нашей стране для идентификации генов устойчивости пшеницы и ее родичей к листовому ржавчине. Однако нами показаны значительные различия в постулировании эффективных генов резистентности *Lr9* и *Lr41* у образцов *Aegilops* при использовании фитопатологического теста и ДНК-маркирования. Очевидно, результаты последнего метода не могут рассматриваться как надежное доказательство присутствия / отсутствия конкретных аллелей генов устойчивости у родичей пшеницы.

Работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану ВИР по проекту № 0662-2019-0006 «Поиск, поддержание жизнеспособности и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

The research was performed within the framework of the State Task according to the theme plan of VIR, Project No. 0662-2019-0006 "Search For and Viability Maintenance, and Disclosing the Potential of Hereditary Variation in the Global Collection of Cereal and Groat Crops at VIR for the Development of an Optimized Genebank and Its Sustainable Utilization in Plant Breeding and Crop Production".

References/Литература

- Chelkowski J., Golka L., Stepien L. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher. *Journal of Applied Genetics*. 2003;44(3):323-338.
- Davoyan E.R., Davoyan R.O., Bebyakina I.V., Davoyan O.R., Zubanova Y.S., Kravchenko A.M. et al. Identification of a leaf rust resistance gene in species of *Aegilops* L., synthetic forms, and introgression lines of common wheat. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2012;16(1):116-122. [in Russian] (Давоян Э.Р., Давоян Р.О., Бебякина И.В., Давоян О.Р., Зубанова Ю.С., Зинченко А.Н. и др. Идентификация генов устойчивости к листовой ржавчине в видах *Aegilops* L., синтетических формах и интрогрессивных линиях мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2012;16(1):116-122).
- Dorokhov D.B., Klocke E. A rapid and economic technique for RAPD-analysis of plant genomes. *Russian Journal of Genetics*. 1997;33(4):358-365. [in Russian] (Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов. *Генетика*. 1997;33(4):443-450).
- Dzhenin S.V., Lapochkina I.F., Zhemchuzhina A.I., Kovalenko E.D. Donors of spring wheat resistant to the leaf rust with the genetic material of *Aegilops speltoides* L., *Aegilops triuncialis* L., Dorof. et Migusch. *Russian Agricultural Sciences*. 2009;5:3-7. [in Russian] (Дзенин С.В., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Коваленко Е.Д. Доноры устойчивости яровой мягкой пшеницы к бурой ржавчине и мучнистой росе с генетическим материалом видов *Aegilops speltoides* L., *Aegilops triuncialis* L., *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. *Доклады РАСХН*. 2009;5:3-7).
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*. 1991;19(6):1349. DOI: 10.1093/nar/19.6.1349
- Gajnullin N.R., Lapochkina I.F., Zhemchuzhina A.I., Kiseleva M.I., Kolomiets T.M., Kovalenko E.D. Phytopathological and molecular genetic identification of leaf rust resistance genes in common wheat accessions with alien genetic material. *Russian Journal of Genetics*. 2007;43(8):1058-1064. [in Russian] (Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Использование фитопатологического и молекулярно-генетического методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом. *Генетика*. 2007;43(8):1058-1064).
- Gulyaeva E.I., Orina A.S., Gannibal Ph.B., Mitrofanova O.P., Odintsova I.G., Laikova L.I. The effectiveness of molecular markers for the identification of *Lr28*, *Lr35*, and *Lr47* genes in common wheat. *Russian Journal of Genetics*. 2014;50(2):147-156. [in Russian] (Гульятеева Е.И., Орина А.С., Ганнибал Ф.Б., Митрофанова О.П., Одинцова И.Г., Лайкова Л.И. Эффективность молекулярных маркеров для выявления генов *Lr28*, *Lr35* и *Lr47* у мягкой пшеницы. *Генетика*. 2014;50(2):147-156). DOI: 10.1134/S1022795414020069
- Gulyaeva E.I., Shaidayuk E.L., Rsaliev A.S. Identification of leaf rust resistance genes in spring soft wheat samples developed in Russia and Kazakhstan. *Plant Protection News*. 2019;3(101):41-49. [in Russian] (Гульятеева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Рсалиев А.С. Идентификация генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов яровой мягкой пшеницы российской и казахстанской селекции. *Вестник защиты растений*. 2019;3(101):41-49). DOI: 10.31993/2308-6459-2019-3(101)-41-49
- Kolesova M.A. Characterization of *Aegilops biuncialis* Viz. samples for juvenile resistance to fungal diseases. *Modern Science Success*. 2017;2(9):126-129. [in Russian] (Колесова М.А. Характеристика образцов *Aegilops biuncialis* Viz. по ювенильной устойчивости к грибным болезням. *Успехи современной науки*. 2017;2(9):126-129).
- Kolesova M.A., Tyryshkin L.G. Genetic control of effective juvenile resistance to foliar diseases in *Aegilops tauschii* Coss. samples. *Russian Agricultural Sciences*. 2012;6:27-30. [in Russian] (Колесова М.А., Тырышкин Л.Г. Генетический контроль эффективной ювенильной устойчивости образцов *Aegilops tauschii* Coss. к листовым болезням. *Доклады РАСХН*. 2012;6:27-30).
- Kolesova M.A., Tyryshkin L.G. Characterization of samples of *Aegilops* L. species by effective resistance to diseases. *Achievements of Science and Technology of AIC*. 2015;29(7):20-23. [in Russian] (Колесова М.А., Тырышкин Л.Г. Характеристика образцов рода *Aegilops* L. по эффективной устойчивости к болезням. *Достижения науки и техники АПК*. 2015;29(7):20-23).
- Mains E.B., Jackson H.S. Physiological specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. *Phytopathology*. 1926;16(1):89-120.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.S. Catalogue of gene symbols for wheat. 2013. Available from: <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/2013/GeneSymbol.pdf> [accessed Jan. 18, 2020].
- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., Xia X.C. Catalogue of gene symbols for wheat: 2015-2016 supplement. 2016. Available from: <https://shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2015.pdf> [accessed Jun. 25, 2019].
- Pestsova E., Ganai M.W., Röder M.S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*. 2000;43(4):689-697. DOI: 10.1139/gen-43-4-689
- Schachermayr G., Sielder H., Gale M.D., Winzeler H., Winzeler M., Keller B. Identification and localisation of molecular markers linked to the *Lr9* leaf resistance gene of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;88(1):110-115. DOI: 10.1007/BF00222402

- Shishkin N.V., Derova T.G., Gulyaeva E.I., Shaydayuk E.L. Identification of the genes resistant to brown rust in winter soft wheat varieties with the use of conventional and modern research methods. *Grain Economy of Russia*. 2018;5(59):63-67. [in Russian] (Шишкин Н.В., Дерова Т.Г., Гульяева Е.И., Шайдаюк Е.Л. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине у сортов озимой мягкой пшеницы с использованием традиционных и современных методов исследований. *Зерновое хозяйство России*. 2018; 5(59):63-67). DOI: 10.31367/2079-8725-2018-59-5-63-67
- Singh S., Franks C.D., Huang L., Brown-Guedira G.L., Marshall D.S., Gill B.S. et al. *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;108(4):586-591. DOI: 10.1007/s00122-003-1477-8
- Tyryshkin L.G. About DNA-markers as sole criteria for postulation of *Lr*-genes of the *Triticum aestivum* L. resistance to *Puccinia triticina* Erikss.: critical essay. *Agricultural Biology*. 2010;45(3):76-81. [in Russian] (Тырышкин Л.Г. Наличие ДНК-маркеров как критерий постуляции *Lr*-генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* L. к листовой ржавчине *Puccinia triticina* Erikss.: критический взгляд. *Сельскохозяйственная биология*. 2010;45(3):76-81).
- Tyryshkin L.G. Genetic control of effective juvenile resistance to leaf rust in collection samples of *Triticum aestivum* L. *Russian Journal of Genetics*. 2006;42(3):377-384. [in Russian] (Тырышкин Л.Г. Генетический контроль эффективной ювенильной устойчивости коллекционных образцов пшеницы *Triticum aestivum* L. к бурой ржавчине. *Генетика*. 2006;42(3):377-384).
- Tyryshkin L.G., Kolesova M.A. The possibility to identify gene *Lr41* for leaf rust resistance in *Aegilops* L. samples with use of molecular DNA marker Xgdm35. *Izvestiya Saint-Petersburg State Agrarian University*. 2009;16:23-26. [in Russian] (Тырышкин Л.Г., Колесова М.А. Возможность идентификации гена устойчивости к листовой ржавчине *Lr41* у образцов *Aegilops* L. с использованием молекулярного ДНК-маркера Xgdm35. *Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета*. 2009;16:23-26).
- Tyryshkin L.G., Kolesova M.A., Chikida N.N., Ibragimova M.H. Juvenile resistance to diseases in *Aegilops tauschii* Coss. samples. *Cereal Research Communications*. 2006;34(2-3):1067-1072. DOI: 10.1556/CRC.34.2006.2-3.239
- Tyryshkin L.G., Syukov V.V., Zaharov V.G., Zuev E.V., Gashimov M.E., Kolesova M.A. et al. Sources of effective resistance to fungal diseases in wheat and its relatives – search, creation and use in breeding. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;170:186-199. [in Russian] (Тырышкин Л.Г., Сюков В.В., Захаров В.Г., Зуев Е.В., Гашимов М.Э., Колесова М.А. и др. Источники эффективной устойчивости мягкой пшеницы и ее родичей к грибным болезням – поиск, создание и использование в селекции. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;170:186-199).
- Urbanovich O.Yu., Malyshev S.V., Dolmatovich T.V., Kartel N.A. Identification of leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars using molecular markers. *Russian Journal of Genetics*. 2006;42(5):546-554. [in Russian] (Урбанович О.Ю., Малышев С.В., Долматович Т.В., Картель Н.А. Определение генов устойчивости к бурой ржавчине в сортах пшеницы (*Triticum aestivum* L.) с использованием молекулярных маркеров. *Генетика*. 2006;42(5):675-683).

Прозрачность финансовой деятельности / The transparency of financial activities

Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах.

The authors declare the absence of any financial interest in the materials or methods presented.

Для цитирования / How to cite this article

Тырышкин Л.Г., Колесова М.А. Использование молекулярно-генетического и фитопатологического методов для идентификации генов эффективной устойчивости к листовой ржавчине у образцов эгилопсов. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(2):87-95. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-2-87-95

Tyryshkin L.G., Kolesova M.A. The use of molecular-genetic and phytopathological methods to identify genes for effective leaf rust resistance in *Aegilops* accessions. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2020;181(2):87-95. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-2-87-95

ORCID

Tyryshkin L.G. <https://orcid.org/0000-0002-3502-549X>

Kolesova M.A. <https://orcid.org/0000-0001-6310-127X>

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы / The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work

Дополнительная информация / Additional information

Полные данные этой статьи доступны / Extended data is available for this paper at <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2020-2-87-95>

Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы / The journal's opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employer

Все авторы одобрили рукопись / All authors approved the manuscript

Конфликт интересов отсутствует / No conflict of interest