

# Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний

Е.С. Сколотнева , И.Н. Леонова, Е.Ю. Букатич, Е.А. Салина

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Возбудители листостебельных инфекций мягкой пшеницы *Triticum aestivum* имеют экономическое значение для большинства регионов Российской Федерации. Среди них наиболее распространены различные виды ржавчин и мучнистая роса. Нами усовершенствован методический подход для постулирования эффективности генов, определяющих групповую устойчивость пшеницы к грибным заболеваниям; он объединяет традиционные методы фитопатологической оценки в поле и современные технологии генотипирования с помощью молекулярных ДНК-маркеров. Схема разработанной методики включает следующие этапы: 1) изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров; 2) оценка генотипов в полевых условиях; 3) сопоставление данных фитопатологической оценки и молекулярного маркирования для выявления образцов пшеницы с эффективной групповой устойчивостью к фитопатогенам. Приведены рекомендации по генотипированию сортообразцов и линий пшеницы с использованием маркеров к генам *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* и гена с плейотропным эффектом *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*. Апробированы маркеры для российских сортообразцов и линий, несущих хромосому от *Thinopyrum intermedium* с группой генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* и новую транслокацию от *Aegilops speltoides* с группой генов, обозначенных нами *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*. При оценке вклада генов (включая гены, расположенные в районах транслокаций) в формирование устойчивости мягкой пшеницы к грибным инфекциям необходимо использовать расширенную выборку генотипов, в том числе несущих одну и ту же группу генов в различном генетическом окружении. Дополнительно предложены сроки и периодичность учета развития грибных заболеваний в условиях Западной Сибири в зависимости от возбудителя. Предложенный в настоящей статье методический подход может быть использован для идентификации и оценки эффективности групп генов, обеспечивающих защиту пшеницы от листостебельных болезней. Данный подход применим при изучении генетических коллекций, состоящих из изогенных линий, источников и доноров генов устойчивости, а также при отборе генотипов пшеницы с использованием маркер-ориентированной селекции.

Ключевые слова: полевая оценка устойчивости; молекулярные маркеры; групповая устойчивость к грибным заболеваниям; *Lr*; *Sr*; *Pm*; *Triticum aestivum*.

## КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Сколотнева Е.С., Леонова И.Н., Букатич Е.Ю., Салина Е.А. Методические подходы к идентификации эффективных генов, определяющих устойчивость пшеницы к комплексу грибных заболеваний. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307

## HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Skolotneva E.S., Leonova I.N., Bukatich E.Yu., Salina E.A. Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(7):862-869. DOI 10.18699/VJ17.307 (in Russian)

УДК 577.29:633.111.1


Поступила в редакцию 04.10.2017 г.

Принята к публикации 25.10.2017 г.

© АВТОРЫ, 2017

 e-mail: sk-ska@yandex.ru

## Methodical approaches to identification of effective wheat genes providing broad-spectrum resistance against fungal diseases

E.S. Skolotneva , I.N. Leonova, E.Yu. Bukatich, E.A. Salina

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Among the pathogenic complex of the common wheat there is a causal agent of leaf and stem diseases (rusts and powdery mildew), which has economic importance for most of the Russian regions. We propose a methodological approach for confirmation of effectiveness of wheat genes conferring broad-spectrum resistance to different types of fungal diseases, which integrates traditional field tests and current genotyping techniques with molecular DNA markers. The proposed approach includes the following steps: 1) evaluating of wheat genotypes using molecular DNA markers; 2) field tests for genotypes; 3) confirmation of effectiveness of broad-spectrum resistance genes by matching field scores and data from molecular markers. A protocol has been proposed for genotyping varieties and wheat lines using markers linked to *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* and the gene *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)* with a pleiotropic effect. Markers to the genes *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* transferred from *Thinopyrum intermedium* into the genomes of Russian wheat varieties and markers to a new translocation from *Aegilops speltoides* with a group of genes, designated as *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, were tested. When evaluating the contribution of the genes (including genes located on the alien translocations) to the formation of common wheat resistance to fungal diseases, it is necessary to use an extended sample, including genotypes carrying the same group of genes in a different genetic background. In addition, recommendations are given on the terms and frequency of monitoring of fungal diseases in Western Siberia, depending on the pathogen. The methodological approach proposed in the article can be used for identification and evaluation of the efficacy of the genes determining protection of wheat from fungal diseases. This approach is applicable in the investigation of genetic collections consisting of isogenic lines, sources and donors of resistance genes, as well as in the development of wheat genotypes using marker-assisted selection.

Key words: field screening for resistance; molecular markers; broad-spectrum resistance against fungal diseases; *Lr*; *Sr*; *Pm*; *Triticum aestivum*.

В регионах с умеренным климатом, таких как центр и северо-запад России, Урал и Западная Сибирь, постоянным фактором, снижающим урожай зерновых, является комплекс листостебельных патогенов грибного происхождения. Среди них распространены возбудители бурой и стеблевой ржавчины, а также мучнистой росы (Сочалова, Лихенко, 2011; Гульгяева и др., 2014).

Бурая ржавчина (возбудитель – биотрофный паразитический гриб *Puccinia triticina*) – одно из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний пшеницы во всем мире. Интенсивное развитие болезни в разных климатических зонах обусловлено пластичностью и высокой репродуктивной способностью патогена. В Российской Федерации бурая ржавчина встречается повсеместно. Ежегодно она уносит до 10 % урожая, а в годы эпифитотийного развития потери урожая могут достигать 30 % и более (Коваленко и др., 2012). Наибольшее развитие болезни наблюдается в фазу цветения пшеницы, когда рекомендуется проводить серию фитопатологических учетов.

Стеблевая ржавчина (возбудитель – биотрофный паразитический гриб *Puccinia graminis*) на протяжении многих лет не носила эпифитотийного характера развития. Однако в последнее десятилетие заболевание стало приобретать хозяйственное значение в связи со смещением климатических показателей северных регионов в сторону благоприятных условий для развития инфекции. Характерная черта этого вида ржавчины заключается в том, что она может практически полностью уничтожать посевы пшеницы, если поражение наблюдается в ранние фазы развития пшеницы. Особую опасность представляет новая раса стеблевой ржавчины Ug99 и ее модификации, которая после эпифитотии на северо-востоке Африки распространяется по всему миру, в том числе в сторону Российской Федерации.

Мучнистая роса (возбудитель – облигатный узкоспециализированный паразитический гриб *Blumeria graminis*) при массовом развитии вызывает недобор урожая 10–15 % и более (Санин и др., 2002). Одновременное возделывание озимой и яровой пшеницы обеспечивает перезимовку патогена в виде мицелия, что повышает экономическое значение патогена, делая его возбудителем одной из самых опасных болезней злаков.

Основой успешного проведения профилактических и защитных мероприятий от грибных инфекций пшеницы являются как правильная и своевременная их диагностика, так и скрининг устойчивости сортового материала (Санин и др., 2010). Среди методов оценки устойчивости генотипов пшеницы к фитопатогенам наиболее достоверные результаты показывает лабораторный анализ реакций растений на заражение патотипами грибов с известными генами вирулентности (Гешеле, 1978). При этом для анализа инфекционных типов на проростках пшеницы или отрезках листьев используют специальные оценочные шкалы (Койшыбаев и др., 2014), суть большинства которых сводится к присвоению баллов от 0 до 4 различным по качеству типам поражения (где нулю соответствует иммунитет растения). Однако подобная оценка возможна только при наличии коллекции патотипов гриба с известными генами вирулентности. Поэтому в целях

выяснения эффективности генов устойчивости к патогенному комплексу возможно ограничиться полевой оценкой сортового материала, если она организована в регионе статистически, что было обосновано исследованиями ученых из Венгрии, Чехии, Франции и Нидерландов (Mesterhazy et al., 2000). Для массового полевого скрининга устойчивости к видам ржавчины селекционного и коллекционного материала рекомендуются разные шкалы, среди которых наиболее удобна шкала СИММУТ, совмещающая два показателя: тип реакции (качественный) и степень пораженности листьев и стеблей (количественный). Для полевой оценки устойчивости селекционного материала к мучнистой росе пользуются 9-балльной шкалой Мережко, разработанной во Всероссийском НИИ растениеводства (ВИР), присваивающей максимальный балл иммунному растению. Кроме того, существует международная шкала СИММУТ, описывающая степень поражения листьев мучнистой росой в процентах (Койшыбаев и др., 2014).

Визуальный анализ не позволяет корректно провести оценку фенотипа устойчивости в случаях наложения симптомов нескольких листостебельных инфекций. Кроме того, степень проявления генов устойчивости зависит от генетического фона, а также от абиотических факторов и условий внешней среды. Так, например, гены устойчивости к бурой ржавчине *Lr11*, *Lr14a*, *Lr15*, *Lr18* являются температурочувствительными и теряют свою активность при повышении температуры (McIntosh et al., 1995). В этих условиях применение молекулярных маркеров для идентификации генов устойчивости к инфекциям увеличивает эффективность селекции на иммунитет, в частности при создании генотипов с групповой устойчивостью к грибным заболеваниям.

В последнее время разработано много ДНК-маркеров, предлагаемых для диагностики генов устойчивости и использования в схемах маркер-ориентированной селекции зерновых культур MAS (marker-assisted selection) (<http://maswheat.ucdavis.edu/>). Основной принцип MAS заключается в идентификации тесного сцепления между маркером и геном, контролирующим признак, и использовании ассоциаций маркер–признак в практических целях для создания новых сортов и селекционных линий (Леонова, 2013). Однако прежде ассортимент разработанных молекулярных маркеров должен проходить верификацию на разном генетическом фоне, включая генетические коллекции изогенных линий, содержащих гены устойчивости. Рекомендованными для дальнейшего использования в MAS могут быть только маркеры, для которых случаи ложного положительного или отрицательного результата исключены. Именно по этой причине настоящий этап развития MAS характеризуется как повсеместная апробация ДНК-маркеров на разном сортовом материале с выявлением универсальных систем идентификации генов, в том числе генов устойчивости к инфекциям. Групповая устойчивость может обеспечиваться генными локусами, именуемыми плейотропный эффект, которые обуславливают частичную устойчивость к бурой, стеблевой и желтой ржавчине и мучнистой росе: *Lr46* (=Yr29/Sr58/Pm39), *Lr67* (=Yr46/Sr55/Pm46) и *Lr34* (=Sr57/Yr18/Pm38) (Krattinger et al., 2016). В ряде случаев групповая устойчивость обе-

спечивается генами, которые расположены в чужеродных транслокациях, в связи с чем чаще всего наследуются единой группой. При этом отдельные гены в группе могут быть не эффективны в регионе из-за специфической структуры патогенного комплекса, что важно учитывать при введении данной транслокации в селекционный материал. Так, эффективность транслокации *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* в большинстве регионов Российской Федерации наблюдается по отношению к стеблевой ржавчине, а в ряде регионов – и к мучнистой росе (Сочалова, Лихенко, 2011; Гулятьева и др., 2015). Хорошим примером транслокации, в большинстве регионов эффективно защищающей пшеницу страны от бурой и стеблевой ржавчины, является группа сцепления *Lr19/Sr25*, однако исключением служит регион Поволжья, где в популяции *P. triticina* выявлена высокая частота патотипов, вирулентных к *Lr19* (Гулятьева и др., 2015).

Нами разработан методический подход для постулирования эффективности комплекса генов, тесно сцепленных между собой и отвечающих за устойчивость к разным фитопатогенам, в коллекциях гибридов и сортообразцов пшеницы. Под эффективностью таких групп генов или генных локусов понимается их способность обеспечивать защиту растения от нескольких грибных возбудителей. Как правило, при этом подразумевается определенный географический ареал со специфическим для него вирулентным составом патогенных популяций.

В настоящее время в зарубежных и отечественных коллекциях озимой и яровой пшеницы распространены гибридные линии и сортообразцы пшеницы, имеющие группы сцепления *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17* и ген с плеiotропным эффектом *Lr34* (= *Sr57/Yr18/Pm38*) (Белан и др., 2012; Dakouri et al., 2013; Садовая и др., 2014; Shamanin et al., 2016). Кроме того, в последние годы установлено, что в России широкое распространение получили сорта, несущие практически интактную хромосому от пырея с группой генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, как, например, у сортов Тулайковская 5, 10, 100 (Salina et al., 2015). Новая транслокация от *Aegilops speltoides* с группой генов, обозначенных нами как *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, недавно описана в коллекционном материале Института цитологии и генетики СО РАН (Petraash et al., 2016).

Процедура поддержания любой коллекции путем размножения семенного материала влечет за собой необходимость проверки генетической чистоты изучаемых образцов. Предложенный нами методический подход позволяет провести верификацию коллекций гибридов и сортообразцов пшеницы на присутствие восьми тесно сцепленных групп генов: *Lr16/Sr23*, *Lr24/Sr24*, *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*, *Lr37/Sr38/Yr17*, *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* и гена с плеiotропным эффектом *Lr34* (= *Sr57/Yr18/Pm38*), определяющих групповую устойчивость к фитопатогенам.

В методику входит: 1) изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров; 2) оценка генотипов в полевых условиях; 3) сопоставление данных фитопатологической оценки и молекулярного маркирования для выявления образцов пшеницы с эффективной групповой устойчивостью к фитопатогенам.

## Изучение генотипов пшеницы с использованием молекулярных маркеров

К настоящему времени в научной литературе предложен широкий выбор молекулярных маркеров генов устойчивости к грибным заболеваниям, в том числе и чужеродных транслокаций, несущих комплекс генов, тесно сцепленных друг с другом, и генов с плеiotропным эффектом. Каждый из этих генов обуславливает устойчивость к определенному виду патогена. В случае эффективной устойчивости ко всем патогенам наблюдается фенотипическое проявление группового иммунитета у изучаемых образцов пшеницы. В нашем исследовании проведена процедура верификации маркеров, позволяющих выявить группу генов к разным фитопатогенам, и оптимизирован протокол их использования в маркер-ориентированной селекции на групповой иммунитет. Верификацию маркеров проводили на коллекциях яровой мягкой пшеницы Всероссийского НИИ фитопатологии (ВНИИФ), Омского государственного аграрного университета (ОмГАУ) и Сибирского НИИ растениеводства и селекции – филиала ИЦиГ СО РАН (СибНИИРС). В качестве положительного контроля на присутствие генов устойчивости к грибным заболеваниям использовали международные наборы почти изогенных линий пшеницы, созданных на сортах Тэтчер (Long, Kolmer, 1989) и Маркиз (Roelfs, Martens, 1988). В целях облегчения процедуры генотипирования образцов оптимизирована реакционная смесь для проведения анализа ПЦР.

## Пробоподготовка и оборудование

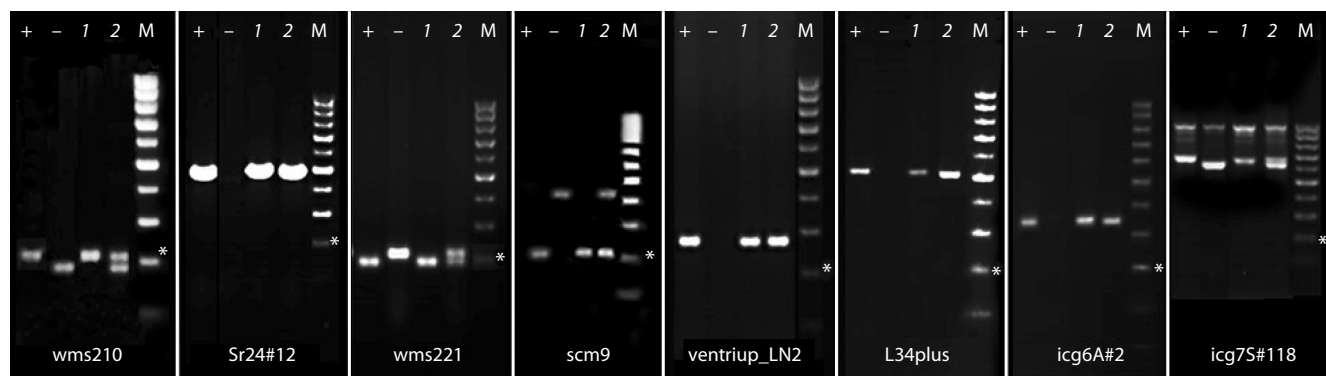
Для экстракции ДНК используют 5–7-дневные проростки или растения пшеницы, выращенные в поле или теплице, при этом берут фрагмент листа одного растения, длиной не более 25 мм. Для оценки необходим анализ не менее пяти растений каждого изучаемого образца, на первом этапе анализа ПЦР допустимо объединение аликуот. Фрагмент листа хранят при температуре от 0 до +5 °С, если выделение ДНК планируется в этот же день, или в условиях от –20 до –70 °С, если выделение ДНК планируется позже. Для охлаждения или хранения собранный материал помещают в пластиковые пробирки или упаковки.

Необходимым оборудованием для экстракции ДНК, постановки ПЦР и визуализации ее результата являются: микроцентрифуга для пробирок типа Эппендорф до 16000 g, термостат или водяная баня, набор дозаторов переменного объема (диапазон 0.5 – 1000 мкл), вортекшейкер для перемешивания микропробирок типа Эппендорф объемом 0.2 – 1.5 мл, амплификатор, горизонтальная камера для электрофореза, источник тока и система гель-документирования.

## Последовательность анализа

Качество результатов генотипирования зависит, в первую очередь, от правильно подобранного молекулярного маркера к тестируемому гену и достигается при оптимизировании смеси для ПЦР, режима амплификации и системы визуализации продуктов ПЦР. Немаловажен и выбор метода выделения ДНК из растительных образцов.

**Этап 1. Экстракция ДНК.** Методики выделения ДНК из растительных образцов, которые используют в раз-



**Рис. 1.** Образцы электрофорезов для маркеров, выявляющих гены групповой устойчивости: *Lr16/Sr23* (wms 210), *Lr24/Sr24* (Sr24#12), *Lr19/Sr25* (wms221), *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8* (scm9, фрагмент 207 п. н.), *Lr37/Sr38/Yr17* (ventriup\_LN2), *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)* (L34 plus), *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* (icg6A#2), *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* (icg7S#118).

«+» – сорт/линия пшеницы, несущая изучаемую группу генов устойчивости (r-аллель) (положительный контроль, см. Доп. материалы 4); «-» – отрицательный контроль (сорт Тэтчер или Черныя 13) (s-аллель); 1 – гомозиготная линия пшеницы, несущая r-аллель; 2 – гетерозиготная линия пшеницы, несущая r-аллель + s-аллель; М – маркер длины 100 п. н., звездочкой отмечена длина 200 п. н.

личных лабораториях, имеют общий принцип: лизис клеточной стенки, дезактивация эндонуклеаз, очистка от белковой фракции и преципитация молекулы ДНК. Распространенным действующим реагентом буфера, лизирующего растительную клеточную стенку, является ЦТАБ – СТАВ-модифицированный метод ДНК экстракции, который подробно описан в работе (Stepien et al., 2003). По результатам сравнения качественных и количественных характеристик ДНК, мы предлагаем для подготовки растительных образцов при маркерном анализе использовать альтернативную систему лизирующего буфера на основе додецилсульфата натрия (SDS), в состав которого также включен пиросульфит натрия, замедляющий реакции окисления (Plaschke et al., 1995). Основные компоненты буфера, оптимизированные в процессе работы, приведены в Доп. материалах 1<sup>1</sup>. В результате удается получить препараты ДНК приемлемого качества (соотношение поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм не менее 1.8) и в количестве, необходимом для генотипирования (1–5 мкг).

**Этап 2. Амплификация и визуализация продуктов ПЦР.** Состав реакционной смеси для ПЦР, как правило, содержит следующие компоненты: прямой и обратный праймеры, олигонуклеотиды, Taq-полимеразу, буфер с ионами Mg<sup>2+</sup> и воду mQ. Разработчики маркеров обычно указывают концентрации праймеров на объем смеси, необходимые для качественной ПЦР-амплификации маркера. Однако для упрощения лабораторной работы по тестированию генетического материала с использованием широкого набора маркеров удобнее использовать универсальную пропись. Реакционная смесь оптимизирована нами для амплификации большинства известных молекулярных маркеров (Доп. материалы 2). Нами также апробирована коммерческая ПЦР-смесь БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (ООО «Биолабмикс»), которая позволяет сократить число шагов пипетирования, так как содержит олигонуклеотиды, Taq-полимеразу и буфер. Кроме того, добавленные в ПЦР-смесь красители (ксилен

цианол, бромфеноловый синий, Orange G, тартразин) не влияют на работу Taq-полимеразы и позволяют наносить продукты амплификации сразу на гель (Доп. материалы 3).

Условия проведения ПЦР-амплификации оптимизированы нами для каждого молекулярного маркера на широкой выборке генотипов. Праймеры представляют собой олигонуклеотиды, синтезированные фирмой ООО «БИОССЕТ». Их последовательности представлены в литературе, за исключением праймеров для маркеров Xicg6A#2 и Xicg7S#118, разработанных в ИЦиГ СО РАН для идентификации группы генов *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* и *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*, охарактеризованных ранее (Доп. материалы 4) (Salina et al., 2015; Petrash et al., 2016). В Доп. материалах 4 приведена информация о некоторых сортах, которые, по результатам проведенной нами идентификации, могут быть рекомендованы для использования в качестве положительных контролей изучаемой группы генов. Функцию отрицательного контроля может выполнять универсально восприимчивый сорт или сортообразец, не несущий изучаемого гена. Подобраны условия, обеспечивающие эффективную амплификацию молекулярных маркеров, которые представлены в Доп. материалах 5. Альтернативные маркеры, используемые для идентификации указанных выше групп генов, и их верификация в отечественных лабораториях приведены в Доп. материалах 4.

**Этап 3. Документирование и анализ результатов.** Электрофорез продуктов ПЦР проводится согласно условиям, представленным в Доп. материалах 5. В процессе приготовления агарозного геля на 100 мл расплавленной агарозы добавляется 5 мкл 1 % раствора этидия бромида для последующей визуализации фрагментов ДНК в УФ-свете. В Доп. материалах 6 и на рис. 1 приведена длина фрагментов ПЦР, маркирующих доминантные аллели изучаемых групп генов устойчивости. Кодоминантный маркер позволяет выявить гетерозиготное состояние генов, которое будет определяться парой фрагментов различного молекулярного веса: r-аллель (resistant) и s-аллель (susceptible) гена устойчивости. Фрагменты ПЦР, отлич-

<sup>1</sup> Дополнительные материалы 1–12 см. в Приложении по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx10.pdf>

ные по длине от указанных в Доп. материалах 6 и присутствующие у отрицательного контроля, не рассматриваются при постулировании группы генов. Например, при оценке группы генов *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7* с использованием маркера *Xicg7S#118* рассматривается фрагмент длиной около 680 п. н., соответствующий г-аллелю, и фрагмент 630 п. н. (s-аллель) (см. Доп. материалы 6). Фрагмент ПЦР длиной 1000 п. н. (см. рис. 1, *icg7S#118*) исключается из анализа, так как не соответствует описанным выше требованиям. Также следует обращать внимание на то, что один и тот же маркер может идентифицировать различные группы генов, как в случае маркера *scm9*, выявляющего различные ржаные транслокации – *1RS.1BL* (длина фрагмента 207 п. н.) и *1RS.1AL* (длина фрагмента 228 п. н.). В этом случае, если происхождение транслокации неизвестно, следует использовать гели с более высокой разрешающей способностью, чем приведено в Доп. материалах 5.

### Оценка устойчивости генотипов пшеницы в полевых условиях к комплексу грибных заболеваний

Для проведения полевой оценки и отбора генотипов пшеницы с устойчивостью к комплексу грибных патогенов необходимо выполнение следующих условий.

1. Достоверность результатов обеспечивается высевом сортообразцов в нескольких повторностях на естественном инфекционном фоне при соблюдении дистанции между опытами от 1.5 км.
2. Проверка генов устойчивости у разных генотипов позволяет обнаружить вклад генотипической среды в реакцию на заражение.
3. В оценку обязательно должны включаться восприимчивые контроли к инфекциям. Для большинства регионов страны показательную восприимчивость к комплексу грибных заболеваний проявляют сорта яровой пшеницы Черныява 13, Скала, Хакасская. Кроме того, в оценку включают сорта, на основе которых созданы линии.
4. Сроки учета и их периодичности должны устанавливаться в зависимости от региона и возбудителя. Для листостебельных патогенов это период, определяемый развитием флаг-листа и фазами зрелости зерна в колосе. По результатам многолетних наблюдений за развитием фитопатогенного комплекса грибных заболеваний на посевах пшеницы в Западной Сибири, мы рекомендуем схему, представленную на рис. 2. Сроки маршрутных обследований в Центральном регионе России из рекомендаций по проведению фитосанитарного мониторинга, составленных в ВНИИФ, приведены в Доп. материалах 7.
5. Желательным является соблюдение унифицированного подхода к скринингу устойчивости сортообразцов к комплексу патогенов на базе стандартных шкал для оценки грибных инфекций. В частности, для удобства обработки результатов полевой оценки мы предлагаем в качестве эффективных в регионе условно рассматривать те группы сцепления, которые обеспечивали устойчивость ко всем соответствующим возбудителям инфекций на естественном инфекционном фоне. То есть, например, после заключения о групповой устойчи-

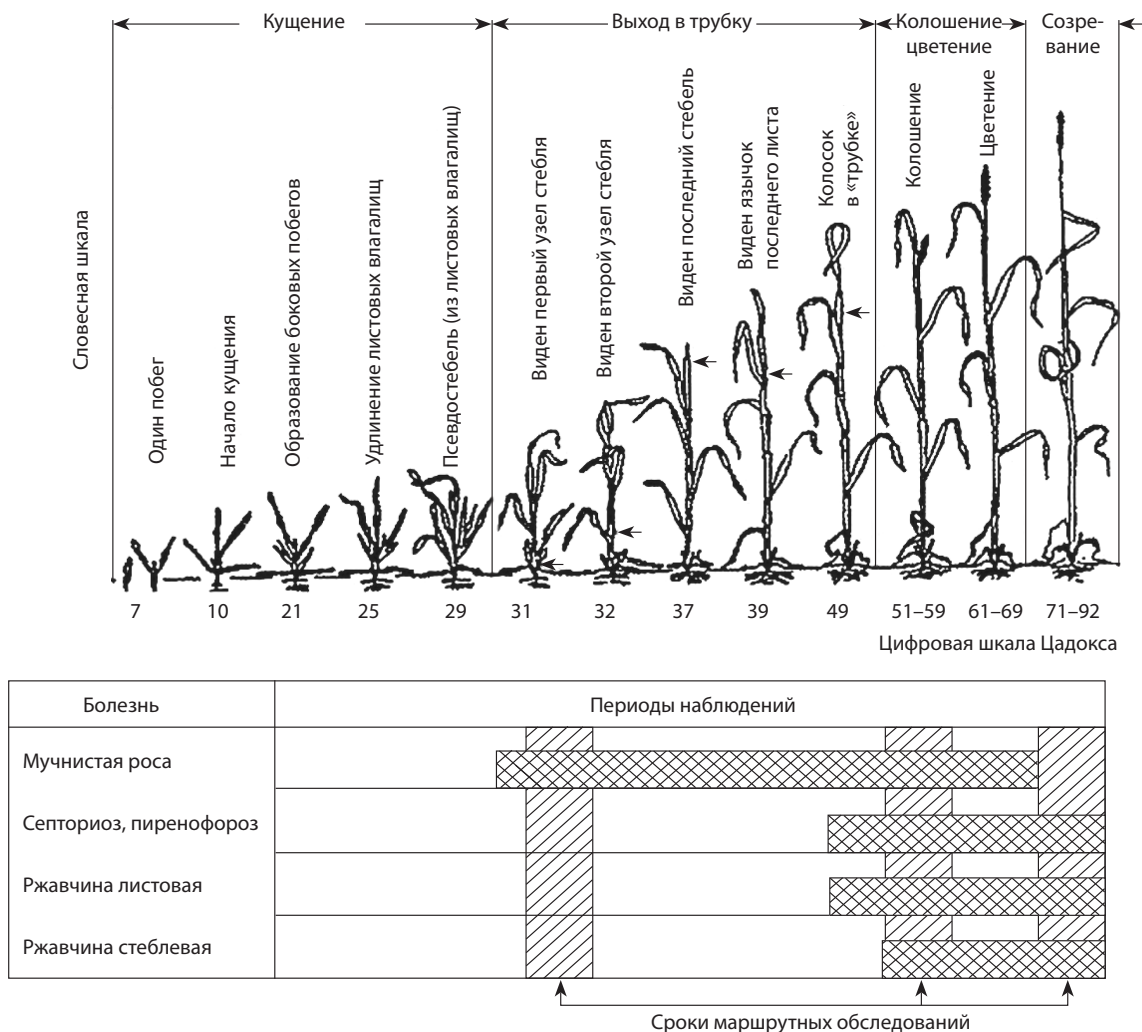
вости генотипов с транслокацией *Lr24/Sr24* как к бурой, так и к стеблевой ржавчине, она может рассматриваться как эффективная в регионе.

Вывод об эффективности транслокации *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2* будет сделан после описания устойчивости генотипов к ржавчинным заболеваниям и мучнистой росе. При этом мы предлагаем оперировать только двумя показателями: эффективностью («1») и неэффективностью («0») гена/группы генов, что позволит получить наиболее строгую оценку заявленных групп генов, в соответствии с целью, поставленной при разработке данного методического подхода. В табл. 1 приведены соответствия предлагаемых нами условных обозначений и наиболее распространенных оценочных шкал. Описание различных оценочных шкал и соответствующие иллюстрации типов поражения пшеницы ржавчинными грибами и мучнистой росой для удобства использования собраны в Доп. материалах 8–11.

### Постулирование эффективной устойчивости к грибным заболеваниям в селекционном материале

В соответствии с предложенным методическим подходом эффективность гена или группы генов в генотипе выявляют путем сопоставления данных полевой оценки устойчивости и молекулярного маркирования. Совпадение условного обозначения эффективности «1» и положительного сигнала молекулярного маркера мы предлагаем рассматривать как основание для постулирования эффективности гена/группы сцепления. Рассмотрим пример применения процедур предложенного методического подхода для постулирования эффективных генов к разным болезням в материале сибирской коллекции мягкой яровой пшеницы, являющейся собственностью генофонда растительных ресурсов СибНИИРС. По данным ПЦР-анализа генотипирования, селекционный материал защищен генами, определяющими устойчивость к ржавчинным болезням и мучнистой росе (*Lr19/Sr25*; *Lr24/Sr24*; *Lr26/Sr31/Yr9/Pm8*; *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*; *LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7*), и плейотропным геном *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*. Полевая оценка изученной коллекции пшеницы на устойчивость к комплексу грибных заболеваний выполнена согласно нашим рекомендациям. Расположение полей и наличие инфекционного участка в СибНИИРС позволили выполнить достоверную оценку вариантов опыта в условиях естественного инфекционного фона в трех повторностях (I, II, III) во время летнего периода вегетации в 2016 г. Результаты приведены в Доп. материалах 12. Устойчивость генотипов оценивали с помощью шкал ВИР и СИММУТ, после чего генам и группам сцепления были присвоены условные обозначения их эффективности по табл. 1.

На заключительном этапе проведено сопоставление результатов данных полевой оценки устойчивости и молекулярного маркирования генов устойчивости к стеблевой, бурой ржавчине, мучнистой росе. Совпадение условного обозначения эффективности «1» и положительного сигнала соответствующего молекулярного маркера рассматривалось как основание для постулирования эффективности гена или группы сцепления, определяющей групповую устойчивость генотипа. Случаи, когда линия или сорт



**Рис. 2.** Соответствие стадий развития растений пшеницы и сроков обследований листостебельных заболеваний в Западной Сибири. Международная шкала Цадокса стадий развития зерновых приведена из (Санин и др., 2010).

**Таблица 1.** Сопоставление предлагаемых условных показателей эффективности генов/групп сцепления к ржавчинным заболеваниям и мучнистой росе и наиболее распространенных шкал для оценки устойчивости генотипов пшеницы

Предлагаемые условные обозначения	Ржавчинные болезни		Мучнистая роса	
	По (Stakman et al., 1962)	По шкале CIMMYT	По (Мережко, 1999)	По шкале CIMMYT
Неэффективность 0	3–4, X+	90S-MS, 40-60MR, TS	1, 3, 5	20–80 %
Эффективность 1	1–2	30MR-5R, TR, 0	7, 9	10 %

проявляли высокий уровень устойчивости к нескольким заболеваниям, при этом положительного сигнала ни с одним из маркеров к изучаемым генам не было выявлено, являются основанием для дальнейшего поиска в данном образце других эффективных генов.

В результате оценки устойчивости генотипов пшеницы в условиях фитопатогенного комплекса лесостепи Приобья Новосибирской области выявлена эффективность групп генов *Lr19/Sr25*, *Lr26/Sr31/Pm8*, *Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2*, *Lr7Asp/Sr7Asp/Pm7Asp*. Неэффективными являются гены *Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)*, *Lr16/Sr23*, *Lr37/Sr38*, что показывает сопоставление данных полевого об-

следования большинства генотипов, несущих изучаемые гены (табл. 2).

Мы предполагаем для сорта Экада 85 наличие других генов устойчивости к ржавчинным болезням и мучнистой росе, которые подлежат выяснению.

Селекция на иммунитет – сложная проблема не только в России, но и в других странах мира, так как вновь создаваемые сорта быстро теряют устойчивость вследствие появления новых вирулентных рас патогена. В связи с этим приобретают экономическое значение создание сортов с длительной устойчивостью, а также пирамидирование нескольких генов устойчивости к комплексу патогенов в

**Таблица 2.** Постулирование эффективности генов устойчивости к листовым болезням у линий и сортов яровой мягкой пшеницы в Новосибирской области

Сортообразец/линия	Идентифицируемая группа генов	Условное обозначение эффективности			Детекция молекулярным маркером	Постулирование эффективности гена или группы сцепления
		к бурой ржавчине	к стеблевой ржавчине	к мучнистой росе		
Чернява 13	Восприимчивый контроль	0	0	0		
Lutestsens 54-04-17	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Lutestsens 220-03-45	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Estivum 851	<i>Lr19/Sr25</i>	1	1		+	+
Lutestsens 307-97-7	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Lutestsens 363-96-4	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Lutestsens 532-00-13	<i>Lr26/Sr31/Pm8</i>	1	1	1	+	+
Sr24(Agent)9*LMPG	<i>Lr24/Sr24</i>	1	1		+	+
Линия <i>TcLr16</i>	<i>Lr16/Sr23</i>	0	0	–	+	–
Линия <i>TcLr37</i>	<i>Lr37/Sr38</i>	0	0	–	+	–
Экада 146	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Экада 121	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
FKP 109/7	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Экада 85	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	1	1	1	+	*
Фитон 41	<i>Lr34(=Sr57/Yr18/Pm38)</i>	0	0	0	+	–
Тулайковская 10	<i>Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2</i>	1	1	1	+	+
Тулайковская золотистая	<i>Lr6Ai#2/Sr6Ai#2/Pm6Ai#2</i>	1	1	1	+	+
11-8	<i>LrAsp7/SrAsp7/PmAsp7</i>	1	1	1	+	+

\* Объяснение решения по гену *Lr34/Sr57/Pm38* у сорта Экада 85 приведено в тексте.

одном генотипе. Удовлетворительный результат отбора исходного материала для селекции на иммунитет возможно получить только путем совмещения классических и современных методов селекции. Маркер-ориентированная селекция уже зарекомендовала себя как гарантированно быстрый подход создания новых линий и сортов пшеницы (Салина, 2016). Маркерный анализ является обязательной процедурой изложенного в статье методического подхода, в связи с чем постулирование эффективности генов устойчивости в сортах и линиях пшеницы становится возможным при значительной экономии времени и ресурсов. Форма модифицированной нами ПЦР-системы экономит время пробоподготовки и снижает вероятность контаминации за счет минимизированного числа шагов пипетирования, поэтому доступна даже для неспециализированных генетических лабораторий. Представленный в настоящей статье методический подход может быть использован для идентификации тесно сцепленных групп генов, обеспечивающих устойчивость к нескольким видам патогена с целью верификации коллекций пшеницы, а также проведения маркер-ориентированной селекции.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (соглашение № 14.604.21.0106 от 07.07.2014, идентификационный номер RFMEFI60414 X0106).

Авторы благодарят Е.И. Гульгяеву за конструктивное обсуждение предлагаемых подходов, проф. Б. МакКаллума (B. McCallum, Канада), проф. А. Бёрнера (A. Voerner, Германия) и CIMMYT (Мексика) за предоставление изогенных линий.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Белан И.А., Россеева Л.П., Россеев В.М., Бадаева Е.Д., Зеленский Ю.И., Блохина Н.П., Шепелев С.С., Першина Л.А. Изучение хозяйственно ценных и адаптивных признаков у линий сорта яровой мягкой пшеницы Омская 37, несущих транслокации 1RS.1BL и 7DL-7A1. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2012;16(1):178-186.
- Гешеле Э.Э. Основы фитопатологической оценки в селекции растений. М., 1978.
- Гульгяева Е.И., Садовая А.С., Шайдаюк Е.Л. Молекулярно-генетический скрининг новых российских сортов мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине. Вестн. защиты растений. 2014;1:26-29.
- Гульгяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Казарцев И.А., Аристова М.К. Структура российских популяций гриба *Puccinia triticina* Eriks. Вестн. защиты растений. 2015;3(85):5-10.
- Давоян Э.Р., Беспалова Л.А., Давоян Р.О., Зубанова Ю.С., Миков Д.С., Филобок В.А., Худокормова Ж.Н. Использование молекулярных маркеров в селекции пшеницы на устойчивость

- к бурой ржавчине в Краснодарском НИИСХ им. П.П. Лукьяненко. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4/1): 732-738.
- Коваленко Е.Д., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Жемчужина А.И., Смирнова Л.А., Щербик А.А. Методы оценки и отбора исходного материала при создании сортов пшеницы, устойчивых к бурой ржавчине. Методические рекомендации ВНИИФ. М., 2012.
- Койшыбаев М., Шаманин В.П., Моргунов А.И. Скрининг пшеницы на устойчивость к основным болезням: методические указания. Анкара, 2014.
- Леонова И.Н. Молекулярные маркеры: использование в селекции зерновых культур для идентификации, интрогрессии и пирамидирования генов. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2013;17(2):314-325.
- Мережко А.Ф. Пополнение, сохранение в живом виде и изучение мировой коллекции пшеницы, эгилопса и тритикале (методические указания). СПб.: ВИР, 1999.
- Садовая А.А., Гулягьева Е.И., Митрофанова О.П., Шайдаюк Е.Л., Хакимова А.Г., Зуев Е.В. Характеристика устойчивости к возбудителю бурой ржавчины сортов и линий мягкой пшеницы из коллекции ВИР, несущих чужеродный генетический материал. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014;18(4/1): 739-750.
- Салина Е.А. Технология геномного моделирования и редактирования для решения задач селекции растений. Достижения науки и техники АПК. 2016;30(9):9-14.
- Салина Е.А., Леонова И.Н., Щербань А.Б., Стасюк А.И. Способ создания линий озимой мягкой пшеницы с комплексной устойчивостью к бурой и стеблевой ржавчине и мучнистой росе. Патент на изобретение № 2598275. Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН (РФ). Зарегистрирован 30.08.2016.
- Санин С.С., Соколова Е.А., Черкашин В.И., Назарова В.И., Стрижекозин Ю.А., Ибрагимов Т.З. Болезни зерновых колосовых культур (рекомендации по проведению фитосанитарного мониторинга). М., 2010.
- Санин С.С., Черкашин В.И., Назарова Л.Н. Фитосанитарная экспертиза зерновых культур (болезни растений): рекомендации. М., 2002.
- Сочалова Л.П., Лихенко И.Е. Изучение устойчивости пшеницы к листовым патогенам в условиях западной Сибири. Сиб. вестн. с.-х. науки. 2011;1:18-25.
- Dakouri A., McCallum B.D., Radovanovic N., Cloutier S. Molecular and phenotypic characterization of seedling and adult plant leaf rust resistance in a world wheat collection. Mol. Breed. 2013;32(3): 663-677.
- Gupta S.K., Charpe A., Prabhu K.W., Haque O.M.R. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. Theor. Appl. Genet. 2006;113:1027-1036.
- Helguera M., Khan I.A., Kolmer J., Lijavetzky D., Zhong-Qi L., Dubcovsky J. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines. Crop Sci. 2003;43:1839-1847.
- Kassa M.T., You F.M., Hiebert C.W., Pozniak C.J., Fobert P.R., Sharpe A.G., Menzies J.G., Humphreys D.G., Rezac H.R., Fellers J.P., McCallum B.D., McCartney C.A. Highly predictive SNP markers for efficient selection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr16*. BMC Plant Biol. 2017;17(1):45.
- Krattinger S.G., Sucher J., Selter L.L., Chauhan H., Zhou B., Tang M., Upadhyaya N.M., Mieulet D., Guiderdoni E., Weidenbach D., Schaffrath U., Lagudah E.S., Keller B. The wheat durable, multipathogen resistance gene *Lr34* confers partial blast resistance in rice. Plant Biotechnol. J. 2016;14:1261-1268.
- Lagudah E.S., Krattinger S.G., Herrera-Foessel S., Singh R.P., Huerta-Espino J., Spielmeyer W., Brown-Guedira G., Selter L.L., Keller B. Gene-specific markers for the wheat gene *Lr34/Yr18/Pm38* which confers resistance to multiple fungal pathogens. Theor. Appl. Genet. 2009;119(5):889-898.
- Long D.L., Kolmer J.A. A North American system nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1989;79:525-529.
- 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 of wheat stem rust resistance gene *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm. Theor. Appl. Genet. 2005;111:496-504.
- McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. Wheat Rust: an Atlas of Resistance Genes. Australia. Melbourne: CSIRO Publishing, 1995.
- Mesterházy A., Bartoš P., Goyeau H., Niks R., Csösz M. European virulence survey for leaf rust in wheat. Agronomie. 2000;20(7): 793-804.
- Petrash N.V., Leonova I.N., Adonina I.G., Salina E.A. Effect of translocations from *Aegilops speltoides* Tausch. on resistance to fungal diseases and productivity in common wheat. Rus. J. Genet. 2016; 52(12):1253-1262.
- Plaschke J., Ganai M.W., Röder M.S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. Theor. Appl. Genet. 1995;91:1001-1007.
- Prabhu K.V., Gupta S.K., Charpe A., Koul S. SCAR marker tagged to the alien leaf rust resistance gene *Lr19* uniquely marking the *Agropyron elongatum*-derived gene *Lr24* in wheat: a revision. Plant Breeding. 2004;123:417-420.
- Prins R., Groenewald J.Z., Marais G.F., Snape J.W., Köbner R.M.D. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theor. Appl. Genet. 2001;103:618-624.
- Roelfs A.P., Martens J.W. An international system of nomenclature for *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Phytopathology. 1988;78:526-531.
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganai M.W. A microsatellite map of wheat. Genetics. 1998; 149:2007-2023.
- Salina E.A., Adonina I.G., Badaeva E.D., Kroupin P.Yu., Stasyuk A.I., Leonova I.N., Shishkina A.A., Divashuk M.G., Starikova E.V., Khuat Thi Mai L., Syukov V.V., Karlov G.I. A *Thinopyrum intermedium* chromosome in bread wheat cultivars as a source of genes conferring resistance to fungal diseases. Euphytica. 2015;204:91-101.
- Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgounov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. Euphytica. 2016;212(2): 287-296.
- Stakman E.C., Stewart D.M., Loegerin W.Q. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. U.S.D.A. Agric. Res. Serv. No. E 617 (Rev.), 1962.
- Stepien L., Golka L., Chelkowski J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources. J. Appl. Genet. 2003;44(2):139-149.
- Weng Y., Azhaguvel P., Devkota R.N., Rudd J.C. PCR-based markers for detection of different sources of 1AL.1RS and 1BL.1RS wheat-rye translocations in wheat background. Plant Breeding. 2007;26: 482-486.