

УДК 632.938+[633.11:632.4]

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕНОВ ВОЗРАСТНОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПШЕНИЦЫ К БУРОЙ РЖАВЧИНЕ *Lr22b*, *Lr34*, *Lr37* В ЗАПАДНОЙ СИБИРИ И ЦИТОФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ ОСНОВА ИХ ДЕЙСТВИЯ

© 2012 г. Л.Я. Плотникова, Т.Ю. Штубей

Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, Омск, Россия,
e-mail lplotnikova@rambler.ru

Поступила в редакцию 18 ноября 2011 г. Принята к публикации 16 декабря 2011 г.

Эффективность генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине изучали на юге Западной Сибири с использованием сорта Тэтчер (Tc), несущего ген *Lr22b*, и его почти изогенных линий *TcLr34* и *TcLr37*. Ген *Lr22b* был неэффективен, *Lr34* снижал скорость развития болезни при среднесуточной температуре ниже 16 °С, но был мало эффективен при температуре выше 20 °С. Ген *Lr37* обеспечивал высокую защиту от болезни независимо от внешних условий. На стадии колошения линии *TcLr34* и *TcL37* проявляли сходные компоненты частичной устойчивости: уменьшение количества и размеров пустул, подавление размножения гриба. Цитологические исследования показали, что на обеих линиях было частично подавлено образование структур *Puccinia triticina* на поверхности и в тканях (аппрессориев и гаусториев), но реакция сверхчувствительности (СВЧ) не проявлялась. Установлены механизмы устойчивости в форме окислительного взрыва при контакте аппрессориев с устьицами и каллозно-лигниновых отложений. Цвет автофлюоресценции лигнина отличался от свечения, характерного для взаимодействий, связанных с реакцией СВЧ. Гены *Lr34* и *Lr37* оказывали плейотропное действие на патогенез.

Ключевые слова: мягкая пшеница, бурая ржавчина, гены возрастной устойчивости, цитология, окислительный взрыв, каллоза, лигнин.

Введение

В Международном селекционном центре CIMMYT (Мексика) была разработана модель сортов с длительной устойчивостью к ржавчинным болезням. На этих сортах болезни развивались медленно, несмотря на восприимчивый тип реакции растений. Подобную устойчивость назвали частичной (**partial**) или **устойчивостью** по типу медленного развития (**slow rusting**). Parlevliet (1979) выделил компоненты частичной устойчивости, замедляющие развитие болезней и обеспечивающие длительную защиту сортов: уменьшение количества и размеров пятен болезни, увеличение латентного периода, подавление размножения патогенов. Сорта пшеницы, созданные в CIMMYT, **сохраняли устойчивость** к бурой ржавчине в различных регионах мира более 30 лет. Генетической основой сортов

служили гены возрастной устойчивости *Lr13* и *Lr34*, дополненные 2–3 генами с аддитивным эффектом (Singh *et al.*, 2003). Действие ряда генов возрастной устойчивости модифицируется условиями среды (Rubiales, Niks, 1995). В настоящее время сложилась парадоксальная ситуация: эмпирически подтверждена высокая эффективность сортов с частичной устойчивостью, но нет полной информации о механизмах действия их генов.

Эффективность генов возрастной устойчивости *Lr22b*, *Lr34* и *Lr37* против западносибирской популяции возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. до настоящего времени не изучалась. На цитологическом уровне проявление генов *Lr22b* и *Lr34* исследовано на примере взаимодействия с одним изолятом *P. triticina* (Rubiales, Niks, 1995), а действие гена *Lr37* не анализировалось. В связи с этим

задачами работы были оценка эффективности генов возрастной устойчивости пшеницы к бурой ржавчине *Lr22b*, *Lr34* и *Lr37* в Западной Сибири и выявление цитофизиологических аспектов их действия.

Материалы и методы

Объектами исследований служили образцы яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L.: сорт Тэтчер (Тс) с геном возрастной устойчивости *Lr22b*, его почти изогенные линии *TcLr34* и *TcLr37* и восприимчивый сорт Саратовская 29 (контроль).

Развитие бурой ржавчины пшеницы в полевых условиях изучали на естественном инфекционном фоне на юге Западной Сибири (Омская область). В статье приведены данные о влиянии генов на развитие эпидемий 2005, 2006 и 2007 гг. Развитие болезни изучали с момента появления пустул (июль) до отмирания листьев (август). Тип реакции растений на заражение определяли по 5-балльной шкале: 0 – отсутствие симптомов болезни или мелкие некротические пятна; 1 – микроскопические пустулы, окруженные зоной некроза; 2 – мелкие пустулы, окруженные широкой зоной некроза; 3 – пустулы среднего размера, окруженные хлоротической тканью; 4 – крупные пустулы (Mains, Jackson, 1926). К устойчивым относят растения с типом реакции 0–2, к восприимчивым – 3–4 балла. Степень поражения оценивали в процентах по шкале Петерсона (Peterson *et al.*, 1948). Учеты проводили в динамике с интервалом 5 сут. Для каждого варианта опыта оценивали степень поражения 15 растений. Для построения кривых развития болезни использовали средние значения по вариантам.

Цитологические исследования проводили на растениях в фазе колошения, выращенных в почве при оптимальной для проявления генов температуре 15–18 °С. Флаговые листья срезали, укладывали в чашки Петри и заражали суспензией инокулюма моноспорового изолята 77 расы *P. triticina*, к которому растения были восприимчивы в стадии проростков (балл 4). Для поддержания жизнеспособности инфицированных листьев использовали 0,004 %-й раствор бензидазола (Михайлова, Квитко, 1970). Развитие инфекционных структур гриба на поверхности

и в тканях изучали с помощью модифицированного лактофенольного метода. Материал окрашивали 1 %-м красителем анилиновым синим в лактофеноле, затем дифференцировали окраску в насыщенном водном растворе хлоралгидрата (Плотникова, Мешкова, 2009). Структуры гриба окрашивались в синий цвет; неповрежденные клетки растений – в светло-голубой, погибшие в результате реакции сверхчувствительности (СВЧ) – в темно-синий. Для выявления окислительного взрыва через 12 ч после инокуляции проводили витальную окраску инфицированных листьев 0,1 %-м водным раствором нитросинего тетразолия. В присутствии супероксид-аниона O_2^- и дегидрогеназ образовывалось синее соединение, затем материал фиксировали в лактофеноле (Плотникова, Мешкова, 2009). Отложения каллозы на клеточных стенках выявляли с помощью окраски 1 %-м раствором кораллина в 4 %-м водном растворе Na_2CO_3 . Каллоза окрашивалась в красный цвет. Автофлюоресценцию фенолов изучали с помощью люминесцентного микроскопа после промывки кусочков листьев 0,07 М калий-фосфатным буфером (рН 6,24). При исследованиях использовали возбуждающий светофильтр 340–420 нм и запирающий фильтр 530–640 нм (Плотникова, Мешкова, 2009). Лигнин в проводящих пучках и в зонах инфекции на листьях устойчивых растений имел зеленое свечение.

Взаимодействие изучали на пяти фиксированных листьях каждого образца. На поверхности листьев в сумме по варианту изучали формирование инфекционных структур, образованных 80–100 спорами, в тканях – развитие 25 колоний. Размеры колоний и пустул гриба определяли с помощью окуляр-микрометра, площадь вычисляли по формуле площади эллипса. Исследования проводили с помощью микроскопов: светового МБИ-15 и люминесцентного Люам-5. Микрофотосъемку осуществляли цифровой фотокамерой Olympus SP-320 с разрешением 7 мегапикселей на дюйм.

Количество урединиоспор в пустулах определяли на листьях растений, выращенных в поле и лаборатории. Для этого на флаговых листьях подсчитывали количество пустул, споры стряхивали в пробирки, перемешивали с 0,5 мл водного раствора детергента Твин-80, подсчитывали число спор в суспензии с помощью

микроскопа и камеры Горяева, рассчитывали среднее количество спор в пустулах. Исследования проводили в 3 повторностях по 5 листьев в каждой. По всем данным рассчитывали средние показатели и ошибку средней.

Результаты

В лесостепной зоне Западной Сибири споры *P. triticina* погибают во время зимовки, поэтому развитие ржавчины на посевах пшеницы связано с заносом инфекции в июле–августе. В этот период растения проходят фазы развития от колошения до спелости. В 2005 и 2007 гг. сложились благоприятные условия для развития эпидемий, в 2006 г. интенсивность болезни была ниже. Среднесуточные значения температуры в Омской области в годы наблюдений существенно варьировали: в 2005 и 2007 гг. они были значительно выше (19–20 °С и 20–23 °С соответственно) по сравнению с 2006 г. (14–16 °С) (рис. 1, а). Сорт Саратовская 29 был

восприимчив к болезни (4 балла), степень его поражения в 2005 и 2007 гг. достигла 100 %, а в 2006 г. – 65 %. Сорт Тэтчер и изогенные линии *TcLr34* и *TcLr37* проявляли восприимчивый тип реакции 3–4 балла в период «колошение – восковая спелость». Кривые развития болезни на сортах Тэтчер и Саратовская 29 в 2005–2006 гг. были сходны. В 2007 г. отмечено небольшое замедление развития болезни на сорте Тэтчер, но к концу наблюдений поражение двух сортов не различалось (рис. 1, б–г).

Таким образом, ген *Lr22b* на юге Западной Сибири был неэффективен. Линия *TcLr34* в жаркие сезоны 2005 и 2007 гг. была поражена ржавчиной в средней степени (45–55 %), а при умеренных температурах в 2006 г. – в слабой (10 %). Это свидетельствует о зависимости действия гена *Lr34* от температуры и снижении его эффективности при высокой температуре. Линия *TcLr37* показывала высокий уровень устойчивости к болезни (поражение 10–20 %) независимо от условий.

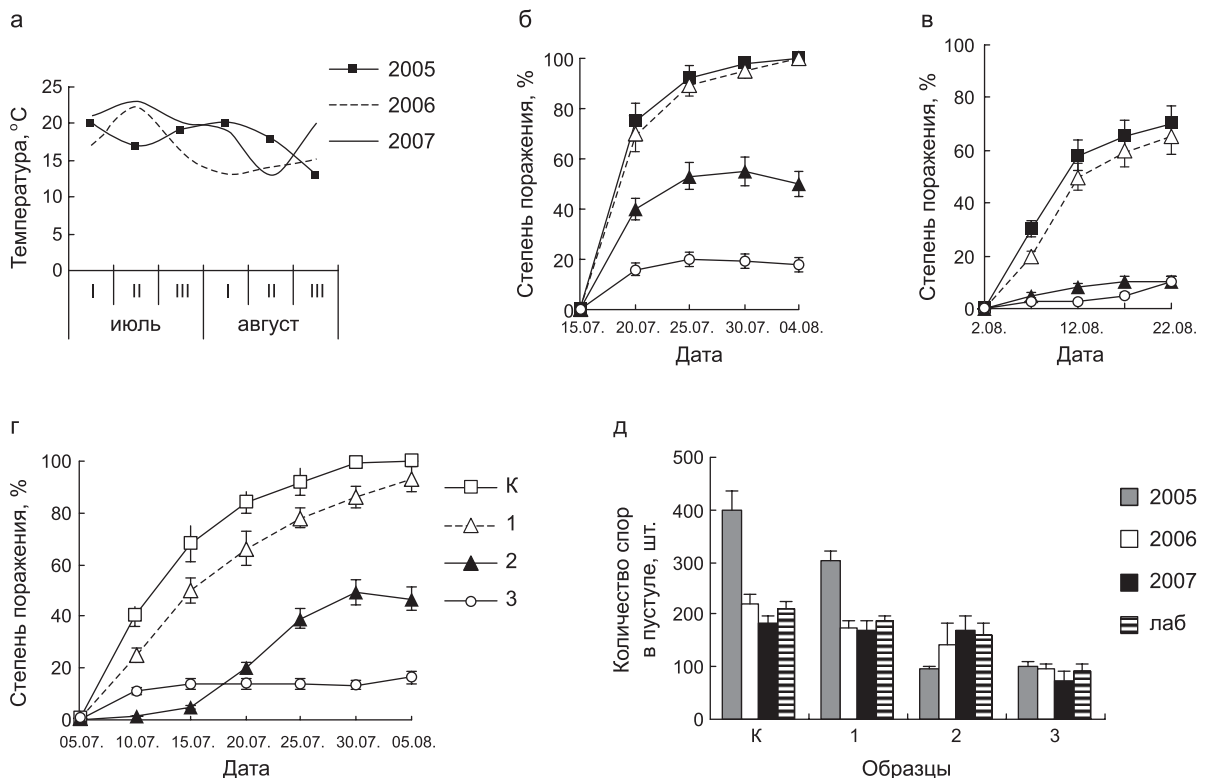


Рис. 1. Кривые развития бурой ржавчины и интенсивность образования спор в пустулах на сорте Тэтчер и его изогенных линиях с генами возрастной устойчивости в 2005–2007 гг.

а – среднесуточная температура воздуха; б–г – развитие болезни в 2005, 2006 и 2007 гг. соответственно; д – количество спор в пустулах на листьях образцов. К – Саратовская 29 (контроль), 1 – Тэтчер (*Lr22b*), 2 – *TcLr34*, 3 – *TcLr37*.

Скорость развития ржавчины в существенной степени зависит от репродуктивной способности патогена. Подсчет количества спор в пустулах на разных образцах показал, что на сорте Тэтчер в 2005 г. наблюдалось некоторое подавление спорогенеза, но в остальные годы и в лабораторных условиях этот факт не подтвердился. На линиях *TcLr34* и *TcLr37* спорогенез гриба был существенно подавлен по сравнению с восприимчивыми сортами (рис. 1, д).

Цитофизиологические особенности действия генов изучали на взрослых растениях, выращенных при оптимальной для проявления генов температуре 15–18 °С. Для выявления механизмов возрастной устойчивости был использован изолят, к которому образцы были восприимчивы в стадии проростков (4 балла). Установлено, что взрослые растения также показали восприимчивую реакцию (3–4 балла). Пустулы появились на всех образцах через 9 сут после инокуляции, различий по длине латентного периода не установлено.

На листьях восприимчивых сортов Саратовская 29 и Тэтчер споры прорастали, образовывали ростковые трубки, часть из них (10–12 %) прекращали развитие, остальные формировали аппрессории на устьицах и подустьичные везикулы (ПУВ) (рис. 2, а). ПУВ дали начало инфекционным гифам, которые образовывали на концах материнские клетки гаусториев (МКГ)

и гаустории для питания гриба в мезофилльных клетках. Все колонии сформировали пустулы. В тканях сорта Тэтчер отмечены некоторое угнетение формирования гаусториев через 3 сут после инокуляции и уменьшение размеров колоний на этапе спороношения, но достоверного снижения размеров пустул не установлено (рис. 2, б, в). В то же время на листьях линий *TcLr34* и *TcLr37* значительная доля инокулюма погибала (62–72 %). При этом на линии *TcLr34* гибель гриба на стадии ростковых трубок не отличалась от контроля, но 39 % инокулюма отмирало при контакте аппрессориев и ПУВ с замыкающими клетками устьиц, а 14 % – на стадии небольших (абортивных) колоний в ткани (рис. 2, а, 3, а). На поверхности листьев линии *TcLr37* формирование аппрессориев было интенсивно подавлено (в 3,5 раза по сравнению с контролем), 35 % инокулюма отмирало на стадиях аппрессориев и подустьичных везикул, но абортивных колоний было мало.

Средние размеры колоний и пустул в тканях устойчивых линий были существенно меньше, чем в контроле (в 4,0–5,3 и 10–13 раз соответственно) (рис. 2, в). В тканях линии *TcLr34* размеры колоний имели широкий размах варьирования – от крупных до маленьких абортивных (в 2–19 раз меньше контроля) (рис. 3, а, б). Характерным проявлением устойчивости было замедление формирования инфекционных

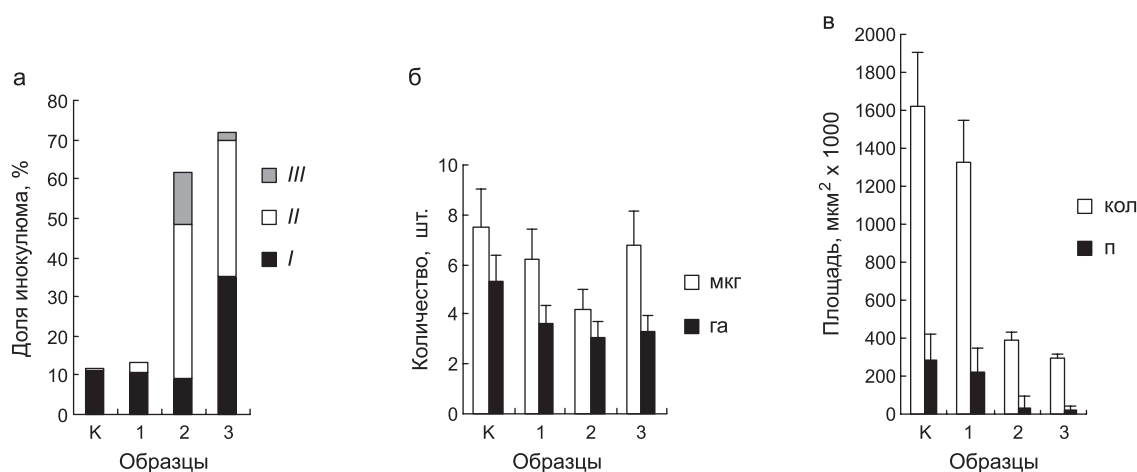


Рис. 2. Особенности взаимодействия *P. triticina* с сортом Тэтчер и изогенными линиями с генами возрастной устойчивости.

а – подавление развития на разных стадиях патогенеза: I – ростковые трубки без аппрессориев, II – аппрессории и подустьичные везикулы, погибшие на устьицах, III – абортивные колонии; б – инфекционные структуры в колониях гриба: МКГ – материнские клетки гаусториев; га – гаустории; в – площадь колоний и пустул: кол – колонии, п – пустулы. К – Саратовская 29 (контроль), 1 – Тэтчер (*Lr22b*), 2 – *TcLr34*, 3 – *TcLr37*.

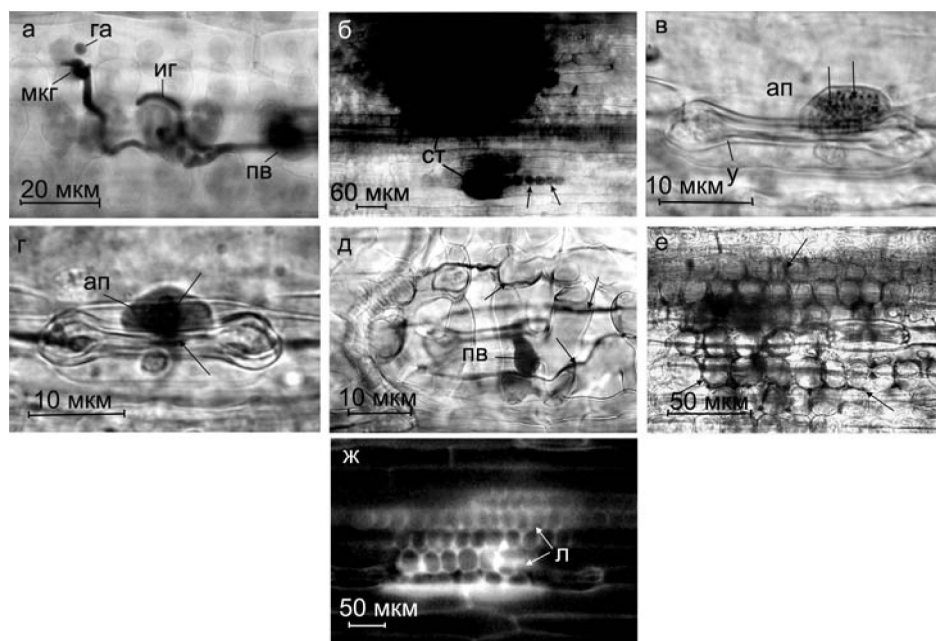


Рис. 3. Цитофизиологические особенности взаимодействия *P. triticina* с линиями пшеницы, несущими гены возрастной устойчивости.

а – abortивная колония с двумя гаусториями, 3 сут. после инокуляции, линия *TcLr34*; б – пустулы разных размеров с единичными отмершими клетками (стрелки), линия *TcLr34*, 9 сут. после инокуляции; в – аппрессорий на устьице восприимчивого сорта Тэтчер, в цитоплазме видны окрашенные митохондрии (стрелки); г – накопление супероксид-аниона в цитоплазме аппрессория (стрелки), линия *TcLr37*, 12 ч после инокуляции; д – некротическая подустыичная везикула и утолщения стенок клеток, окружающих подустыичную полость (стрелки), линия *TcLr34*; е – отложения каллозы на стенках клеток в зоне колонии, линия *TcLr37*, 5 сут. после инокуляции (стрелки); ж – отложения лигнина с зеленой автофлюоресценцией на стенках клеток в зоне abortивной колонии, линия *TcLr37*, 5 суток после инокуляции. Обозначения. ап – аппрессорий, га – гаусторий, иг – инфекционная гифа, л – лигнин, мкг – материнская клетка гаустория, пв – подустыичная везикула, у – устьице.

гиф и МКГ на первых этапах взаимодействия. Колонии с малым числом гаусториев (1–5 шт.) прекращали развитие, остальные развивались с различной интенсивностью. В тканях линии *TcLr37* рост всех колоний был сильно ограничен, при этом образовывалось достаточное количество МКГ, но было подавлено проникновение гаусториев в клетки.

В тканях устойчивых линий *TcLr34* и *TcLr37* в зонах колоний в течение 5 сут. не обнаруживались коллапсированные клетки растения с интенсивно окрашенной разрушенной цитоплазмой, т. е. реакция СВЧ не развивалась. Эти наблюдения были подтверждены данными люминесцентной микроскопии, с ее помощью не обнаружены клетки растений с желтой автофлюоресценцией, характерной для реакции СВЧ (Rubiales, Niks, 1995). Умеренное окрашивание цитоплазмы клеток, свидетельствующее

о постепенном их разрушении, проявлялось после гибели abortивных колоний, а также вокруг части пустул в момент спороношения. На стенках отмирающих клеток через 3–5 сут. после инокуляции появлялись отложения, их толщина увеличивалась к моменту спороношения. Эти реакции приводили к проявлению визуальных симптомов несовместимости в виде небольших хлоротических пятен на месте abortивных колоний в листьях линии *TcLr34* и узких зон хлороза вокруг пустул на листьях обеих линий.

Для выявления причин нарушения развития патогена были изучены генерация супероксид-аниона и состав отложений на клеточных стенках. При развитии гриба на восприимчивых растениях нитросиним тетразолием окрашивались только мелкие гранулярные структуры в цитоплазме аппрессориев и ПУВ (рис. 3, в).

Вероятно, краситель выявил активность де-гидрогеназ в митохондриях клеток гриба. При окрашивании инфицированных листьев краситель накапливался в цитоплазме значительной части аппрессориев и подустыичных везикул, контактировавших с замыкающими клетками устьиц, но не в клетках растений (на линиях *TcLr34* и *TcLr37* – в 32 и 35 % структур соответственно) (рис. 3, г). Это свидетельствует об экстраклеточной генерации O_2^- замыкающими клетками устьиц. Позже цитоплазма гриба интенсивно окрашивалась анилиновым синим, что характерно для отмерших клеток. Очевидно, окислительный взрыв был причиной отмирания значительной части инокулюма до внедрения в клетки растений. Через 1 сут. после инокуляции в местах окислительного взрыва на стенках замыкающих клеток устьиц и мезофилльных клеток, окружающих подустыичную полость, откладывалась каллоза, толщина ее отложений увеличивалась со временем (рис. 3, д). Через 3 сут. после инокуляции в таких отложениях появлялся лигнин с зеленой автофлюоресценцией, его свечение было аналогично свечению фенолов в проводящих пучках здоровой части листьев. В линии *TcLr34* каллозно-лигниновые отложения сначала появлялись в зоне отмерших колоний через 5 сут. после инокуляции, а вокруг активно развивающихся колоний – в момент спороношения (рис. 3, е, ж). В тканях линии *TcLr37* комплексные отложения формировались в зоне всех колоний и имели большую толщину, чем в линии *TcLr34*. На восприимчивых сортах Саратовская 29 и Тэтчер слабый синтез каллозы выявлен под пустулами гриба, лигнификация не установлена.

Обсуждение

Для стабильной защиты растений от бурой ржавчины необходимо использовать гены, определяющие разные механизмы устойчивости. В связи с этим интерес представляет группа генов возрастной устойчивости. Эффективность генов возрастной устойчивости в регионах мира различна. Так, сорта с геном *Lr34* сохраняют устойчивость в различных зонах в течение нескольких десятилетий, поэтому его действие считается неспецифическим (Singh *et al.*, 2003). Ген *Lr22b* сорта Тэтчер был эффективен в Ка-

наде и юго-западных регионах России (Kolmer, 1996; Коваленко и др., 2000). Его действие приводило к снижению степени поражения и удлинению латентного периода (Rubiales, Niks, 1995). Ген *Lr37* высокоэффективен во многих регионах, включая Европу, Австралию и европейскую часть России (Singh *et al.*, 2001; Ишкова и др., 2004).

Проведенные нами исследования показали, что сорт Тэтчер в Западной Сибири восприимчив к бурой ржавчине. В лабораторных экспериментах никаких компонентов устойчивости не выявлено, т. е. патоген полностью преодолел ген *Lr22b*. Нами подтверждены ранее выявленная зависимость действия гена *Lr34* от температуры и большая его эффективность при пониженных температурах (Rubiales, Niks, 1995). В то же время ген *Lr37* обеспечивал высокую устойчивость к ржавчине независимо от условий среды. Эти результаты необходимо учитывать при использовании генов в регионах с различными климатическими условиями.

Наши исследования были направлены на выявление механизмов возрастной устойчивости, при этом результаты взаимодействия гриба с линией *TcLr34* рассматривались как эталон частичной устойчивости. Существующее в настоящее время представление об особенностях действия гена *Lr34* основано на изучении взаимодействия с единственным изолятом из марокканской популяции *P. triticina* (Rubiales, Niks, 1995). В этих исследованиях линия *TcLr34* проявляла все четыре компонента устойчивости, сформулированные Парлевлитом, поэтому ген *Lr34* был назван «истинным геном частичной устойчивости». В тканях линии *TcLr34* не были выявлены реакция СВЧ и утолщения клеточных стенок, но было нарушено образование инфекционных гиф и гаусторий, что приводило к отмиранию 20 % колоний на ранних стадиях развития и замедлению роста остальных. В то же время при заражении тем же изолятом сорта Тэтчер и линий *TcLr12* и *TcLr13* развивалась реакция СВЧ.

Результаты наших исследований показали, что при заражении изолятом из западносибирской популяции гриба линия *TcLr34* проявила все компоненты частичной устойчивости, кроме удлинения латентного периода. Подтверждено, что образование гаусторий в тканях линии

TcLr34 частично подавляется без проявления реакции СВЧ. Однако в наших экспериментах сокращение степени поражения растений определялось, прежде всего, отмиранием значительной доли аппрессориев на устьицах, а не гибелью колоний в тканях. На поздних этапах патогенеза и вокруг абортивных колоний выявлены утолщения клеточных стенок. Сравнение полученных нами и Д. Рубиалесом и Р. Никсом результатов показывает различия во взаимодействии изолятов с линией *TcLr34*, а также проявление разных защитных механизмов, влияющих на отдельные компоненты частичной устойчивости.

Реакция СВЧ считается типичным проявлением распецифической устойчивости. Предполагается, что длительная неспецифическая устойчивость проявляется до внедрения гаусториев в клетки и не связана с реакцией СВЧ (прегаусториальная устойчивость) (Niks, 1983). Помимо *Lr34*, к группе генов возрастной устойчивости, действующих без реакции СВЧ, отнесены *Sr2*, проявивший длительную эффективность к стеблевой ржавчине, и новые гены, *Lr46* и *Lr67* (Niks, Rubiales, 2002; Spielmeier *et al.*, 2003; Hiebert *et al.*, 2010). Остальные гены возрастной устойчивости считаются распецифическими. «Генотип-специфическое» действие гена *Lr35* предполагается на основании визуальных признаков некроза (McIntosh, 2009). Расы, вирулентные к генам *Lr12*, *Lr13* и *Lr22b*, появились в Индии и Австралии (Kaur *et al.*, 2000; McIntosh, 2009).

Хотя ген *TcLr37* считается распецифическим, в наших экспериментах линия *TcLr37* демонстрировала те же компоненты частичной устойчивости, что и *TcLr34*, но они были выражены сильнее. Часть защитных механизмов у *TcLr34* и *TcLr37* были сходны (гибель аппрессориев на устьицах и подавление образования гаусториев) и проявлялись без реакции СВЧ. Помимо этого, на линии *TcLr37* наблюдалось сильное подавление формирования аппрессориев, что приводило к снижению степени поражения, а также формирование отложений на клеточных стенках, коррелирующее с замедлением роста колоний и подавлением спорогенеза. Эти механизмы значительно повышали устойчивость линии *TcLr37* по сравнению с *TcLr34* в лабораторных и полевых условиях.

В наших экспериментах показано, что на поверхности листьев линий *TcLr34* и *TcLr37* погибало более половины инокулюма. Ранее сходные проявления прегаусториальной устойчивости были обнаружены при инфицировании сортов пшеницы (*Little Joss*) и **ячменя (*Vada*)**, проявивших длительную частичную устойчивость к желтой, бурой и карликовой ржавчине соответственно (Cartwright, Russel, 1980; Niks, 1983). В некоторых сортах пшеницы (*Akabozu*, ВН1146) замедление роста колоний *P. triticina* сопровождалось образованием отложений на клеточных стенках, с которыми связывали неспособность грибов образовывать гаустории и раннюю абортацию колоний (Rubiales, Niks, 1995). Таким образом, на примере взаимодействия различных ржавчинных грибов с линиями и сортами с возрастной и частичной устойчивостью выявлен сходный набор механизмов защиты. Сочетания механизмов различались, что может быть связано с генетическими особенностями как сортов, так и патогенов.

Нами впервые была изучена роль окислительного взрыва в возрастной устойчивости. Ранее было показано, что иммунитет линии *TcLr19* обеспечивался гибелью всех аппрессориев на устьицах в результате окислительного взрыва (Плотникова, Мешкова, 2009). Однако на линиях *TcLr34* и *TcLr37* окислительный взрыв при контакте с аппрессориями зафиксирован только на 1/3 устьиц, т. е. проявлялся нестабильно. Окислительный взрыв считается первой активной реакцией растений, связанной с узнаванием патогенов, поэтому подавление формирования аппрессориев на предшествующей стадии может быть связано с пассивными механизмами устойчивости. В составе отложений на клеточных стенках растений нами выявлены каллоза и лигнин. Защитное действие каллозы связано с ограничением поступления питательных веществ в мицелий (Ohana *et al.*, 1993). Ранее была отмечена тесная связь между синтезом каллозы и окислительным взрывом (Плотникова, Мешкова, 2009). Вероятно, в зонах синтеза каллозы накапливались и активные формы кислорода. Лигнификация клеточных стенок растений проявлялась на более поздних этапах патогенеза. Известно, что лигнин на стенках клеток, погибших в результате реакции СВЧ, имеет характерное желтое свечение

(Плотникова, Мешкова, 2009). В то же время свечение лигнинов в зоне колоний на линиях *TcLr34* и *TcLr37* было сходно с автофлюоресценцией фенолов в проводящих пучках листьев. Возможно, в растениях с генами возрастной и ювенильной устойчивости активируются разные ветви фенольного метаболизма.

Типичным нарушением взаимодействия грибов с растениями с возрастной устойчивостью было подавление развития инфекционных структур на поверхности и в тканях до проявления активных защитных механизмов. Известно, что для полноценного развития инфекционных структур необходимо получение от растений комплекса положительных стимулов (физических и химических) (Niks, Rubiales, 2002). Возможно, растения имеют особенности, нарушающие стимуляцию образования структур гриба. Угнетение формирования гаусториев приводит к замедлению или гибели колоний в результате голодания (Voegel *et al.*, 2001). Потенциальным неспецифическим механизмом защиты может также служить системная приобретенная устойчивость (**systemic acquired resistance – SAR**). Известно, что окислительный взрыв индуцирует развитие SAR, при этом синтезируются фенольные соединения, защитные белки, укрепляются клеточные стенки (Тютерев, 2002). В нашей модели индукторами SAR могли служить окислительный взрыв на устьицах и элиситоры из отмирающих клеток колоний гриба.

Таким образом, наши исследования продемонстрировали, что в Западной Сибири ген возрастной устойчивости *Lr22b* был преодолен патогеном, *Lr34* имел умеренную, а *Lr37* – высокую эффективность. Действие генов *Lr34* и *Lr37* проявлялось сходно на разных этапах патогенеза, не было связано с реакцией СВЧ и приводило к проявлению типичных компонентов частичной устойчивости. Выявлены новые защитные реакции растений: нестабильный окислительный взрыв на устьицах, формирование каллозно-лигниновых отложений на клеточных стенках и синтез фенолов, нетипичных для взаимодействий, связанных с реакцией СВЧ. Гены *Lr34* и *Lr37* определяли проявление набора механизмов устойчивости и плейотропное действие на патогенез.

Литература

- Ишкова Т.И., Гульятеева Е.И., Левитин М.М. Грибные болезни зерновых культур на Северо-Западе России // Защита и карантин растений. 2004. № 12. С. 15–18.
- Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И., Крятева Н.Н. Иммуногенетические методы создания болезнеустойчивых сортов зерновых культур. 1. Генетическая структура популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы // Агро XXI. 2000. № 4. С. 14–15.
- Михайлова Л.А., Квитко К.В. Лабораторные методы культивирования возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Rob. ex Desm. // Микология и фитопатология. 1970. Т. 4. Вып. 4. С. 269–273.
- Плотникова Л.Я., Мешкова Л.В. Эволюция цитофизиологических взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы при преодолении устойчивости, детерминированной геном *Lr19* // Микология и фитопатология. 2009. Т. 43. Вып. 4. С. 63–77.
- Тютерев С.Л. Научные основы индуцированной болезнеустойчивости растений. СПб: ООО «Инновационный центр защиты растений» ВИЗР, 2002. 328 с.
- Cartwright D.W., Russel G.E. Histological and biochemical nature of 'durable' resistance to yellow rust in wheat // Proc. of the 5th European and Mediterranean Cereal Rusts Conf., Ban and Rome. 1980. P. 23–26.
- Hiebert C., Spielmeier W., Thomas J. *et al.* Leaf rust resistance gene *Lr67*, a third adult plant slow-rusting gene conferring resistance to multiple pathogens of wheat // 8th Intern. Wheat Conf. 1–4 June 2010. St. Petersburg, Russia: Abstracts. St. Petersburg, 2010. P. 264.
- Kaur M., Saini R.G., Preet K. Adult plant leaf rust resistance from 111 wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars // Euphytica. 2000. V. 113. P. 235–243.
- Kolmer J.A. Genetics of resistance to wheat leaf rust // Annu. Rev. Phytopathol. 1996. V. 34. P. 435–455.
- Mains E.B., Jackson E.S. Physiological specialization in the leaf rust wheat *Puccinia triticina* Erikss. // Phytopathology. 1926. V. 16. No 1. P. 89–120.
- McIntosh R.A. History and status of wheat rusts // BGRI. 2009. Technical Workshop. Cd. Obregon, Sonora, Mexico, March 17–20, 2009. Full Papers and Abstracts. 2009. P. 1–16.
- Niks R.E. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost genotypes // Phytopathology. 1983. V. 73. P. 64–66.
- Niks R.E., Rubiales D. Potentially durable resistance mechanisms in plants to specialized fungal pathogens // Euphytica. 2002. V. 124. P. 201–216.
- Ohana P., Bemiman M., Delmer D.P. Stimulation of callose synthesis *in vivo* correlates with changes in intracellular distribution of the callose synthase activator P-furfuryl- β -glucoside // Plant Physiol. 1993. V. 101. P. 187–191.
- Parlevliet J.E. Components of resistance that reduce the rate of epidemic development // Annu. Rev. Phytopathol. 1979. V. 17. P. 203–222.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity of leaves and stem of cereals // Can. J. Res. 1948. Sec. C. V. 26. P. 496–500.
- Rubiales D., Niks R.E. Characterization of *Lr34*, a major gene

- conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust // *Plant Disease*. 1995. V. 79. P. 1208–1212.
- Singh R.P., Huerta-Espino J., Williams M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts of wheat // *Increasing Wheat Production in Central Asia through Science and International cooperation: Proc. 1st Central Asian Wheat Conf. Almaty, Kazakhstan, 10–13 June, 2003. Almaty, 2003. P. 127–132.*
- Singh D., Park R.F., McIntosh R.A. Postulation of leaf (brown) rust resistance genes in 70 wheat cultivars grown in United Kingdom // *Euphytica*. 2001. V. 120. P. 205–218.
- Spielmeier W., Sharp P.J., Lagudash E.S. Identification and validation of markers linked to broad-spectrum stem rust resistance gene *Sr2* in wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Crop Sci.* 2003. V. 43. P. 333–336.
- Voegel R.T., Struck C., Hahn M., Mendgen K. The role of haustoria in sugar supply during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 8133–8138.

EFFECTIVENESS OF THE WHEAT *Lr22b*, *Lr34*, AND *Lr37* GENES FOR ADULT PLANT RESISTANCE TO LEAF RUST IN WEST SIBERIA AND THE CYTOPHYSIOLOGICAL BASIS OF THEIR ACTION

L.Ya. Plotnikova, T.Yu. Shtubey

Omsk Stolypin Agrarian University, Omsk, Russia,
e-mail: lplotnikova@rambler.ru

Summary

The effect of genes for adult plant resistance to leaf rust has been explored in southern West Siberia by the examples of common wheat cv. Thatcher (Tc), carrying the *Lr22b* gene, and its near-isogenic lines *TcLr34* and *TcLr37*. *Lr22b* is inefficient, *Lr34* slows down the disease development at a mean daily temperature below 16 °C, but is poorly efficient at temperatures above 20 °C. *Lr37* confers high resistance under all conditions. At the heading stage, *TcLr34* and *TcLr37* show similar components of partial resistance to rust: reduction in the number and sizes of spots and sporogenesis suppression. Cytological examination has revealed partial suppression of the formation of *Puccinia triticina* infection signs (appressoria and haustorium) without hypersensitive reaction (HR). Additional defense mechanisms include an oxidative burst induced by contacts of appressoria with stomata and callose-lignine appositions on the wall. Autofluorescence of lignins in *TcLr34* and *TcLr37* lines differs from the glow typical of HR-accompanied combinations. The *Lr34* and *Lr37* genes exert a pleiotropic action on pathogenesis.

Key words: common wheat, leaf rust, adult resistance genes, cytology, oxidative burst, callose, lignin.