

doi 10.18699/vjgb-25-133


Валидация маркеров, разработанных для выявления локусов устойчивости к *Pyrenophora teres* f. *teres* на хромосомах ячменя 3Н, 4Н и 6Н при полигенном наследовании признака

О.С. Афанасенко ¹, Н.В. Мироненко ¹, Н.М. Лашина¹, И.В. Розанова², Е.И. Кырова¹,
Ю.С. Никольская¹, А.А. Зубкович³

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР), Санкт-Петербург, Россия

² Научно-технологический университет «Сириус», Центр генетики и наук о жизни, Сочи, Россия

³ Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по земледелию, Жодино, Беларусь

 olga.s.afan@gmail.com

Аннотация. Возбудитель сетчатой пятнистости листьев ячменя *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (Ptt) относится к эпифитотийно опасным патогенам ячменя. Разработка генетической защиты от этой болезни – важное звено ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий возделывания ячменя. Для селекции на устойчивость к Ptt необходимы эффективные маркеры QTL, контролирующих как качественную, так и количественную устойчивость. При проведении полногеномного анализа (GWAS) нами выявлены образцы ячменя различного происхождения, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с локусами устойчивости одновременно на разных хромосомах. Целью исследований была валидация SNP-маркеров локусов устойчивости к Ptt на хромосомах 3Н, 4Н и 6Н с использованием F₂ популяции от скрещивания шести устойчивых образцов к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 и к-18552 с восприимчивым сортом Tatum. Расщепление по устойчивости во всех комбинациях скрещиваний подтвердило наличие нескольких генетических детерминант устойчивости у изучаемых образцов. Для изучения полиморфизма родительских компонентов скрещиваний и соответствия фенотипа наличию/отсутствию маркера в расщепляющихся популяциях были разработаны праймеры со специфичным 3'-концом, CAPS- и KASP-маркеры. Значимая связь ($p < 0.05$) наличия CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII на хромосоме 6Н и фенотипа устойчивости к Ptt у растений F₂ выявлена в комбинациях скрещивания восприимчивого сорта Tatum с образцами к-5900, к-8829, к-8877 и к-18552; на хромосоме 4Н при фрагментном анализе значимая связь с фенотипом устойчивости в популяции F₂ с участием образца к-8877 выявлена для маркера JHI-Hv50k-2016-237924, образца к-5900 для маркера SCRI_RS_181886 и образца к-8829 для маркера JHI-Hv50k-2016-166356. Наличие QTL на хромосоме 6Н, контролирующего качественную устойчивость у четырех образцов ячменя, маскирует проявление других генов с меньшим фенотипическим проявлением, что и является причиной несоответствия фенотипа устойчивости и наличия молекулярного маркера в расщепляющихся популяциях. Доноры устойчивости и молекулярные маркеры с доказанной эффективностью могут быть использованы в MAS для создания устойчивых к возбудителю сетчатой пятнистости сортов ячменя.

Ключевые слова: образцы ячменя; сетчатая пятнистость; устойчивость; SNP-маркеры; CAPS-маркеры; KASP-маркеры; доноры устойчивости

Для цитирования: Афанасенко О.С., Мироненко Н.В., Лашина Н.М., Розанова И.В., Кырова Е.И., Никольская Ю.С., Зубкович А.А. Валидация маркеров, разработанных для выявления локусов устойчивости к *Pyrenophora teres* f. *teres* на хромосомах ячменя 3Н, 4Н и 6Н при полигенном наследовании признака. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(8):1235-1245. doi 10.18699/vjgb-25-133

Финансирование. Работа поддержана грантом РФФИ № 24-26-00072.


Validation of markers for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* loci on barley chromosomes 3H, 4H, and 6H in the polygenic inheritance of the trait

O.S. Afanasenko ¹, N.V. Mironenko ¹, N.M. Lashina¹, I.V. Rozanova², E.I. Kyrova¹, Yu.S. Nikolskaya¹, A.A. Zubkovich³

¹ All-Russian Research Institute of Plant Protection (VIZR), St. Petersburg, Russia

² Sirius University of Science and Technology, Center of Genetics and Life Sciences, Sochi, Russia

³ Research and Practical Center of Agriculture of the National Academy of Sciences of Belarus, Zhodino, Belarus

 olga.s.afan@gmail.com

Abstract. The causal agent of net blotch *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (*Ptt*) is a dangerous pathogen of barley. The development of genetic protection against this disease is a necessary link in resource-saving and environmentally friendly barley cultivation technologies. Effective QTL markers controlling both qualitative and quantitative resistance are required for breeding for resistance to *Ptt*. As a result of GWAS, we identified barley accessions of different origins, the SNP haplotypes of which were associated with resistance loci simultaneously on different barley chromosomes (VIR catalogue numbers: k-5900, k-8829, k-8877, k-14936, k-30341 and k-18552). The aim of the study was to validate SNP markers (MM) of *Ptt* resistance loci on chromosomes 3H, 4H and 6H in F_2 from crossing six resistant accessions with the susceptible variety Tatum. The observed segregation for resistance in all crossing combinations confirmed the presence of several genetic determinants of resistance in the studied accessions. To study the polymorphism of the parents from the crosses and the correspondence between the phenotypes to the presence/absence of the markers in the segregating populations, primers with a specific 3'-end, CAPS markers, and KASP markers were developed. A significant association ($p < 0.05$) between the presence of the CAPS marker JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII on chromosome 6H and the phenotype of resistance to *Ptt* in F_2 plants was revealed in crosses between the susceptible cultivar Tatum and accessions k-5900, k-8829, k-8877 and k-18552. On chromosome 4H, a significant association with the resistance phenotype in the F_2 population from the cross with accession k-8877 was revealed for marker JHI-Hv50k-2016-237924, and in that from the cross with accession k-5900, for marker SCRI_RS_181886. The presence of QTL on chromosome 6H, which controls qualitative resistance in four barley accessions, masks the expression of other genes, which explains the discrepancy between the resistance phenotype and the presence of molecular markers in the segregating populations. Resistance donors and molecular markers with proven efficacy can be used in marker-assisted selection (MAS) to develop barley cultivars resistant to net blotch.

Key words: barley; net blotch; landraces; resistance; SNP markers; CAPS markers; KASP markers

For citation: Afanasenko O.S., Mironenko N.V., Lashina N.M., Rozanova I.V., Kyrova E.I., Nikolskaya Yu.S., Zubkovich A.A. Validation of markers for resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* loci on barley chromosomes 3H, 4H, and 6H in the polygenic inheritance of the trait *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(8):1235-1245. doi 10.18699/vjgb-25-133

Введение

Возбудитель сетчатой пятнистости листьев аскомицет *Pyrenophora teres* Drechs. f. *teres* (анаморфа: *Drechslera teres* Sacc. (Shoem.) = *Helminthosporium teres*) относится к эпифитотийно опасным патогенам ячменя. Потери урожая от пятнистостей листьев на восприимчивых сортах при благоприятных для развития болезни условиях могут достигать 40 %, ежегодные потери оцениваются в 12–17 %. По нашим данным, большинство зарегистрированных в Госреестре как яровых, так и озимых сортов ячменя восприимчивы к возбудителю сетчатой пятнистости. Отчасти это связано с методическими сложностями работы с гембиотрофными патогенами: сильная зависимость экспрессии устойчивости от факторов среды, неполное доминирование устойчивости и в связи с этим трудности отбора в расщепляющихся гибридных популяциях, сложное наследование признака устойчивости, обусловленное несколькими QTLs, эпистатические взаимодействия генов устойчивости.

Генетически защищенные от болезней сорта – необходимое звено ресурсосберегающих и экологически безопасных технологий возделывания сельскохозяйственных культур. Разработка эффективной генетической защиты базируется на наличии генетически разнообразных доноров генов качественной и количественной устойчивости и рациональным размещением их, с учетом ареалов популяций фитопатогенов, в различных агроклиматических регионах. Своевременная смена генетически защищенных сортов позволяет стабилизировать популяционный состав фитопатогенов и снизить вероятность эпифитотий.

В настоящее время с использованием двуродительских картирующих популяций и технологии ассоциативного картирования (GWAS – genome wide associated studies) гены и локусы количественной устойчивости (QTL) к *P. teres* f. *teres* (*Ptt*) идентифицированы на всех хромо-

сомах ячменя (Steffenson et al., 1996; Richter et al., 1998; Friesen et al., 2006; Manninen et al., 2006; Yun et al., 2006; Grewal et al., 2008, 2012; Gupta et al., 2010; Cakir et al., 2011; Liu et al., 2011; König et al., 2013, 2014; O'Boyle et al., 2014; Afanasenko et al., 2015, 2022; Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Martin et al., 2018; Dinglasan et al., 2019; Novakazi et al., 2019; Rozanova et al., 2019; Clare et al., 2021; Rehman et al., 2025). В наших исследованиях на основе полногеномного анализа ассоциаций (GWAS) устойчивости ячменя к *Ptt* в коллекции, состоящей из 449 сортов и образцов ячменя, генотипированных с помощью SNP-chip 50K Illumina на 33818 маркерах, были обнаружены 15 локусов и 43 SNP, значимо ассоциированные с устойчивостью к *Ptt* (Novakazi et al., 2019). В результате этой работы выявлена группа устойчивых образцов ячменя, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с локусами устойчивости одновременно на разных хромосомах ячменя, что свидетельствует, по-видимому, о наличии нескольких QTL и возможном аддитивном эффекте. Так, у шести устойчивых образцов ячменя, включенных в наше исследование (к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-30341, к-18552), гаплотипы SNP-маркеров у каждого образца были ассоциированы с 5–8 локусами устойчивости на хромосомах 3H, 4H, 6H и 7H.

Выявленные в результате этих исследований и в работах других авторов молекулярные маркеры (ММ) генов и локусов устойчивости к *P. teres* f. *teres* в большинстве случаев не были валидированы в другой генетической среде для их эффективного использования в селекции ячменя.

Целью исследований была валидация выявленных нами (Novakazi et al., 2019) и известных из литературы SNP-маркеров для локусов устойчивости к *Ptt* на хромосомах 3H, 4H и 6H в популяциях F_2 , полученных от скрещивания шести устойчивых образцов с восприимчивым сортом Tatum.

Таблица 1. Происхождение и хромосомная локализация QTL, ассоциированных с устойчивостью образцов ячменя (Novakazi et al., 2019)

Номер по каталогу ВИР	Разновидность	Происхождение	Список QTL
к-5900	<i>pallidum</i>	Туркменистан	6Н-1, 6Н-2, 6Н-3, 7Н
к-8829		Италия	4Н, 6Н-1, 6Н-2, 6Н-3, 3Н-1, 7Н
к-8877		Испания	4Н, 6Н-1, 6Н-2, 6Н-3, 3Н-1, 7Н
к-14936		Таджикистан	4Н, 6Н-1, 6Н-2, 6Н-3, 7Н
к-18552		Австралия	4Н, 6Н-1, 6Н-2, 6Н-3, 3Н-1, 3Н-2, 7Н
к-30341	<i>nigrum</i>	Перу	4Н, 6Н-1, 6Н-2, 3Н-1, 7Н

Примечание. Локусы находятся в интервалах, определенных с использованием ресурса Barleymap (<https://barleymap.eead.csic.es/barleymap>): 4Н – 58942545–67692302 и 448603913–449611912 п.н., 6Н-1 – 64219990–67138358 п.н., 6Н-2 – 125903650–151127756 п.н., 6Н-3 – 338755997–378210479 п.н., 3Н-1 – 119627830–130790360 п.н., 3Н-2 – 490244247–491381651 п.н., 7Н – 5165127 п.н. Рядность всех образцов ячменя равна шести.

Материалы и методы

Генотипы ячменя. Для скрещивания и получения расщепляющихся популяций F_2 были выбраны шесть устойчивых образцов ячменя (номера по каталогу ВИР): к-5900, к-8829, к-8877, к-14936, к-18552 (сорт Zolo) и к-30341, у которых гаплотипы SNP-маркеров проявляли ассоциации с локусами устойчивости на разных хромосомах ячменя, в том числе и на хромосомах 3Н, 4Н, 6Н. В качестве восприимчивого родителя был использован продуктивный сорт ячменя Tatum (разновидность *nutans*) из Германии. Характеристика образцов представлена в табл. 1.

Изоляты *P. teres f. teres*. Для оценки устойчивости при проведении GWAS были использованы пять изолятов *Ptt*: № 13 (Россия), Hoehenstedt (Германия), NFNB 50, NFNB 73 и NFNB 85 (Австралия) (Novakazi et al., 2019). В данном исследовании устойчивость шести образцов была изучена дополнительно к девяти изолятам *Ptt* различного происхождения (табл. S1)¹. Для всех изолятов определена формула вирулентности на стандартном наборе сортодифференциаторов (Afanasenko et al., 2009) (табл. S2).

Изучение устойчивости ячменя к *P. teres f. teres*. Методы выделения гриба в чистую культуру, хранение, культивирование на модифицированной среде Чапека и получение суспензии конидий *Ptt* для инокуляции растений подробно описаны в работах (Afanasenko et al., 2022; Лашина и др., 2023). Родительские компоненты скрещивания и по 65 семян каждой гибридной популяции F_1 высевали в контейнеры с почвогрунтом Terra Vita® объемом 1 л. Растения культивировали в контролируемых условиях климатической комнаты ВИЗР при температуре 20–22 °С и 16-часовом фотопериоде в течение 10–14 дней. Инокуляцию растений ячменя проводили в фазе двух–трех листьев путем опрыскивания суспензией моноконидиальных изолятов из расчета 0.2 мл на растение. Титр конидий в суспензии составлял 6000 на 1 мл. После инокуляции растения накрывали полиэтиленовыми пакетами и оставляли на 48 ч при температуре 20–22 °С без света. Через двое суток зараженные растения переносили в светоустановки, оснащенные светодиодными светильниками серии TL-FITO VR с 16-часовым фотопериодом, и поддерживали влажность воздуха 60–70 %.

¹ Табл. S1–S14 и рис. S1–S8 см. в Приложении по адресу: <https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx47.pdf>

Типы реакций проростков оценивали на втором листе через 10–12 суток после инокуляции по модифицированной десятибалльной шкале А. Текауз (1985), где значения 1.0–4.9 баллов характеризовали устойчивость; 5.0–5.9 – промежуточный тип реакции; 6.0–10 – восприимчивость.

Разработка праймеров. Для валидации выявленных SNP-маркеров использовали три подхода: а) Allele-Specific PCR (AS_PCR) – разработка праймеров с 3'-концом, который расположен на позиции SNP интереса. В зависимости от соответствия (комплементарности) SNP 3'-конца целевому участку ДНК получается наличие или отсутствие продукта ПЦР-амплификации; б) Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS) – детекция SNP с помощью CAPS-маркеров: исследуемый SNP находится в сайте распознавания рестрикционной эндонуклеазы. В результате полиморфизм продуктов рестрикции определяет наличие или отсутствие сайта рестрикции в ампликоне – разным генотипам будут соответствовать разные по длине фрагменты рестрикции в агарозном или полиакриламидном геле; в) Kompetitive allele specific PCR (KASP) – использование флуоресцентной системы генотипирования на основе ПЦР.

Позиция кандидатного SNP подтверждена с использованием ресурса Barleymap (<https://barleymap.eead.csic.es/barleymap>). Нуклеотидные последовательности, фланкирующие SNP (по 500 п.н. с каждой стороны), были экспортированы в базы данных Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>). Дизайн праймеров разрабатывался в программном пакете UGENE (v 49.1). Для CAPS-маркеров дополнительно использовался программный пакет SnapGene Viewer (<https://www.snapgene.com>) для анализа последовательности и подбора эндонуклеазы рестрикции, дифференцирующей генотипы по наличию/отсутствию сайта рестрикции в позиции SNP.

Для разработки KASP-маркеров нуклеотидные последовательности, фланкирующие ассоциированный с устойчивостью SNP (по 50 п.н. с каждой стороны), были экспортированы из базы данных Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>). На их основе разработаны специфичные к аллелям SNP последовательности праймеров для которых были использованы флуоресцентно меченные последовательности по протоколу, описанному в работе (Jatayev et al., 2017).

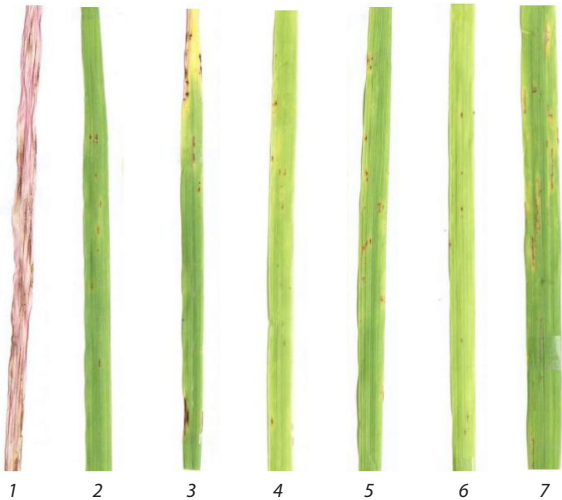
Выделение ДНК и условия проведения ПЦР. ДНК из замороженных листьев ячменя выделяли с помощью СТАВ (цетилтриметиламмония бромид). Для этого первый лист каждого растения до инокуляции изолятом F18 растирали в ступке с жидким азотом с добавлением 2 % СТАВ. Затем гомогенат лизировали при температуре 65 °C в течение двух часов. Очистку и экстракцию ДНК проводили по протоколу Murray, Thompson (1980). Осадок ДНК растворяли в деионизированной бидистиллированной стерильной воде до концентрации 100–150 мкг/мкл. Для амплификации использовали термоциклер C1000 (BIO-RAD). Реакцию проводили в 25 мкл: буфер (×10) – 2.5 мкл, MgCl₂ (50 mM) – 1.25 мкл, dNTP (10 mM) – 0.5 мкл, прямой и обратный праймеры (10 пмоль) – по 0.25 мкл, Taq-полимераза – 0.25 мкл, вода (бидистиллят) – 19.0 мкл, ДНК (10–20 нг) – 1.0 мкл. Для каждого праймера проводился подбор оптимальных условий ПЦР. Для большинства праймеров температура отжига составляла 60 °C. Праймеры приобретены в фирме Beagle Biotechnology (г. Санкт-Петербург, Россия). Рестрикцию эндонуклеазами HindIII, NruI и RsaI проводили согласно протоколам, предложенным фирмой-производителем (SibEnzyme), визуализацию продуктов рестрикции проводили в 2 % агарозном геле.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ проводили с использованием критерия χ^2 . Расчеты выполняли в программе STATISTICA 13.0 (Statsoft, www.statsoft.com) и с применением методики, описанной в работе N. Pandis (2016). При $p < 0.05$ для критерия χ^2 дополнительно применялся точный тест Фишера.

Диагностическая эффективность тестируемых маркеров определялась как отношение суммы истинно положительных и истинно отрицательных результатов к общему числу исследованных растений.

Результаты

Устойчивость родительских компонентов скрещивания
Устойчивость родительских компонентов скрещивания изучена к девяти изолятам различного происхождения, принадлежащим к восьми патотипам *Ptt* (см. табл. S2). Все образцы ячменя отличались расоспецифической устой-



Типы реакции родительских компонентов скрещиваний при заражении изолятом F18, в скобках указан балл поражения: 1 – Tatum (10), 2 – к-5900 (3), 3 – к-8829 (3.5), 4 – к-8877 (2), 5 – к-14936 (3), 6 – к-18552 (2), 7 – к-30341 (4).

чивостью (табл. 2). К образцам к-8829, к-8877, к-14936 и к-18552 из девяти изученных изолятов один отличался вирулентностью, тогда как к образцу к-30341 четыре изолята были вирулентны.

Для анализа расщепления по устойчивости в гибридных популяциях F₂ от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum был использован изолят F18, так как все изучаемые образцы были к нему устойчивы, а сорт Tatum демонстрировал максимальный тип реакции – 10 баллов (восприимчивость) (см. рисунок).

Расщепление по устойчивости к *Ptt* в популяциях F₂ от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum

Фактическое расщепление по устойчивости в гибридных популяциях F₂ во всех комбинациях скрещиваний не соответствовало простому наследованию признака устойчивости как при объединении класса с промежуточными реакциями с классом устойчивых, так и с классом

Таблица 2. Тип реакции образцов ячменя на инокуляцию изолятами *P. teres* f. *teres*

Образец ячменя	Тип реакции, балл									
	F18	S18	B18	V13	Pr2	Ger7	Cz11.1	Can11	SA7	Среднее
к-5900	3	5	2	2	3	3	5	2	4	3.2
к-8829	3	4	2	1	4	6	4	3	2	3.2
к-8877	2	7	1	1	2	1	1	3	2	2.2
к-14936	3	2	3	3	2	1	6	2	1	2.9
к-18552	2	3	1	1	4	6	2	3	2	2.7
к-30341	4	4	4	9	7	8	8	5	2	5.7
Контроли устойчивости и восприимчивости										
Canadian Lake Shore (CLS) QPtt3H _{CLS} (R)	1	3	3	2	3	5	1	3	2	2.6
C.I. 5791 QPtt6H _{5791 55CM} (R)	1	2	5	5	3	2	3	2	2	2.8
Harrington (S)	10	10	10	10	9	10	10	9	9	9.7
Tatum (S)	10	10	9	10	10	9	10	10	9	9.7

Таблица 3. Расщепление по устойчивости к изоляту F18 в популяции F₂ от скрещивания устойчивых образцов ячменя с восприимчивым сортом Tatum

Устойчивый образец	Реакция родителей		Число устойчивых/восприимчивых и с промежуточной реакцией растений в популяциях F ₂		
	P1 устойчивый	P2 восприимчивый	Устойчивые	Промежуточный тип реакции	Восприимчивые
к-5900	3.0	10.0	8	7	38
к-8829	3.5	10.0	4	7	54
к-8877	2.0	9.0	28	11	25
к-14936	3.0	10.0	17	14	28
к-18552	2.0	9.0	31	8	24
к-30341	4.0	9.0	13	11	41

Примечание. Реакция родителей оценена по десятибалльной шкале A. Tekauz (1985).

Таблица 4. Позиции SNP-маркеров, ассоциированных с ювенильной устойчивостью к *Ptt* на хромосомах 4Н, 3Н и 6Н

Маркер	Хромосома	Позиция на генетической и физической картах генома ячменя		Литературный источник
JHI-Hv50k-2016-237471	4Н	50.00	58942545	Novakazi et al., 2019
JHI-Hv50k-2016-237347		50.00	57098155	
JHI-Hv50k-2016-237684		50.20	60114530	
JHI-Hv50k-2016-237839		50.30	61872363	
JHI-Hv50k-2016-241935		50.40	67692302	
JHI-Hv50k-2016-237924		50.99	63065507	
SCRI_RS_170494	3Н-2	52.00	448603913	Richards et al., 2017
SCRI_RS_181886		52.20	449611912	
SCRI_RS_153184		97.00	584761404	
SCRI_RS_154517		2.00	2772827	
JHI-Hv50k-2016-183463		54.53	491373166	
JHI-Hv50k-2016-183478		54.53	491381651	
JHI-Hv50k-2016-183207	3Н-1	52.46	490244247	Novakazi et al., 2019
JHI-Hv50k-2016-165152		45.82	73225203	
JHI-Hv50k-2016-166392		47.1	130790360	
JHI-Hv50k-2016-166356		47.2	119627830	
JHI-Hv50k-2016-391380	6Н-2	52.2	125903650	Manninen et al., 2006
BOPA2_12_31178	6Н-3	55.00	378210479	

Примечание. Генетическая позиция определена из текущей версии MorexV3 (Mascher et al., 2021).

восприимчивых растений, что подтверждает наличие нескольких генетических детерминант устойчивости у изучаемых образцов (табл. 3).

Полиморфизм родительских компонентов скрещивания по молекулярным маркерам на хромосоме 4Н

Для изучения полиморфизма родительских компонентов скрещиваний использовали праймеры со специфичным 3'-концом (табл. S3), CAPS-маркеры и конкурентную аллель-специфичную ПЦР (KASP-маркеры). Изучено 10 маркеров на хромосоме 4Н: пять маркеров, которые были определены по данным GWAS, были ассоциированы с устойчивостью к изоляту № 13 *P. teres f. teres* в интервале 50.0–50.4 cM (Novakazi et al., 2019) и пять маркеров, которые были ассоциированы с устойчивостью к *Ptt* в работах

других исследователей (Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018). Позиции всех 10 маркеров приведены в табл. 4. Для двух SNP-маркеров на хромосоме 4Н были разработаны CAPS-маркеры.

При использовании эндонуклеазы рестрикции *NruI* для маркера JHI-Hv50k-2016-237684 различают два аллеля: при наличии аллеля Т, где отсутствует сайт рестрикции, образуется фрагмент длиной 548 п. н.; при наличии аллеля С, который имеет сайт рестрикции, образуются фрагменты 197 и 351 п. н. При использовании эндонуклеазы рестрикции *RsaI* для маркера JHI-Hv50k-2016-237924 также можно различить два аллеля: аллель G разрезается на фрагменты 177, 105, 38, 55 п. н., а аллель С – на фрагменты 177, 29, 76, 38, 55 п. н. Четыре SNP-маркера на хромосоме 4Н были преобразованы в формат KASP-маркеров (табл. S4).

Таблица 5. Результаты выявления полиморфных фрагментов рестрикции продуктов амплификации маркеров на хромосоме 4Н у родительских компонентов скрещиваний

Маркер	Праймер	Рестриктаза	Фрагменты рестрикции продуктов амплификации у образцов ячменя, п. н.						
			к-5900	к-8829	к-8877	к-14936	к-18552	к-30341	Tatum
JHI-Hv50k-2016-237684	4Н-684	NruI	548	351, 197	351, 197	351, 197	548	351, 197	548
JHI-Hv50k-2016-237924	4Н-924	RsaI	177, 105, 55, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 105, 55, 38	177, 76, 56, 29, 38	177, 105, 55, 38

Таблица 6. Полиморфизм KASP-маркеров на хромосоме 4Н у родительских компонентов

Образец ячменя	4Н-471	4Н-839	4Н-935	4Н-347
Tatum	CC	GG	GG	CC
к-8829	GG	AA	AA	AA
к-14936	GG	AA	AA	AA
к-8877	AA	AA	AA	AA

Фрагментный анализ

Результаты тестирования разработанных праймеров на родительских компонентах скрещивания приведены в табл. S5. Критерием перспективного маркера считали наличие продуктов амплификации для устойчивых генотипов ячменя и отсутствие для восприимчивого или наоборот. Полиморфизм по наличию продуктов амплификации у определенных генотипов ячменя выявлен для маркеров JHI-Hv50k-2016-237924 (4Н-924), SCRI_RS_153184 (4Н-184) и SCRI_RS_181886 (4Н-886). На рис. S1 представлен пример выявления полиморфизма у родительских компонентов скрещивания с использованием маркера SCRI_RS_181886. Наличие продукта амплификации как у устойчивых, так и восприимчивого генотипов ячменя обнаружено с использованием праймеров остальных восьми маркеров.

Анализ длины фрагментов продуктов амплификации маркеров после обработки рестриктазами

Рестрикционный анализ продуктов амплификации выявил полиморфизм для маркеров JHI-Hv50k-2016-237684 и JHI-Hv50k-2016-237924 (табл. 5): маркер JHI-Hv50k-2016-237684 (рестриктаза NruI): у четырех устойчивых образцов к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 выявлены два фрагмента, 351 и 197 п. н. Продукт амплификации восприимчивого сорта Tatum и образцов к-5900 и к-18552 имел длину 548 п. н. (рис. S2); маркер JHI-Hv50k-2016-237924 (рестриктаза RsaI): у устойчивых образцов к-8829, к-8877, к-14936, к-30341 выявлены пять фрагментов, у восприимчивого сорта Tatum и образцов к-5900 и к-18552 – четыре фрагмента (см. рис. S2). Таким образом, для изучения косегрегации ММ и признака устойчивости в расщепляющихся популяциях ячменя использованы маркеры JHI-Hv50k-2016-237684 и JHI-Hv50k-2016-237924 и соответствующие рестриктазы NruI и RsaI для расщепления продуктов амплификации обоих маркеров.

Результаты изучения полиморфизма по KASP-маркерам на хромосоме 4Н родительских компонентов скрещивания представлены в табл. 6. Аллельный полиморфизм устой-

чивых образцов и восприимчивого сорта Tatum выявлен для четырех маркеров JHI-Hv50k-2016-237471 (4Н-471), JHI-Hv50k-2016-237839 (4Н-839), JHI-Hv50k-2016-241935 (4Н-935) и JHI-Hv50k-2016-237347 (4Н-347), которые были использованы для изучения косегрегации фенотипа устойчивости и генотипа маркера.

Полиморфизм молекулярных маркеров на хромосоме 3Н у родительских компонентов, использованных для скрещивания

По данным GWAS, устойчивость образцов к-8829, к-8877, к-18552 и к-30341 ассоциирована также с локусами 3Н-1 и 3Н-2 (см. табл. 1 и 4). Ранее нами были валидированы в расщепляющихся популяциях KASP-маркеры этих локусов на хромосоме 3Н, которые были высокоэффективны (более 80 %) у генотипов ячменя CLS, Morex и Fox – носителей главного гена резистентности *qPttCLS* (Afanasenko et al., 2022). Эти KASP-маркеры, находящиеся в интервале 45.82–47.2 и 52.46–54.53 сМ, были использованы для анализа расщепляющихся популяций, полученных от скрещивания сорта Tatum с устойчивыми к *Ptt* образцами (табл. S6).

Для фрагментного анализа продуктов амплификации маркеров на хромосоме 3Н были также использованы праймеры, предложенные в работе (Afanasenko et al., 2022) (табл. S7). При фрагментном анализе полиморфизм по наличию продуктов амплификации у трех устойчивых образцов (к-8877, к-5900 и к-8829) и восприимчивого сорта Tatum выявлен только для маркера JHI-Hv50k-2016-166356, который был использован для анализа расщепляющихся популяций. Для остальных шести маркеров наблюдалось отсутствие полиморфизма между устойчивыми образцами и восприимчивым сортом Tatum.

При использовании KASP-маркеров полиморфизм по SNP-гаплотипам выявлен только у одного устойчивого образца к-14936 (GG) и восприимчивого сорта Tatum (CC) и только для маркера JHI-Hv50k 2016-165152. KASP-маркеры JHI-Hv50k-2016-166392, JHI-Hv50k-2016-183463, JHI-Hv50k-2016-183207 показывали гетерозиготные SNP-гаплотипы, что делает их непригодными для маркирования образцов (табл. S8).

Полиморфизм родительских компонентов скрещивания по молекулярным маркерам на хромосоме 6Н

Устойчивость изучаемых образцов ассоциирована также с несколькими локусами на хромосоме 6Н (см. табл. 1 и 4). Ранее с использованием дигаплоидных картирующих популяций на хромосоме 6Н в интервале 52.00–55.03 сМ у образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 был определен большой ген *RPt5*, детерминирующий высокую качествен-

ную устойчивость к *Ptt* (Manninen et al., 2006; Потокина и др., 2010; Koladia et al., 2017). Результаты GWAS (Novakazi et al., 2019) подтвердили в этом интервале наличие локусов устойчивости, маркеры которых были объединены в четыре группы в зависимости от их расположения на генетической и физической картах ячменя (см. табл. 1 и 4). В предыдущих исследованиях, с использованием в качестве тестерных генотипов образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874, нами была показана эффективность двух маркеров локусов устойчивости на хромосоме 6Н, которые были использованы в данном исследовании (см. табл. 4): JHI-Hv50k-2016-391380 (6Н-380) в позиции 52.20 (6Н-2) и WORA2_12_31178 (6Н-178) в позиции 55.03 сМ (6Н-3) (неопубликованные данные). На основе маркера 6Н-380 разработан CAPS-маркер с использованием рестриктазы HindIII. Аллель А: сайт рестрикции → два фрагмента 282 и 254 п.н.; аллель Г: нерасщепленный фрагмент, размером 536 п.н.

Праймеры для маркеров, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres f. teres* на хромосоме 6Н, приведены в табл. S9. Оба маркера показали полиморфизм для родительских компонентов скрещивания. Маркер 6Н-380: рестриктаза HindIII не расщепляла продукт амплификации маркера 6Н-380 у всех шести устойчивых генотипов (один фрагмент), но расщепляла у восприимчивого сорта Tatum (два фрагмента). Маркер 6Н-178 выявил полиморфизм между устойчивыми образцами ячменя к-5900, к-8829 и восприимчивом сортом Tatum (рис. S3).

Изучение косегрегации устойчивости к *Ptt* и молекулярных маркеров в расщепляющихся популяциях

Для изучения косегрегации по устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости и выявленных полиморфных

маркеров на хромосомах 4Н, 3Н и 6Н в каждой гибридной популяции были отобраны 10 устойчивых и 10 восприимчивых линий. В некоторых комбинациях скрещиваний для подтверждения результатов расщепления анализируемая выборка гибридных растений была расширена до 40: 20 устойчивых и 20 восприимчивых.

Фрагментный анализ с использованием полиморфных молекулярных маркеров

Результаты соответствия фенотипа устойчивости растений F_2 с наличием/отсутствием продуктов амплификации ММ представлены в табл. 7. Значимая связь между маркером и устойчивостью растений при использовании критерия χ^2 выявлена для маркера 3Н-56 в комбинации Tatum × к-8829, но точный тест Фишера не подтвердил достоверность ассоциации (см. табл. 7).

Достоверная связь признака устойчивости растений F_2 и маркера 4Н-924 выявлена в комбинации скрещивания Tatum × к-8877, а также маркера 4Н-886 (F × Rin1) в комбинации Tatum × к-5900. Для остальных изученных ММ, несмотря на полиморфность на родительских компонентах скрещиваний, достоверная связь с устойчивостью в расщепляющихся популяциях не выявлена. Полученные данные свидетельствуют о наличии QTL устойчивости к *Ptt* на хромосоме 4Н у образцов к-8829, к-8877 и к-5900.

Анализ соответствия фенотипа устойчивости растений F_2 и продуктов рестрикции CAPS-маркеров

Полиморфными на родительских компонентах скрещиваний по размерам продуктов рестрикции оказались два маркера на хромосоме 4Н: 4Н-684 NruI и 4Н-924 RsaI. На рис. S4 и S5 демонстрируется полиморфизм фрагментов рестрикции маркера 4Н-684 эндонуклеазой NruI в потомстве скрещивания Tatum × к-8829 и Tatum × к-8877.

Таблица 7. Достоверность связи признака устойчивости к *Ptt* и молекулярных маркеров, полиморфных на родительских компонентах скрещивания (фрагментный анализ)

Комбинация скрещивания сорта Tatum и устойчивых образцов	Маркер (праймеры)	χ^2	p-value
к-8829	4Н-184 (F × R)	2.50	> 0.05
	4Н-347 (F × R1)	4.62	< 0.05
	6Н-178 (F × R)	2.50	> 0.05
	3Н-56 (F × R)	4.29	< 0.05
к-8877	4Н-924 (Fin1 × Rout)	7.07	< 0.05
	4Н-886 (F × R)	0.00	> 0.05
	3Н-56 (F × R)	3.14	> 0.05
к-14936	4Н-924 (Fin1 × Rout)	0.19	> 0.05
	4Н-886	2.33	> 0.05
к-30341	4Н-924 (Fin2 × Rout)	0.40	> 0.05
	4Н-886 (F × Rin1)	0.00	> 0.05
к-5900	4Н-886 (F × Rin1)	4.41	< 0.05
	6Н-178 (F × R)	2.61	> 0.05
	3Н-56 (F × R)	0.01	> 0.05
к-18552	4Н-924	0.02	> 0.05

Примечание. Связь фенотипа устойчивости и маркера значима при $p < 0.05$, отмечена полужирным шрифтом.

Таблица 8. Соответствие фенотипической устойчивости и продуктов рестрикции CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 (HindIII) на хромосоме 6Н в F₂ от скрещивания устойчивых образцов и восприимчивого сорта Tatum

Комбинация скрещивания восприимчивого сорта Tatum с устойчивыми образцами	Размер продукта рестрикции	Генотип	У	В	Расчетное значение χ^2	Достоверность p
к-18552	536	GG (Y)	4	0	34.693	< 0.001
	536, 282, 254	AG	14	0		
	282, 254	AA (B)	0	10		
к-8877	536	GG (Y)	13	0	21.0115	< 0.05
	536, 282, 254	AG	6	13		
	282, 254	AA (B)	1	8		
к-14936	536	GG (Y)	6	3	1.54553	> 0.05
	536, 282, 254	AG	9	12		
	282, 254	AA (B)	3	4		
к-8829	536	GG (Y)	5	1	10.37037	< 0.05
	536, 282, 254	AG	0	6		
	282, 254	AA (B)	0	2		
к-5900	536	GG (Y)	3	1	6.831019	< 0.05
	536, 282, 254	AG	5	10		
	282, 254	AA (B)	0	7		
30341	536	GG (Y)	2	2	0.31111	> 0.05
	536, 282, 254	AG	5	4		
	282, 254	AA (B)	2	3		

Примечание. У – устойчивость, В – восприимчивость. Связь фенотипа устойчивости и маркера значима при $p < 0.05$, отмечена полужирным шрифтом. Минимальное табличное значение χ^2 при уровне значимости α , равном 0.05, составило 5.991 для всех образцов.

Статистически значимой связи между генотипом и фенотипом устойчивости к болезни не обнаружено ($p > 0.05$) (табл. S10). Выявленная значимая связь признаков для маркера 4Н-924 при фрагментном анализе отсутствовала при использовании CAPS-маркера 4Н-924 RsaI.

На хромосоме 6Н полиморфизм по размерам продуктов рестрикции выявлен для маркера JHI-Hv50k-2016-391380, HindIII (6Н-380 HindIII) на восприимчивом сорте Tatum и устойчивых образцах к-18552, к-8877, к-14936, к-8829, к-5900 и к-30341. Значимая связь ($p < 0.05$) между генотипом и фенотипом устойчивости к *Ptt* у растений F₂ выявлена в комбинациях Tatum × к-18552, Tatum × к-8877, Tatum × к-8829 и Tatum × к-5900 (табл. 8, рис. S6–S8). Таким образом, образцы к-18552, к-8877, к-8829 и к-5900 имеют QTL устойчивости на хромосоме 6Н в позиции 52.2 сМ.

Результаты KASP-генотипирования

В трех комбинациях скрещиваний устойчивые родители к-8829, к-14936, к-8877 и восприимчивый сорт Tatum были полиморфны по SNP-гаплотипам MM на хромосоме 4Н. В гибридных комбинациях с участием образца к-8829 только для маркера 4Н-471 диагностическая эффективность была более 0.5 (0.6), для остальных маркеров этот показатель был <0.5. В комбинации Tatum × к-8877 диагностическая эффективность маркеров 4Н-471, 4Н-935 и 4Н-347 составляла 0.71–0.73 (табл. S11).

Для KASP-маркера JHI-Hv50k-2016-165152 на хромосоме 3Н аллельный полиморфизм выявлен у сорта Tatum

(CC) и образца к-14936 (GG). В расщепляющейся популяции от их скрещивания не обнаружено соответствия устойчивости растений и их гаплотипов (см. табл. S11).

QTL на хромосоме 6Н, который выявляет маркер 6Н380 HindIII, у четырех образцов ячменя детерминирует их высокую устойчивость к *Ptt* и маскирует наличие других QTL (табл. S12–S14). Поэтому признак устойчивости не коррелирует с остальными изученными молекулярными маркерами. Другое дело – отсутствие/присутствие MM у восприимчивых растений определенной гибридной комбинации. Например, в классе восприимчивых растений F₂ в комбинации Tatum × к-8877 гомозиготы восприимчивого родителя для маркера 4Н-924 RsaI составляли 100 %, маркера 4Н-684 NruI – шесть растений из десяти были гомозиготными и два гетерозиготными по восприимчивости. Такие же результаты получены и для KASP-маркеров: по всем четырем маркерам из десяти восприимчивых растений шесть оказались гомозиготными по аллелю восприимчивого родителя и три гетерозиготными. В этой комбинации скрещивания четыре маркера на хромосоме 4Н имели диагностическую эффективность более 0.7 (см. табл. S12).

В комбинации к-8829 × Tatum преобладали восприимчивые растения. Расщепление по фенотипу устойчивости составило 4 (У):7(УВ):54(В), поэтому в анализ были включены только эти четыре устойчивых растения и десять восприимчивых. По CAPS-маркерам 6Н380HindIII и 4Н-684NruI, а также KASP-маркеру 4Н-471 все гетерозиготные растения ассоциировались с восприимчивостью,

что предполагает рецессивный характер наследования. По маркеру 4Н-924RsaI все восприимчивые растения имели генотип восприимчивого родителя (см. табл. S13).

В комбинации к-5900 × Tatum кроме доказанной значимой корреляции CAPS-маркера 6Н380 HindIII и маркера 4Н-886 (F × Rin1) при фрагментном анализе нет очевидного соответствия наличия/отсутствия маркеров 6Н-178 и 3Н-56 в группе восприимчивых растений (см. табл. S14).

Обсуждение

В настоящее время с использованием технологии GWAS и картирования в дигиплоидных популяциях идентифицировано 103 локуса, ассоциированных с ювенильной и взрослой устойчивостью к *Ptt* и большое число MM (Steffenson et al., 1996; Richter et al., 1998; Friesen et al., 2006; Manninen et al., 2006; Yun et al., 2006; Grewal et al., 2008, 2012; Cakir et al., 2011; Liu et al., 2011; Berger et al., 2013; König et al., 2013, 2014; O'Boyle et al., 2014; Afanasenko et al., 2015, 2022; Wang et al., 2015; Koladia et al., 2017; Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Martin et al., 2018; Dinglasan et al., 2019; Novakazi et al., 2019; Rozanova et al., 2019; Rehman et al., 2025). Однако имеются только единичные публикации, в которых представлены результаты валидации выявленных в GWAS маркеров QTL устойчивости к *Ptt* в другой генетической среде (Grewal et al., 2010; Afanasenko et al., 2022).

Для селекции ячменя на устойчивость к *Ptt* необходимы эффективные маркеры QTL, контролирующих как качественную, так и количественную устойчивость. Для валидации выявленных в GWAS (Richards et al., 2017; Amezrou et al., 2018; Novakazi et al., 2019) SNP-маркеров локусов устойчивости к *Ptt* на хромосомах 3Н, 4Н и 6Н были выбраны образцы ячменя, SNP-гаплотипы которых ассоциировались с несколькими локусами устойчивости к *Ptt* (см. табл. 1). Эти образцы отличались устойчивостью к широкому спектру патотипов *Ptt* в ювенильной фазе (см. табл. 2) и на провокационном фоне (поздний посев) в фазе взрослых растений в поле (неопубликованные данные).

Анализ расщепления по ювенильной устойчивости в F₂ от скрещивания этих образцов с восприимчивым сортом Tatum свидетельствовал о сложном наследовании признака, что подтверждало результаты GWAS. Особенностью оценки устойчивости в расщепляющихся популяциях к *Ptt*, также, как и к другим гемибиотрофным патогенам, является наличие группы растений с промежуточными реакциями (баллы 5.0–5.9). При наличии нескольких QTL у родительских компонентов скрещивания промежуточные реакции растений обусловлены наличием рекомбинантов с различным числом генетических детерминант устойчивости и различными генными взаимодействиями.

На хромосоме 4Н известно несколько локусов устойчивости к *Ptt* в интервалах: 1.13 cM (Grewal et al., 2008), 3.31 cM (Afanasenko et al., 2015; Wonneberger et al., 2017), 47.27–52.69 cM (Richards et al., 2017; Novakazi et al., 2019), 64.3 cM (Steffenson et al., 1996), 77.0 cM (Martin et al., 2018), 97.66 cM (Amézrou et al., 2018), 113.1 cM (Martin et al., 2018), 121–123 cM (König et al., 2014), 150–175 cM (Friesen et al., 2006).

В нашей работе изучены маркеры локуса, находящегося на хромосоме 4Н в интервале 50.0–50.4 cM, выявленного нами ранее в результате GWAS (Novakazi et al., 2019), а также маркеры локусов, определенных другими исследователями в интервале 52.0–52.2 cM (Richards et al., 2017), 97.00–97.20 cM (Amézrou et al., 2018) и в позиции 2.0 cM (Wonneberger et al., 2017). Выбор MM для изучения ко-сегрегации в расщепляющихся популяциях был основан на корреляции определенных SNP-гаплотипов выявленных в GWAS маркеров с фенотипом устойчивости. Так, на хромосоме 4Н выявлено четыре «пиковых» маркера, ассоциированных с устойчивостью к изоляту № 13 *Ptt* у 98 образцов ячменя; средний балл поражения 3.54 (табл. 9). SNP-гаплотипы CCAT этих четырех маркеров были ассоциированы с устойчивостью, тогда как SNP-гаплотипы этих же маркеров GTGC были ассоциированы с восприимчивостью (средний балл поражения 5.45) у 347 образцов ячменя. (Данные любезно предоставлены F. Novakazi.) Однако среди 98 образцов – 16 с гаплотипом CCAT были восприимчивы к патогену, а среди 347 образцов 147 отличались устойчивостью, хотя и имели гаплотип GTGC. Эти данные свидетельствуют, что, несмотря на ассоциацию определенных гаплотипов SNP-маркеров с устойчивостью, возможны случайные комбинации тех же SNP-гаплотипов у восприимчивых образцов и наоборот, что предполагает возможность ложной предпосылки о наличии у определенных образцов локусов, ассоциированных с устойчивостью, выявляемых в GWAS.

Для большинства изученных маркеров локусов устойчивости на хромосомах 3Н, 4Н и 6Н не выявлено полиморфизма по MM у родительских компонентов скрещивания (устойчивый образец × восприимчивый сорт Tatum).

Из 10 маркеров и 28 различных комбинаций праймеров этих маркеров на хромосоме 4Н только три оказались полиморфными при фрагментном анализе ПЦР, два при использовании их как CAPS-маркеров, и один KASP-маркер был полиморфен на родительских компонентах скрещивания только в одной комбинации. Достоверная связь признака устойчивости растений F₂ и маркера 4Н-924 выявлена в комбинации скрещивания Tatum × к-8877, а также маркера 4Н-886 (F × Rin1) в комбинации Tatum × к-5900. Полученные данные свидетельствуют о возможности ис-

Таблица 9. Средний балл поражения изолятом *P. teres f. teres* № 13 образцов ячменя с определенными SNP-гаплотипами четырех маркеров на хромосоме 4Н

JHI-Hv50k-2016-237471, 50.0 cM	JHI-Hv50k-2016-237684, 50.2 cM	JHI-Hv50k-2016-237839, 50.3 cM	JHI-Hv50k-2016-241935, 50.4 cM	Число образцов	Средний балл поражения
C	C	A	C	4	3.66
C	C	A	T	98	3.54
G	T	G	C	347	5.45

пользования этих маркеров в селекции, если в качестве доноров устойчивости к *Ptt* будут привлечены образцы к-8877 и к-5900.

В исследованиях, проведенных ранее, определение эффективности SNP-маркеров локуса устойчивости на хромосоме 3Н в интервале 46.29–54.3 сМ путем KASP-генотипирования позволило выявить пять маркеров, которые в дигиплоидной популяции и в двух расщепляющихся популяциях были эффективны на 100–80 % и ассоциировались с устойчивостью у сортов CLS, Morex, Fox и образца к-21578 (Afanasenko et al., 2022). Показано, что в локусе устойчивости на хромосоме 3Н имеется, по крайней мере, два QTL, контролирующих устойчивость к *Ptt* в интервале 46.00–48.44 и 51.27–54.80 сМ (Afanasenko et al., 2022). В нашем исследовании для изучения расщепляющихся популяций ячменя были использованы те же маркеры, находящиеся в интервале 45.82–47.2 сМ (3Н-1) и 52.46–54.53 сМ (3Н-2) (см. табл. 4). Из семи изученных пар праймеров маркеров на хромосоме 3Н только один маркер JHI-Hv50k-2016-166356 (3Н-56) выявлял полиморфизм пяти устойчивых образцов с сортом Tatum, но только в одной комбинации скрещивания Tatum × к-8829 выявлена значимая связь между маркером и устойчивостью растений. Не обнаружена корреляция этих же маркеров с фенотипом устойчивости при использовании KASP-генотипирования.

Устойчивость изучаемых образцов была ассоциирована также с несколькими локусами на хромосоме 6Н. Ранее с использованием дигиплоидных картирующих популяций на хромосоме 6Н в интервале 52.00–55.03 сМ у образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 был определен большой ген *Rpt5*, детерминирующий высокую качественную устойчивость к *Ptt* (Manninen et al., 2006; Потоккина и др., 2010; Koladia et al., 2017). В результате GWAS (Novakazi et al., 2019) в этом интервале также были выявлены локусы устойчивости, маркеры которых были объединены в четыре группы в зависимости от их расположения на генетической и физической картах ячменя (см. табл. 4). Ранее с использованием в качестве тестерных генотипов образцов ячменя CI9819, CI5791 и к-23874 нами была показана эффективность двух маркеров локусов устойчивости на хромосоме 6Н, которые были использованы в данном исследовании: JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII (6Н-380) в позиции 52.20 (6Н-2) и WORA2_12_31178 (6Н-178) в позиции 55.03 сМ (6Н-3) (неопубликованные данные).

Значимая связь ($p < 0.05$) маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII (6Н-380) и фенотипа устойчивости к *Ptt* у растений F_2 выявлена в комбинациях от скрещивания восприимчивого сорта Tatum с образцами к-5900 (Туркменистан), к-8829 (Италия), к-8877 (Испания) и к-18552 (Австралия). Эти данные свидетельствуют о возможности использования этих образцов в качестве доноров устойчивости и CAPS-маркера JHI-Hv50k-2016-391380 HindIII в маркер-ориентированной селекции (MAS).

Известно, что QTLs на хромосоме 6Н в изучаемом локусе контролируют высокую устойчивость у генотипов ячменя (Afanasenko et al., 1998; Manninen et al., 2006; Koladia et al., 2017). Наличие высоко значимой связи фенотипа устойчивости растений F_2 в четырех комбина-

циях скрещиваний с участием образцов к-5900, к-8829, к-8877 и к-18552 SNP-гаплотипа маркера 6Н-380 HindIII маскирует наличие других QTL. Однако в классе восприимчивых растений в определенной комбинации скрещивания маркеры должны соответствовать генотипу восприимчивого родителя. Например, KASP-маркеры 4Н-471, 4Н-347 и 4Н-935 и CAPS-маркер 4Н-924 RsaI в комбинации с участием образца к-8877 могут быть эффективны для выбраковки восприимчивых растений, в то время как при использовании всей выборки растений достоверной корреляции фенотипов устойчивости и генотипов этих маркеров не выявлено.

Заключение

Таким образом, отсутствие/присутствие продуктов амплификации полиморфного на родительских компонентах скрещивания маркера у устойчивых растений F_2 при полигенном наследовании не может быть доказательством, что нет корреляции маркера и признака устойчивости, так как наличие большого (major) гена устойчивости маскирует проявление других QTL.

Выявлены новые доноры устойчивости к *Ptt*: образцы к-5900 (Туркменистан), к-8829 (Италия), к-8877 (Испания) и к-18552 (Австралия), у которых QTL на хромосоме 6Н находится в позиции 52.2 сМ, 125903650 п. н. У образцов к-8877 и к-5900 также имеется QTL на хромосоме 4Н в интервале 50.00–50.99 сМ, 57098155–63065507 п. н., а у образца к-8829 QTL на хромосоме 3Н в позиции 47.2 сМ, 119627830 п. н. Доноры устойчивости и валидированные ММ с доказанной эффективностью могут быть использованы в MAS для создания устойчивых к возбудителю сетчатой пятнистости сортов ячменя.

Список литературы / References

- Лашина Н.М., Мироненко Н.В., Зубкович А.А., Афанасенко О.С. Ювенильная устойчивость сортов и образцов ячменя к net-, spot- и гибридной (net × spot) формам *Pyrenophora teres*. *Микология и фитопатология*. 2023;57(1):48-59. doi 10.31857/S0026364823010099
- [Lashina N.M., Mironenko N.V., Zubkovich A.A., Afanasenko O.S. Juvenile resistance of barley varieties and samples to net-, spot- and hybrid (net × spot) forms of *Pyrenophora teres*. *Mycol Phytopathol*. 2023;57(1):48-59. doi 10.31857/S0026364823010099 (in Russian)]
- Потокина Е.К., Хедлэй П., Афанасенко О.С., Лашина Н.М., Анисимова А.В., Козьяков А.В., Ялли М., Маннинен О. Картирование QTL (Quantitative Trait Loci), детерминирующих устойчивость к сетчатой пятнистости ячменя. В: Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб., 2010;229-236
- [Potokina E.K., Hedley P., Afanasenko O.S., Lashina N.M., Anisimova A.V., Kozyakov A.V., Yalli M., Manninen O. Mapping of QTL (Quantitative Trait Loci) determining resistance to net blotch of barley. In: Technologies for creating and using varieties and hybrids with group and complex resistance to pests in plant protection. St. Petersburg, 2010;229-236 (in Russian)]
- Afanasenko O., Jalli M., Pinnschmidt H., Filatova O., Platz G. Development of an international standard set of barley differential genotypes for *Pyrenophora teres* f. *teres*. *Plant Pathol*. 2009;58(4):665-676. doi 10.1111/j.1365-3059.2009.02062.x
- Afanasenko O.S., Koziakov A.V., Hedley P.E., Lashina N.M., Anisimova A.V., Manninen O., Jalli M., Potokina E.K. Mapping of

- the loci controlling the resistance to *Pyrenophora teres f. teres* and *Cochliobolus sativus* in two double haploid barley populations. *Russ J Genet Appl Res.* 2015;5(3):242-253. doi 10.1134/S2079059715030028
- Afanasenko O., Rozanova I., Gofman A., Lashina N., Novakazi F., Mironenko N., Baranova O., Zubkovich A. Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3H for marker-assisted selection. *Agriculture.* 2022;12(4):439. doi 10.3390/agriculture12040439
- Amezrou R., Verma R.P.S., Chao S., Brueggeman R.S., Belgadi L., Arbaoui M., Rehman S., Gyawali S. Genome-wide association studies of net form of net blotch resistance at seedling and adult plant stages in spring barley collection. *Mol Breed.* 2018;38:58. doi 10.1007/s11032-018-0813-2
- Cakir M., Gupta S., Li C., Hayden M., Mather D.E., Ablett G.A., Platz G.J., Broughton S., Chalmers K.J., Loughman R., Jones M.G.K., Lance R.C.M. Genetic mapping and QTL analysis of disease resistance traits in the barley population Baudin×AC Metcalfe. *Crop Pasture Sci.* 2011;62(2):152-161. doi 10.1071/cp10154
- Clare S.J., Çelik Oğuz A., Effertz K., Sharma Poudel R., See D., Karakaya A., Brueggeman R.S. Genome-wide association mapping of *Pyrenophora teres f. maculata* and *Pyrenophora teres f. teres* resistance loci utilizing natural Turkish wild and landrace barley populations. *G3.* 2021;11(11):jkab269. doi 10.1093/g3journal/jkab269
- Dinglasan E., Hickey L., Ziems L., Fowler R., Anisimova A., Baranova O., Lashina N., Afanasenko O. Genetic characterization of resistance to *Pyrenophora teres f. teres* in the International barley differential Canadian lake Shore. *Front Plant Sci.* 2019;10:326. doi 10.3389/fpls.2019.00326
- Friesen T.L., Faris J.D., Lai Z., Steffenson B.J. Identification and chromosomal location of major genes for resistance to *Pyrenophora teres* in a doubled-haploid barley population. *Genome.* 2006;49(7):855-859. doi 10.1139/g06-024
- Grewal T.S., Rosnagel B.G., Pozniak C.J., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance. *Theor Appl Genet.* 2008;116(4):529-539. doi 10.1007/s00122-007-0688-9
- Grewal T.S., Rosnagel B.G., Scoles G.J. Mapping quantitative trait loci associated with spot blotch and net blotch resistance in a doubled-haploid barley population. *Mol Breed.* 2012;30(1):267-279. doi 10.1007/s11032-011-9616-4
- Gupta S., Li C.D., Loughman R., Cakir M., Platz G., Westcott S., Bradley J., Broughton S., Lance R. Quantitative trait loci and epistatic interactions in barley conferring resistance to net type net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) isolates. *Plant Breed.* 2010;129(4):362-368. doi 10.1111/j.1439-0523.2009.01716.x
- Jatayev S., Kurishbayev A., Zotova L., Khasanova G., Serikbay D., Zhubatkanov A., Botayeva M., Zhumalin A., Turbekova A., Soole K., Langridge P., Shavrukov Yu. Advantages of Amplifluor-like SNP markers over KASP in plant genotyping. *BMC Plant Biol.* 2017;17(2):254. doi 10.1186/s12870-017-1197-x
- Koladia V.M., Faris J.D., Richards J.K., Brueggeman R.S., Chao S., Friesen T.L. Genetic analysis of net-form net blotch resistance in barley lines Clho 5791 and Tifang against a global collection of *P. teres f. teres* isolates. *Theor Appl Genet.* 2017;130(1):163-173. doi 10.1007/s00122-016-2801-4
- König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. Development of an efficient method for assessing resistance to the net type of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in winter barley and mapping of quantitative trait loci for resistance. *Mol Breed.* 2013;32:641-650. doi 10.1007/s11032-013-9897-x
- König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. Mapping seedling resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) in barley using detached leaf assay. *Plant Breed.* 2014;133(3):356-365. doi 10.1111/pbr.12147
- Liu Z., Ellwood S.R., Oliver R.P., Friesen T.L. *Pyrenophora teres*: profile of an increasingly damaging barley pathogen. *Mol Plant Pathol.* 2011;12(1):1-19. doi 10.1111/j.1364-3703.2010.00649.x
- Manninen O.M., Jalli M., Kalendar R., Schulman A., Afanasenko O., Robinson J. Mapping of major spot-type and net-type net-blotch resistance genes in the Ethiopian barley line CI 9819. *Genome.* 2006;49(12):1564-1571. doi 10.1139/g06-119
- Martin A., Platz G.J., de Klerk D., Fowler R.A., Smit F., Potgieter F.G., Prins R. Identification and mapping of net form of net blotch resistance in South African barley. *Mol Breed.* 2018;38(5):53. doi 10.1007/s11032-018-0814-1
- Mascher M., Wicker T., Jenkins J., Plott C., Lux T., Koh C.S., Ens J., ... Šimková H., Moscou M.J., Grimwood J., Schmutz J., Stein N. Long-read sequence assembly: A technical evaluation in barley. *Plant Cell.* 2021;33(6):1888-1906. doi 10.1093/plcell/koab077
- Novakazi F., Afanasenko O., Anisimova A., Platz G.J., Snowdon R., Kovaleva O., Zubkovich A., Ordon F. Genetic analysis of a worldwide barley collection for resistance to net form of net blotch disease (*Pyrenophora teres f. teres*). *Theor Appl Genet.* 2019;132(9):2633-2650. doi 10.1007/s00122-019-03378-1
- O'Boyle P.D., Brooks W.S., Barnett M.D., Berger G.L., Steffenson B.J., Stromberg E.L., Maroof M.A.S., Liu S.Y., Griffey C.A. Mapping net blotch resistance in 'Nomini' and Clho 2291 barley. *Crop Sci.* 2014;54(6):2596-2602. doi 10.2135/cropsci2013.08.0514
- Pandis N. The chi-square test. *Am J Orthodontics Dentofacial Orthopaedics.* 2016;150(5):898-899. doi 10.1016/j.ajodo.2016.08.009
- Rehman S., Al-Jaboobi M., Verma R.P.S., Sanchez-Garcia M., Visioni A. Genome-wide association mapping of net form net blotch resistance in barley at seedling and adult plant stages. *Front Agron.* 2025;7:1525588. doi 10.3389/fagro.2025.1525588
- Richards J.K., Friesen T.L., Brueggeman R.S. Association mapping utilizing diverse barley lines reveals net form net blotch seedling resistance/susceptibility loci. *Theor Appl Genet.* 2017;130(5):915-927. doi 10.1007/s00122-017-2860-1
- Richter K., Schöndelmaier J., Jung C. Mapping of quantitative trait loci affecting Drechslera teres resistance in barley with molecular markers. *Theor Appl Genet.* 1998;97:1225-34. doi 10.1007/s00122-0051014
- Rozanova I.V., Lashina N.M., Mustafin Z.S., Gorobets S.A., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres f. teres*. *BMC Genomics.* 2019;20:292. doi 10.1186/s12864-019-5623-3
- Steffenson B.J., Hayes P.M., Kleinhofs A. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres f. teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley. *Theor Appl Genet.* 1996;92:552-558. doi 10.1007/bf00224557
- Tekauz A. A numerical scale to classify reactions of barley to *Pyrenophora teres*. *Can J Plant Pathol.* 1985;7(2):181-183. doi 10.1080/07060668509501499
- Wonneberger R., Ficke A., Lillemo M. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch in a collection of Nordic barley germplasm. *Theor Appl Genet.* 2017;130:2025-2043. doi 10.1007/s00122-017-2940-2
- Yun S.J., Gyenis L., Bossolini E., Hayes P.M., Matus I., Smith K.P., Steffenson B.J., Tuberosa R., Muehlbauer G.J. Validation of quantitative trait loci for multiple disease resistance in barley using advanced backcross lines developed with a wild barley. *Crop Sci.* 2006;46(3):1179-1186. doi 10.2135/cropsci2005.08-0293

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 08.08.2025. После доработки 18.09.2025. Принята к публикации 18.09.2025.