

# Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров

О.А. Баранова<sup>1</sup>, И.Ф. Лапочкина<sup>2</sup>, А.В. Анисимова<sup>1</sup>, Н.Р. Гайнуллин<sup>2</sup>, И.В. Иорданская<sup>2</sup>, И.Ю. Макарова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений», Санкт-Петербург, Пушкин, Россия

<sup>2</sup> Московский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Немчиновка», Московская область, Россия

В связи с угрозой проникновения на территорию Российской Федерации агрессивной расы возбудителя стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et Henn, Ug99 необходим поиск новых доноров устойчивости к этой опасной болезни. У 6 источников устойчивости к стеблевой ржавчине, в том числе к расе Ug99, имеющих в своей родословной генетический материал чужеродных видов (*Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *Secale cereale*), проведена идентификация 17 генов *Sr* с использованием молекулярных маркеров как к эффективным против расы Ug99 генам (*Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44* и *Sr47*), так и к не эффективным, но обеспечивающим устойчивость к местным популяциям возбудителя стеблевой ржавчины (*Sr9a*, *Sr15*, *Sr17*, *Sr19* и *Sr31*). На основании анализа молекулярных маркеров постулировано присутствие в изученных линиях от 2 до 7 известных генов *Sr*: в 113/00i-4 – *Sr2*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47* и *Sr15*; в 119/4-06rw – *Sr22*, *Sr32*, *Sr44*, *Sr9a*, *Sr17* и *Sr19*; в GT 96/90 – *Sr24*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr47*, *Sr15*, *Sr17* и *Sr31*; в 9/00w – *Sr22*, *Sr44*, *Sr32* и *Sr15*; в 141/97w – *Sr22* и *Sr44*. У сорта Донская полукарликовая идентифицированы эффективные к расе Ug99 гены *Sr32* и *Sr44*, а также неэффективные *Sr9a*, *Sr17* и *Sr19*. Изученные образцы могут быть использованы в качестве доноров генов устойчивости к стеблевой ржавчине в селекционных программах на иммунитет.

Ключевые слова: мягкая пшеница; стеблевая ржавчина; раса Ug99; гены *Sr*; молекулярные маркеры.

## Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers

O.A. Baranova<sup>1</sup>, I.F. Lapochkina<sup>2</sup>, A.V. Anisimova<sup>1</sup>, N.R. Gajnullin<sup>2</sup>, I.V. Iordanskaya<sup>2</sup>, I.Yu. Makarova<sup>2</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Institute for Plant Protection (FSBSI VIZR), Saint-Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>2</sup> Moscow Agricultural Research Institute «Nemchinovka», Moscow Oblast, Russia

The need for new donors of resistance to aggressive race Ug99 of *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Eriks. et Henn has arisen because the pest approaches the territory of Russian Federation. Identification of seventeen known *Sr* genes was performed with use of molecular markers in six sources of resistance to stem rust race Ug99. They included five common wheat lines and Donskaya Polukarlikovaya cv. The investigated accessions carried genetic material of alien species (*Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *Secale cereale*). We used molecular markers associated with effective genes to race Ug99: *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr32*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47*, and with genes that were ineffective but protected wheat cultivars against local pathogen populations: *Sr9a*, *Sr15*, *Sr17*, *Sr19* and *Sr31*. On the grounds of the analysis of molecular markers the presence of two to seven known *Sr* genes was postulated in analyzed wheat lines: *Sr2*, *Sr36*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr44*, *Sr47*, and *Sr15* in line 113/00i-4; *Sr22*, *Sr32*, *Sr44*, *Sr9a*, *Sr17* and *Sr19* in line 119/4-06rw; *Sr24*, *Sr36*, *Sr40*, *Sr47*, *Sr15*, *Sr17* and *Sr31* in line GT 96/90; *Sr22*, *Sr44*, *Sr32* and *Sr15* in line 9/00w; *Sr22* and *Sr44* in line 141/97w. Genes *Sr32* and *Sr44* effective against Ug99 and ineffective genes *Sr9a*, *Sr17* and *Sr19* were identified in Donskaya Polukarlikovaya cv. The accessions studied may be recommended as donors of resistance to race Ug99 in wheat breeding programs.

Key words: common wheat; stem rust, Ug99; *Sr* genes; molecular markers.

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Баранова О.А., Лапочкина И.Ф., Анисимова А.В., Гайнуллин Н.Р., Иорданская И.В., Макарова И.Ю. Идентификация генов *Sr* у новых источников устойчивости мягкой пшеницы к расе стеблевой ржавчины Ug99 с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(3):316-322. DOI 10.18699/VJ15.041

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Baranova O.A., Lapochkina I.F., Anisimova A.V., Gajnullin N.R., Iordanskaya I.V., Makarova I.Yu. Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(3):316-322. DOI 10.18699/VJ15.041

DOI 10.18699/VJ15.041

УДК 632.4:633.1

Поступила в редакцию 01.12.2014 г.

Принята к публикации 31.03.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: baranova\_oa@mail.ru; inna-lapochkina@yandex.ru

Стеблевая ржавчина (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erik. et Henn) распространена во многих регионах мира. При эпифитотийном развитии болезни потери урожая могут достигать 50–70 %. В период с 50-х до середины 90-х годов прошлого века ее вредоносность была значительно снижена благодаря эффективной генетической защите (Плахотник, 1969; Койшыбаев и др., 2008; Bernardo et al., 2013).

В 1999 г. в Уганде отмечено появление новой агрессивной расы, получившей название Ug99 (ТТКСК), которая поразила сорта пшеницы с геном *Sr31*, а позднее появились ее биотипы, поражающие сорта с генами *Sr24* (ТТКСТ) и *Sr36* (ТТТСК) (Jin et al., 2008, 2009). Потери урожая при эпифитотии расы стеблевой ржавчины Ug99 на восприимчивых сортах достигали 80 % и более (Jin et al., 2008). К настоящему времени раса Ug99 распространена в странах Ближнего Востока и мигрирует к среднеазиатским странам, возможен ее занос и в Российскую Федерацию через Урал и Западную Сибирь.

Известно более 50 генов устойчивости к стеблевой ржавчине, часть из них уже потеряли эффективность. По данным СИММИТ (СИММУТ), эффективность к расе Ug99 сохраняют гены *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp*, *Sr2*, *Sr13*, *Sr14*, *Sr22*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr32*, *Sr39*, *Sr47*, *Sr33*, *Sr45*, *Sr40*, *Sr24*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr27* и *1A.1R* (Singh et al., 2006). К большинству этих генов подобраны молекулярные маркеры (<http://maswheat.ucdavis.edu/Index.htm>), часть из которых используется в маркер-вспомогательной селекции (marker assisted selection – MAS).

Одним из методов создания исходного материала для селекции является отдаленная гибридизация пшеницы с дикорастущими и культурными видами злаков: *Thinopyrum intermedium*, *Th. bessarabicum*, *Th. junceum*, *Agropyron elongatum* (Xu et al., 2012; Zheng et al., 2012), *Secale cereale*, *Leymus ramosus*, *L. mollis* (Rahmatov et al., 2012). Ранее интрогрессивные озимые и яровые линии мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) были созданы в Московском НИИСХ «Немчиновка» с привлечением видов *Aegilops speltoides*, *Ae. triuncialis*, *T. kiharae*, *S. cereale* (Лапочкина, Волкова, 1994; Лапочкина, 2012). Образцы являются частью коллекции мягкой пшеницы «Арсенал», которая отличается широким полиморфизмом по устойчивости к грибным болезням (Лапочкина, 2000; Hsam et al., 2003; Лапочкина и др., 2008; Дженин и др., 2009). Из коллекции выделены доноры с идентифицированными генами устойчивости к бурой ржавчине (Lapochkina et al., 2003; Гайнуллин и др., 2007), а также источники устойчивости к желтой и стеблевой ржавчине. После оценки образцов мягкой пшеницы из коллекций ВИР и «Арсенала» на устойчивость к расе стеблевой ржавчины Ug99 на стадии проростков были выделены устойчивые образцы. Работа была проведена совместно с учеными Миннесотского университета, США (Анисимова и др., 2010). Однако до настоящего времени информация о том, какие гены *Sr* определяют устойчивость изученных линий к стеблевой ржавчине, отсутствует.

Цель настоящего исследования состояла в идентификации генов устойчивости к стеблевой ржавчине у образцов мягкой пшеницы, устойчивых к расе Ug99 (ТТКСК).

## Материалы и методы

Объектами исследования в настоящей работе служили 6 образцов мягкой пшеницы, устойчивых к расе стеблевой ржавчины Ug99 на стадии проростков. Тип реакции растений определяли по шкале Стекмана (Stakman et al., 1962). Происхождение образцов и их характеристика приведены в табл. 1.

Для проверки эффективности генов *Sr* к популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* Центрального района Нечерноземной зоны РФ была использована коллекция из 35 линий мягкой пшеницы, содержащих единичные известные гены *Sr* или их комбинации. Проверка проводилась на естественном инфекционном фоне в 2013 г. в Московской области. Степень поражения растений стеблевой ржавчиной оценивали по шкале Петерсона (Peterson et al., 1948). Стандартом восприимчивости служили сорт яровой пшеницы Черныява 13 и линия Хакасская, поражение которых составляло 40 и 70 % соответственно.

ДНК выделяли из пятидневных проростков растений пшеницы с использованием цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) по известному методу (Murray, Thompson, 1980). В работе использовали молекулярные маркеры к 17 генам *Sr*. Условия ПЦР приведены в оригинальных работах, но для каждого маркера проводили подбор наиболее оптимальных условий. Список маркеров приведен в приложении (см. Доп. материалы)<sup>1</sup>.

Разделение продуктов амплификации проводили в 2 %-м агарозном или 8 %-м полиакриламидном гелях, окрашенных бромистым этидием. В качестве маркеров молекулярных весов использовали GeneRuler™ 50bp DNA Ladder и GeneRuler™ 1kb DNA Ladder («Fementas»). Положительным контролем служили изогенные линии и сорта с известными генами *Sr*, негативным контролем – восприимчивый сорт Саратовская 29.

## Результаты и обсуждение

Оценка устойчивости коллекции линий яровой мягкой пшеницы с известными генами *Sr* к природной популяции возбудителя *P. graminis* f. sp. *tritici* в Московской области показала, что в 2013 г. эффективными генами оказались *Sr2*, *Sr9e*, *Sr13*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr28kt*, *Sr30*, *Sr31*, *Sr32*, *Sr36*, *Sr44*, *SrWld* и комбинации генов *Sr13+Sr17* и *Sr31+Sr38*. В условиях Западной Сибири высокоэффективными остаются гены *Sr31*, *Sr9e*, *Sr25*, *Sr27*, *Sr29*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr36*, *Sr38*, *SrWld*, а также комбинации генов *Sr7a*, *Sr12*, *Sr6* (Шаманин и др., 2012). Остается эффективным ген *Sr31* и в Северо-Кавказском регионе России (Синяк и др., 2013), хотя спектр эффективных генов для этого региона гораздо уже (Волкова и др., 2014). Эффективность гена *Sr31* указывает на то, что заноса расы стеблевой ржавчины Ug99 в эти регионы пока не произошло.

## Идентификация генов *Sr* с использованием молекулярных маркеров

Для идентификации гена *Sr2* (происходящего от *T. turgidum*) нами был использован SSR-маркер *Xgwm533*, тесно сцепленный с этим геном, широко применявшийся в работах других авторов и рекомендованный для MAS (Hayden

<sup>1</sup> Дополнительные материалы см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2015-06/appx4.pdf>

**Таблица 1.** Происхождение и характеристика образцов пшеницы, взятых в эксперимент

Образец (происхождение)	Характеристика
Донская полукарликовая (Русалка/Северодонская)	Озимый сорт мягкой пшеницы, короткостебельный (50–60 см), устойчив к популяциям бурой и стеблевой ржавчины в условиях Московской области, восприимчив к мучнистой росе. Устойчив к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0; 1)
GT 96/90 (Жировка/Мироновская полуинтенсивная)	Озимая селекционная линия (Болгария), устойчива к популяциям бурой и стеблевой ржавчины в условиях Московской области. Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0; 0)
9/00w [ <i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)]	Озимая дисомно-замещенная линия ( $2n = 42$ ) с парой хромосом от <i>Ae. speltoides</i> . Высоко устойчива к популяции бурой ржавчины в условиях Московской области. Наличие генов <i>Lr37</i> , <i>Lr46</i> . Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 0; 1)
141/97w [ <i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)]	Озимая дисомно-дополненная линия ( $2n = 44$ ), восприимчива к мучнистой росе, но высоко устойчива к бурой ржавчине на стадии проростков (тип реакции – 0). Устойчива к расе Ug99 на стадии проростков (тип реакции 1, 2)
113/00i-4 [ <i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. triuncialis</i> (5 kR)]	Яровая линия ( $2n = 42$ ). Имеет дисомное замещение и транслокацию от <i>Ae. triuncialis</i> . Устойчива к мучнистой росе; устойчива к бурой ржавчине на стадии проростков и взрослого растения. Устойчива к расе Ug99 стеблевой ржавчины на стадиях проростков (тип реакции 0; 1) и взрослого растения (тип реакции 0)
119/4-06rw [ <i>T. aestivum</i> (Родина)/ <i>Ae. speltoides</i> (10kR)/ <i>S. cereale</i> (0,75 kR)]	Озимая пшенично-эгилопсно-ржаная линия, высоко устойчива к бурой ржавчине и мучнистой росе. Устойчива к расе Ug99 стеблевой ржавчины на стадии проростков (тип реакции 2)

**Таблица 2.** Полиморфизм по величине амплификационных фрагментов молекулярных маркеров гена устойчивости к стеблевой ржавчине *Sr22*

Образцы пшеницы	Маркеры, размер ампликона (п. н.)								
	<i>Xbarc121</i>			<i>Xcfa2123</i>			<i>Xcfa2019</i>		
	170	197	215	230	234	240	200	238	250
SWSR22TB (контроль)	170	197	215	–	234	–	–	238	250
113/00i-4	–	–	215	–	–	240	–	–	–
119/4-06rw	170	–	215	–	234	–	–	238	250
GT 96/90	170	–	–	230	–	240	–	238	250
Донская полукарликовая	170	–	215	–	–	240	–	238	250
141/97w	170	–	215	–	234	–	200	238	250
9/00w	170	197	215	–	234	–	200	238	250

«–» – отсутствие ампликона.

et al., 2004; McNeil et al., 2008; Yu et al., 2010; Кохметова, Атишова, 2012). Рецессивный ген *Sr2* определяет возрастную устойчивость, что затрудняет отбор его носителей. В настоящее время *Sr2* широко используется в комбинациях с другими генами в селекционных программах на устойчивость ко всем вирулентным расам стеблевой ржавчины (Haile, Roder, 2013b). Этот ген распространен в коммерческих сортах пшеницы США (Hope, Arthur 71, Ottawa, Scout), Канады (Lancer, Selsirk, Pembina), Австралии (Baxter, Diamondbird, Hartog, Sunbrook), Индии (Sonalika), а также сортах СИММИТ (Nuri 70, Ravon76, Siete-Cerros). Ожидаемый размер диагностического фрагмента для *Xgwm533* (120 п. н.) наблюдался в нашей работе только у контрольных сортов Ravon76 и Buck Buck и у линии 113/00i-4.

Ген *Sr22* интрогрессирован от *T. monococcum* L. ssp. *Aegilopoides* (синоним *T. boeoticum* Boiss.). Для идентификации этого гена, локализованного на длинном плече

хромосомы пшеницы 7A, обычно используют 3 тесно сцепленных молекулярных маркера, *Xcfa2019*, *Xcfa2123* и *Xbarc121*, с размером диагностических фрагментов 235, 245 и 215 п. н. соответственно (Miranda et al., 2007). Гаплотип по всем трем маркерам, 235, 245, 215, свидетельствует о наличии *Sr22* в образце (Yu et al., 2010).

Размер продуктов ПЦР с маркерами *Xbarc121*, *Xcfa2123* и *Xcfa2019*, полученных в нашей работе, представлен в табл. 2. Амплифицируются фрагменты разного размера и не только те, которые заявлены как диагностические. Для маркера *Xbarc121* только одна линия – 9/00w – полностью повторила гаплотип контрольной линии SWSR22TB, содержащей ген *Sr22*. Ампликон размером 215 п. н., описанный как диагностический фрагмент в работе Yu с соавт. (2010), наблюдался у линий 113/00i-4, 119/4-06rw, 141/97w и у сорта Донская полукарликовая. При анализе продуктов ПЦР для маркера *Xcfa2123* наши результаты совпали с данными Haile с соавт. (2013a). У контрольной

линии SWSR22TB амплифицировался фрагмент размером 234 п. н. Аналогичный фрагмент наблюдался у линий 119/4-06gw, 141/97w и 9/00w. У остальных образцов размер ампликона был несколько больше – 240 п. н.

При амплификации маркера *Xcfa2019* у линии SWSR22TB в нашей работе выявлялись два фрагмента – 238 и 250 п. н. Амплификация диагностического фрагмента 238 п. н. для *Xcfa2019* показана и в работе Olson с соавт. (2010), что не совпадает с данными Haile с соавт. (2013a). Гаплотип, аналогичный линии SWSR22TB для маркера *Xcfa2019*, наблюдался почти у всех исследованных образцов, кроме линии 113/00i-4. Поскольку выявлены ампликоны по трем маркерам к *Sr22*, то можно предположить, что три линии (119/4-06gw, 141/97w и 9/00w) содержат этот ген.

Гены *Sr24* и *Sr36* интрогрессированы в пшеницу от *A. elongatum* и *T. timopheevii*. Ген *Sr24* тесно сцеплен с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr24* и локализован на 3DL-хромосоме пшеницы, *Sr36* локализован в коротком плече хромосомы 2B. Данные гены широко используются в селекции и распространены в западных коммерческих сортах. Оба гена эффективны к расе Ug99, но преодолеваются ее разновидностями (ТТКСТ и ТТТСК) (Jin et al., 2008, 2009). Эти гены эффективны к большинству остальных рас стеблевой ржавчины, их используют для создания пирамид в сочетаниях с другими генами *Sr* при селекции устойчивых сортов пшеницы.

Для идентификации *Sr24* мы использовали два STS-маркера, Sr24#12 и Sr24#50, из них Sr24#12 тесно сцеплен с *Sr24* и более надежен для его идентификации. В настоящее время эти маркеры широко используются для скрининга сортов в США и международном центре СИММИТ (William et al., 2007; Singh et al., 2008). Диагностические фрагменты размером 500 и 200 п. н. для Sr24#12 и Sr24#50 соответственно (Mago et al., 2005) были выявлены у положительного контроля (линии B TSR24AG) и у линии GT 96/90, что свидетельствует о наличии у нее данного гена.

Для идентификации *Sr36* использовали два маркера – кодоминантный *Xstm 773-2* и доминантный *Xwmc477*, тесно сцепленные с *Sr36* (Tsilo et al., 2008). Диагностические фрагменты для *Xstm 773-2* и *Xwmc477* (155 и 190 п. н. соответственно) наблюдались у положительного контроля *Sr36* (линий W2691SR36TT1 и Sr36(CI12632)/8\*LMPG) и линий 113/00i-4 и GT 96/90.

Нами не установлены эффективные гены *Sr25* и *Sr26* (интрогрессированные от *A. elongatum*) в анализируемом материале. Для их идентификации были применены широко используемые маркеры Gb (для *Sr25*) и Sr26#43 (для *Sr26*) (размер диагностических фрагментов 130 и 207 п. н. соответственно). Амплификацию данных фрагментов наблюдали только у контрольных линий LC-SR25-ARS и EAGLE-SR26.SR9G.

Анализ продуктов ПЦР показал наличие гена *Sr35* только у контрольных линий W3763-SR35 и Mq(2)5\*G2919. Ни в одном из анализируемых образцов эффективный ген *Sr35* (от *T. monocosmum*) не выявлен. Для его идентификации были использованы маркеры *Xcfa2170* и BF485004, свидетельствующие о наличии или отсутствии гена соответственно.

Присутствие эффективного против расы Ug99 гена *Sr32* (от *Ae. speltooides*) было проанализировано с использованием двух маркеров: *Xstm773* и *Xbarc55* (диагностический фрагмент для маркера *Xstm773* – ампликон 209 п. н., а для маркера *Xbarc55* – 128 п. н.) (Dundas et al., 2007; Bernardo et al., 2013). Результаты анализа продуктов ПЦР по обоим маркерам совпали. Оба маркера идентифицировали *Sr32* у контрольных линий C77.19.SR32 и CnsSr32AS, несущих транслокацию от *Ae. speltooides* в хромосоме 2B (McIntosh et al., 1995; Bernardo et al., 2013), а также у анализируемых линий 119/4-06gw, 9/00w и сорта Донская полукарликовая.

Для идентификации гена *Sr39* (от *Ae. speltooides*) был взят маркер Sr39#22. Ген *Sr39* выявлен у положительного контроля – линии RL6082, несущей генетический материал от *Ae. speltooides* (Yu et al., 2010) и пшенично-эгилопсной линии 113/00i-4. Полученные результаты будут уточняться в дальнейшем с использованием других маркеров. Для идентификации гена *Sr40* (от *T. timopheevii*) был применен тесно сцепленный (0,7 cM) маркер *Xgwm344*, в качестве положительного контроля была взята линия RL6088, несущая *Sr40* (Wu et al., 2009). Ген *Sr40* был идентифицирован у линий 113/00i-4 и GT 96/90. Гены устойчивости *Sr39* и *Sr40* локализованы на хромосоме 2B, предполагается их сцепление (Bernardo et al., 2013). Те же авторы сообщили о том, что ампликон маркера Sr39#22 размером 820 п. н. диагностирует *Sr40*, в то время как фрагмент 818 п. н. диагностирует *Sr39*. Так как в агарозном и полиакриламидном гелях разница в 2 нуклеотида не выявляется, то весьма вероятно, что мы идентифицировали у линии 113/00i-4 только *Sr40*, что будет проверяться в ходе дальнейших исследований.

Ген *Sr47* (от *Ae. speltooides*) был также идентифицирован с помощью маркера *Xgwm501* (Faris et al., 2008) у линий 113/00i-4 и GT 96/90. Мы не располагаем линией – положительным контролем *Sr47* – и о его наличии судили по присутствию диагностического фрагмента (109 п. н.) при анализе ПЦР. Кроме того, известно, что тип реакции в ответ на заражение расой ТТКСК (Ug99) у линий с геном *Sr47* – «0». У линии 113/00i-4 тип реакции при заражении расой ТТКСК (Ug99) был «0» в первой повторности и «1» во второй на стадии проростков, а у GT 96/90 – «0» в первой и «0» во второй повторности, что совпадает с типом реакции линий, носителей *Sr47*, и может быть косвенным доказательством наличия данного гена.

Для выявления гена *Sr44* (от *Th. intermedium*) был идентифицирован DArT маркер wPt-2565 с диагностическим фрагментом 380 п. н. (Crossa et al., 2007). Характерные ампликоны выявлены при анализе материала всех линий (кроме GT 96/90), однако присутствие гена *Sr44* будет проверяться в дальнейшей работе с использованием других маркеров.

Ген *Sr31* (от *S. cereale*) не эффективен против расы Ug99, но обеспечивает защиту от популяций возбудителя стеблевой ржавчины на территории Российской Федерации. Этот ген был выявлен только у линии GT 96/90. Ген *Sr9a* (от *T. aestivum*) выявлен в 2 образцах из 6 – линии 119/4-06gw и сорте Донская полукарликовая. Ген *Sr15* (от *T. aestivum*) идентифицирован у 3 линий – 113/00i-4, 9/00w и GT 96/90, а *Sr17* (от *T. turgidum*) – у 3 образцов: в линиях

**Таблица 3.** Идентификация генов *Sr* у образцов мягкой пшеницы с использованием молекулярных маркеров

Образцы	Гены устойчивости к расе возбудителя стеблевой ржавчины Ug99	
	эффективные	неэффективные
9/00w	<i>Sr22, Sr32, Sr44</i>	<i>Sr15</i>
141/97w	<i>Sr22, Sr44</i>	–
119/4-06rw	<i>Sr22, Sr32, Sr44</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
GT 96/90	<i>Sr24, Sr36, Sr40, Sr47</i>	<i>Sr15, Sr17, Sr31</i>
Донская полукарликовая	<i>Sr32, Sr44</i>	<i>Sr9a, Sr17, Sr19</i>
113/00i-4	<i>Sr2, Sr36, Sr39, Sr40, Sr44, Sr47</i>	<i>Sr15</i>

119/4-06rw и GT 96/90 и в сорте Донская полукарликовая. Ген *Sr19* (от *T. aestivum*) был идентифицирован у 2 образцов: в линии 119/4-06rw и сорте Донская полукарликовая. Результаты идентификации генов устойчивости показаны в табл. 3.

Широкий спектр генов устойчивости, выявленный в селекционных линиях мягкой пшеницы и в сорте Донская полукарликовая, возможно, обусловлен интрогрессиями чужеродных видов, использованных при их создании. Сорт Донская полукарликовая – результат скрещивания сорта Русалка (S13 × Бан 54) и сорта Северодонская (Безостая 1 × Мироновская 808). Устойчивость к стеблевой ржавчине, вероятно, пришла от итальянского сорта S13. Этот сорт – результат скрещивания Wase-Nibay/Sterling-B, а Wase-Nibay, в свою очередь, происходит от сорта LV(Львовская)/JPN. Последний, возможно, имеет материал *Ae. tauschii*. Селекционная линия из Болгарии GT 96/90 получена от скрещивания сортов (Жировка × Мироновская полуинтенсивная). Сорт Жировка выведен путем ступенчатых скрещиваний Кавказ/*T. miguschovae*/Безостая-1/3/Лютесценс-4473-h-122/4/Лютесценс-4473-h-122 и имеет в своей родословной генетический материал вида *T. miguschovae* (иммунный гомолог мягкой пшеницы). Этот синтетический вид представляет собой гибрид между *T. militinae* (естественный мутант *T. timopheevii*) и *Ae. tauschii* (Дорофеев и др., 1987). Линия GT 96/90 обладает групповой устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчинам, а также к желтой пятнистости (Гультьева, 1992; Коваленко, 2005).

Линия 113/00<sup>i</sup>-4 ( $2n = 42$ ) была получена в результате скрещивания ярового сорта Родина (World Seeds 1877 × Кавказ) с *Ae. triuncialis* ( $2n = 28$ , CCUU), пыльца которой перед опылением была облучена  $\gamma$ -лучами в дозе (5,0 кР) (Лапочкина, 1998). Цитологическое изучение характера конъюгации хромосом в мейозе у гибридов F<sub>1</sub> от скрещивания линии 113/00<sup>i</sup>-4 с исходным сортом мягкой пшеницы Родина выявило транслокацию и дисомное замещение, с которыми мы и связываем наличие устойчивости к группе болезней, в том числе и к расе Ug99. У этой линии идентифицировано 6 генов устойчивости к расе UG99, первоначально обнаруженных у других видов: *Sr2* (*T. turgidum*), *Sr36* (*T. timopheevii*), *Sr39* (*Ae. speltoides*), *Sr40* (*T. timopheevii*), *Sr44* (*Th. intermedium*), *Sr47* (*Ae. speltoides*). Однако у исходных образцов *Ae. triuncialis* к-1652 и к-1640 диагностические фрагменты маркеров к этим генам обнаружены не были. Это дает повод пред-

полагать наличие переопыления исходной формы с образцами, содержащими геном G, например с *T. kiharae*. Отметим, что в родословной гетерогенного сорта Родина (World Seeds 1877 × Кавказ) имеется генетический материал ржи (<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/default.htm>), что также вносит генетическое разнообразие в геном донорской линии 113/00<sup>i</sup>-4. У сорта Родина нами предварительно идентифицирован ген *Sr44* с использованием маркера wPt-2565. Линия пшеницы 113/00i-4 была протестирована в Эфиопии в полевых условиях на устойчивость к расе Ug99 и проявила иммунитет к стеблевой ржавчине, что подтверждает наличие у нее эффективных генов *Sr*. Линию 113/00<sup>i</sup>-4 планируется передать в ВИР в качестве донора устойчивости к стеблевой ржавчине под названием «Свиток» для использования в селекционных и генетических исследованиях.

Таким образом, мы охарактеризовали источники устойчивости к угандийской расе *P. graminis* f. sp. *tritici* по наличию маркеров, сцепленных с генами *Sr*, что позволяет с определенной вероятностью предполагать детерминацию устойчивости к стеблевой ржавчине перечисленными генами *Sr* (табл. 3). Ранее данные образцы были охарактеризованы по некоторым хозяйственно-биологическим признакам. Все они устойчивы к бурой ржавчине, линии 113/00i-4 и 119/4-06rw устойчивы к мучнистой росе, характеризуются достаточно высокой продуктивностью колоса (1,5–1,9 г) и крупнозерностью (масса 1000 зерен 40–42 г). Кроме того, сорт Донская полукарликовая и линия GT 96/90 имеют короткий стебель и раннее выколашивание.

Изученные источники устойчивости могут быть использованы в селекционных программах при создании сортов мягкой пшеницы с длительной устойчивостью к стеблевой ржавчине, а также для создания пирамид генов *Sr2, Sr22, Sr32, Sr36, Sr40, Sr44* и *Sr47* с использованием молекулярных маркеров.

### Благодарности

Данное исследование проведено при поддержке РФФИ (проект № 13-04-00922).

Авторы выражают благодарность заведующей лабораторией иммунитета растений к болезням ФГБНУ ВИЗР доктору биологических наук, профессору, члену-корреспонденту РАН Ольге Сильвестровне Афанасенко и заведующей сектором молекулярно-генетические взаимоотношения паразита и хозяина лаборатории им-

муниитета растений к болезням ФГБНУ ВИЗР, доктору биологических наук Нине Васильевне Мироненко за ценные советы и замечания, а также помощь в интерпретации полученных данных.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Анисимова А.В., Стеффенсон Б., Митрофанова О.П., Лапочкина И.Ф., Афанасенко О.С. Устойчивость сортифта пшеницы и образцов эгилопса из коллекции ВИР к расе стеблевой ржавчины Ug 99 (TTKSK). Технологии создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб., 2010.
- Волкова Г.В., Шумилов Ю.В., Синяк Е.В., Ваганова О.Ф., Данилова А.В. Эффективные гены устойчивости пшеницы и ячменя к возбудителям ржавчины и их идентификация в перспективных сортообразцах. Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. Краснодар, 2014.
- Гайнуллин Н.Р., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Киселева М.И., Коломиец Т.М., Коваленко Е.Д. Использование фитопатологического и молекулярно-генетических методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом коллекции «Арсенал». Генетика. 2007;43(8):1-7.
- Гульятеева Е.И. Наследование устойчивости сортов и линий пшеницы к ржавчинам: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; Пушкин, 1992.
- Дженин С.В., Лапочкина И.Ф., Жемчужина А.И., Коваленко Е.Д. Доноры яровой мягкой пшеницы к бурой ржавчине и мучнистой росе с генетическим материалом видов *Aegilops speltoides*, *Aegilops triuncialis*, *Triticum kiharae* Dorof. et Migusch. Докл. РАСХН. 2009;5:3-7.
- Дорофеев В.Ф., Удачин Р.А., Семенова Л.В., Новикова М.В., Градчанинова О.Д., Шитова И.П., Мережко А.Ф., Филатенко А.А. Пшеницы мира. Л.: Агропромиздат, 1987.
- Коваленко Н.М. Устойчивость видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* к возбудителю желтой пятнистости листьев пшеницы (*Rugophthora tritici-repentis* (Died.) Drechs.). Автореф. дис. ... канд. биол. наук. СПб.; Пушкин, 2005.
- Койшыбаев М., Болтыбаева Л.А., Копирова Г.И. Гермоплазма пшеницы с групповой устойчивостью к болезням с воздушно-капельной инфекцией. Агромеридиан. 2008;3(9):34-42.
- Кохметова А.М., Атишова М.Н. Идентификация источников устойчивости к стеблевой ржавчине с использованием молекулярных маркеров. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):132-141.
- Лапочкина И.Ф. Цитогенетические и морфологические особенности гибридов мягкой пшеницы, полученных с использованием облученной пыльцы вида *Aegilops triuncialis L.* Генетика. 1998;34(9):1263-1268.
- Лапочкина И.Ф. Реконструкция генома мягкой пшеницы (*Triticum aestivum L.*) при отдаленной гибридизации (с использованием *Aegilops L.* и других видов). Бюл. ВАК. 2000;1:46-47.
- Лапочкина И.Ф. Разнообразие коллекции мягкой пшеницы «Арсенал» и его использование в селекционно-генетических исследованиях. Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика. Матер. междунар. науч.-практ. конф., посвященной 125-летию со дня рождения Н.И. Вавилова. Большие Вяземы Моск. обл., 2012.
- Лапочкина И.Ф., Волкова Г.А. Создание коллекций замещенных и дополненных хромосомами *Aegilops speltoides* Tausch. линий яровой мягкой пшеницы. Генетика. 1994;30:86-87.
- Лапочкина И.Ф., Гайнуллин Н.Р., Дженин С.В., Руденко М.И., Макарова И.Ю., Иорданская И.В., Кызласов В.Г., Коваленко Е.Д., Жемчужина А.И., Куркова Н.Н. Идентификация генотипа устойчивости к бурой ржавчине у доноров мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом сорочичей для целенаправленного использования в селекции на иммунитет. Матер. конф. «Ориентированные фундаментальные исследования и их реализация в АПК России», СПб., 2008.
- Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на Севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы ВНИИЗХ. Тр. Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969;3:72-75.
- Синяк Е.В., Волкова Г.В., Надыкта В.Д. Характеристика популяции *Puccinia graminis f. sp. tritici* по вирулентности в Северо-Кавказском регионе России. Докл. РАСХН. 2013;6:27-30.
- Шаманин В.П., Моргунов А.И., Манес Я., Зеленский Ю.И., Чурсин А.С., Левшунов М.А., Потоцкая И.В., Лихенко И.Е., Манько Т.А., Каракоз И.И., Табаченко А.В., Петуховский С.Л. Селекционно-генетическая оценка популяций яровой мягкой пшеницы Сибирского питомника челночной селекции СИММИТ. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):21-32.
- Bernardo A.N., Bowden R.L., Rouse M.N., Newcomb M.S., Marshall D.S., Bai G. Validation of molecular markers for new stem rust resistance genes in U.S. Hard winter wheat. Crop Sci. 2013;53:755-764. DOI:10.2135/cropsci2012.07.0446
- Crossa J., Burgueco J., Dreisigacker S., Vargas M., Herrera-Foessel S.A., Lillmo M., Singh R.P., Trethowan R., Warburton M., Franco J., Reynolds M., Crouch J.H., Ortiz R. Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. Genetics. 2007;177:1889-1913. DOI: 10.1534/genetics.107.078659
- Dundas I.S., Anugrahwati D.R., Verlin D.C., Park R.F., Bariana H.S., Mago R., Islam A.K.M.R. New sources of rust resistance from alien species: Meliorating linked defects and discovery. Aust. J. Agric. Res. 2007;58:545-549.
- Faris J.D., Xu S.S., Cai X., Friesen T.L., Jin Y. Molecular and cytogenetic characterization of a durum wheat-*Aegilops speltoides* chromosome translocation conferring resistance to stem rust. Chromosome Research. 2008;16:1097-1105. DOI: 10.1007/s10577-008-1261-3
- Haile J.K., Hammer K., Badebo A., Singh R.P., Röder M.S. Haplotype analysis of molecular markers linked to stem rust resistance genes in Ethiopian improved durum wheat varieties and tetraploid wheat landraces. Genet. Resour. Crop. Evol. 2013a;60:853-864. DOI: 10.1007/s10722-012-9880-0
- Haile J.K., Roder M. Status of genetic research for resistance to Ug99 race of *Puccinia graminis f.sp.tritici*: A review of current research and implications. African J. Agr. Res. 2013b;8(50):6670-6680. DOI: 10.5897/AJAR2013.7257
- Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). Theor. Appl. Genet. 2004;109:1641-1647. DOI: 10.1007/s00122-004-1787-5
- Hsam S.L.K., Lapochkina I.F., Zeller F.J. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum L.* em. Thell). 8. Gene *Pm32* in a wheat-*Aegilops speltoides* translocation line. Euphytica. 2003;133:367-370.
- Jin Y., Szabo L.J., Pretorius Z.A., Singh R.P., Ward R., Fetch T. Detection of virulence to resistance gene *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis f. sp. Tritici*. Plant Dis. 2008;92:923-926. DOI: 10.1094/PDIS-92-6-0923
- Jin Y., Szabo L.J., Rouse M.N., Fetch T., Jr., Pretorius Z.A., Wanyera R., Njau P. Detection of virulence to resistance gene *Sr36* within the TTKS race lineage of *Puccinia graminis f. sp. Tritici*. Plant Dis. 2009;93:367-370. DOI: 10.1094/PDIS-93-4-0367
- Lapochkina I.F., Iordanskaya I.V., Yatchevskaya G.L., Zemchuzhina A.I., Kovalenko E.D., Solomatin D.A., Kolomiets T.M. Identification of alien genetic material and genes of resistance to leaf rust in wheat (*Triticum aestivum L.*) stocks. Proc. of Tenth Int. Wheat Genetics Symp. 2003;3:1190-1192.

- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S., Spielmeyer W., Lawrence G.J., Pryor A.J., Ellis J.G. Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 2005;111:496-504. DOI: 10.1007/s00122-005-2039-z
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat rusts: An atlas of resistance genes. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Clayton, South Victoria, Australia, 1995.
- McNeil M.D., Kota R., Paux E., Dunn D., McLean R., Feuillet C., Li D., Kong X., Lagudah E., Zhang J.C., Jia J.Z., Spielmeyer W., Bellgard M., Appels R. BAC-derived markers for assaying the stem rust resistance gene, *Sr2*, in wheat breeding programs. *Mol. Breeding.* 2008;22:15-24. DOI: 10.1007/s11032-007-9152-4
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl. Acids. Res.* 1980;8(19):4321-4326.
- Olson E.L., Brown-Guedira G., Marshall D., Stack E., Bowden R.L., Jin Y., Rouse M., Pumphrey M.O. Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene *Sr22*. *Crop Sci.* 2010;50:1823-1830. DOI: 10.2135/cropsci2009.11.0652
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals. *Can. J. Res. Sec. C Bot. Sci.* 1948;26:297-311.
- Rahmatov M., Andrsson S., Gustavsson L., Wanyera R., Steffenson B., Johansson E. Analysis of adult plant and seedling stem rust resistance in wheat-alien introgression lines. *Disease Risk and Food Security: Proc. of the 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y., Huerta-Espino J., Kinyua M.G., Wanyera R., Njau P., Ward R.W. Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources.* 2006;1(054). DOI: 10.1079/PAVSNNR20061054
- Singh R.P., Hodson D.P., Huerta-Espino J., Jin Y., Njau P., Wanyera R., Herrera-Foessel S.A., Ward R.W. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Advanced Agronomy.* 2008;98:271-309. DOI: 10.1016/S0065-2113(08)00
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegering W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. U.S. Dep. Agric. Agric. Res. Serv. E-617. U.S. Gov. Print. Office, Washington, DC, 1962.
- Tsilo T.J., Jin Y., Anderson J.A. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat. *Crop Sci.* 2008;48:253-261. DOI: 10.2135/cropsci2007.04.0204
- William H.M., Trethowan R., Crosby-Galvan E.M. Wheat breeding assisted by markers: CIMMYT's experience. *Euphytica.* 2007;157:307-319. DOI: 10.1007/s10681-007-9405-7
- Wu S., Pumphrey M., Bai G. Molecular mapping of stem-rust-resistance gene *Sr40* in wheat. *Crop Sci.* 2009;49:1681-1686. DOI: 10.2135/cropsci2008.11.0666
- Xu S.S., Klindworth D., Niu Z.-X., Zhang Q.-J., Chao S.-M., Friesen T., Jin Y., Zhong S.-B., Faris J., Cai X.-W., Larkin P. Introgression of alien genes for resistance to Ug99 stem rust in wheat. *Disease Risk and Food Security: Proc. 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.
- Yu L.X., Liu S., Anderson J.A., Singh R.P., Jin Y., Dubcovsky J., Brown-Guedira G., Bhavani S., Morgounov A., He Z., Huerta-Espino J., Sorrells M.E. Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol. Breeding.* 2010;26:667-680. DOI: 10.1007/s11032-010-9403-7
- Zheng Q., Klindworth D., Niu Z.-X., Rouse M., Yu J., Friesen T., Li Z.-Z., Xu S. Stem rust resistance in *Thinopyrum* species. *Disease Risk and Food Security. Proc. 13th Int. Cereal Rusts and Powdery Mildew Conf.* 28 Aug.–1 Sept. 2012, Beijing. 2012.