

ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ЯРОВОЙ ТРИТИКАЛЕ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К БУРОЙ И СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНАМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АЛЛЕЛЬ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

Р.С. ЕРЖЕБАЕВА, Т.А. БАЗЫЛОВА, Д.И. БАБИСЕКОВА,
А.А. АМАНГЕЛДИЕВА, Д.Г. ТАДЖИБАЕВ, А. ЫДЫРЫС

Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства, 040909,
Республика Казахстан, Алматинская область, п. Алмалыбак, ул. Ерлепесова, 1

E-mail: raushan_2008@mail.ru

Создание и использование устойчивых к ржавчине сортов является наиболее экологичным и эффективным способом защиты посевов пшеницы и тритикале. Для успешной селекции яровой тритикале на устойчивость к ржавчине необходимо иметь генетический материал с эффективными генами. С целью выявления носителей генов устойчивости к бурой и стеблевой ржавчинам была изучена коллекция яровой тритикале (86 образцов) с использованием молекулярных маркеров и методов фитопатологии. На искусственном инфекционном фоне 81 % коллекционных образцов яровой тритикале показали высокую устойчивость (OR) к популяции стеблевой ржавчины. Выделены 19 образцов, показавших устойчивость (0–5 %R) к популяции бурой ржавчины. Идентификация коллекции с использованием ДНК-маркеров позволила выделить образцы с геном Sr2 (19 образцов), Sr22 (9 образцов) и Lr28 (14 образцов). Среди коллекции не обнаружены носители генов Lr9 и Lr35/Sr39. Образцы с эффективными генами Sr2 и Sr22 были включены в скрещивания для создания устойчивых к стеблевой ржавчине отечественных сортов.

Ключевые слова: яровая тритикале, коллекция, сорт, ржавчина, устойчивость, ген, молекулярный маркер.

Введение. Тритикале – это зерновая культура, адаптированная к менее благоприятным почвенным условиям возделывания. Тритикале используется для производства фуражного и продовольственного зерна и как источник технического биоэтанола. Интерес к культуре тритикале в мире возрастает. Мировое производство тритикале составило в 2018 г. 12,8 млн. тонн, а площадь возделывания 3,8 млн. га (данные ФАО <http://www.fao.org/faostat>). В Казахстане использование яровой тритикале имеет перс-

пективы для стабилизации валового сбора производимого зерна. На юге и юго-востоке Казахстана она может быть использована как страховая культура при пересеве озимых колосовых в годы с неблагоприятной перезимовкой.

Тритикале является гибридом пшеницы и ржи и в связи с этим обладает высокой устойчивостью к болезням, полученной как от пшеницы, так и от ржи [1]. Устойчивость к болезням особенно важна для сельского хозяйства, где использование пестицидов ограничено или вообще не используется (органическое земледелие). Проблема возрастающей угрозы поражения посевов пшеницы и тритикале ржавчиной отмечается многими исследователями [2, 3]. В Казахстане как зерносеющей стране, систематически отмечаются эпидемии стеблевой и бурой ржавчин [4–6]. Создание и использование устойчивых к ржавчине сортов является наиболее экологичным и эффективным способом защиты зерновых посевов.

Поиск новых генов устойчивости к возбудителям ржавчины пшеницы, тритикале – важная задача, стоящая перед селекционерами во всем мире. Источником этих генов служат близкородственные виды пшеницы, которые в последние десятилетия активно используются в селекции. В пополнении рабочей коллекции и генофонда Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР) новыми сортами и линиями тритикале, полученными с участием различных видов диких сородичей, большой вклад внес СИММИТ – международный центр по улучшению пшеницы и кукурузы. Для создания отечественных сортов яровой тритикале, устойчивых к ржавчине в настоящее время актуальным является выделение носителей эффективных генов ус-

тойчивости к ржавчине среди рабочей коллекции и вовлечение их практическую селекцию.

Цель исследования. Оценка рабочей коллекции яровой тритикале по устойчивости к бурой и стеблевой ржавчине с использованием фитопатологических и молекулярных маркеров.

Материалы и методы. Опыты по фитопатологической оценке коллекции яровой тритикале на устойчивость к бурой и стеблевой ржавчинам проведены в период 2018–2019 гг. на инфекционном и естественном фонах научных полевых стационаров КазНИИЗиР. Стационары находятся в предгорной зоне Алматинской области (43° с.ш., 77° в.д., 740 м над уровнем моря). По данным метеостанции КазНИИЗиР за вегетационный период яровой тритикале (апрель–июль месяцы) выпало в 2018 г. 267,5 мм, в 2019 г. 320,7 мм осадков при среднемноголетнем значении для этого периода 198,6 мм. Максимальное количество осадков пришлось на апрель–май (81,6–124,9 мм) в 2018 г. и 2019 г. на апрель месяц (183 мм).

Материалом исследований служила рабочая коллекция сортов яровой тритикале КазНИИЗиР – 86 образцов. Коллекция состояла из сортов и линий, полученных из мировой коллекции Международного центра улучшения кукурузы и пшеницы CIMMYT (Турция, Мексика) и в результате обмена генетическим материалом с Институтом растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН (Украина) и Донской зональной НИИ сельского хозяйства (Россия).

В качестве положительных контролей для ПЦР – идентификации использованы изогенные линии пшеницы с генами *Lr9*, *L28*, *Lr35/Sr39*, *Sr2*, *Sr22*, полученные из отдела генофонда полевых культур и защиты растений КазНИИЗиР (материал СИММИТ).

Инокулюм в вакуумных ампулах со спорами вирулентной популяции бурой и стеблевой ржавчины для юга и юго-востока Казахстана был получен из Научно – исследовательского института проблем биологической безопасности (г. Отар, РК).

Оценку устойчивости взрослых растений коллекции яровой тритикале проводили на искусственном инфекционном фоне. Инфекционный фон был создан с использованием инокулюма популяции бурой и стеблевой ржавчин. Активизация спор ржавчины проведена путем

прогревания их в чашках Петри в термостате при температуре 40 °С в течение 30 мин и инкубации во влажной камере эксикатора в течение 6 ч. Перед инокуляцией инокулюм смешивали с тальком в соотношении 1 : 100. После предварительного опрыскивания посевов водой, готовую смесь наносили на растения яровой тритикале в фазу трубкования. Инокуляция растений проведена в безветренную погоду в конце дня. Инфекционная нагрузка составляла 20 мг жизнеспособных уредоспор на 1 м² площади посева.

Учет осуществляли с момента проявления болезни, каждые 10 сут до фазы молочно-восковой спелости зерна.

Оценка типа реакции растений на устойчивость к возбудителю стеблевой ржавчины оценивали по шкале Стэкмана и Левина [7], листовой по шкале Майнса и Джексона [8]. Степень поражения оценивали в процентах по шкале Петерсона [9].

В качестве стандартов были использованы восприимчивые сорта пшеницы Саратовская 29 и Могоссо.

Выделение геномной ДНК проводили из второго листа 11–12-дневных проростков тритикале с использованием методики *DeLaporta* [10].

Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР-анализ проводили в амплификаторе «Eppendorf Mastercycler pro» (Германия). В работе использовали молекулярные маркеры к 6 *Lr* и *Sr* – генам [11–20].

В табл. 1S (<http://cytgen.com/articles/5460054s.pdf>) представлены данные по происхождению *Lr*- и *Sr*-генов, перечень праймеров и условия проведения ПЦР, которые были использованы для идентификации в сортах и линиях тритикале.

Реакционная среда для ПЦР-амплификации состояла из: 2 мкл (50 нг) исследуемой ДНК, 2 мкл реакционный буфер (10 × *TagBuffer*), 1 мкл dNTP (4 ммоль) смесь четырех dNTP («Thermo Scientific», США), 250 мкмоль каждого из двух праймеров («Sigma *Life Science*», Австралия, ООО «Биосан», Россия), 2 мкл (25 ммоль) MgCl₂, 0,5 мкл (5 ед.активности/мкл) *Taq*-полимеразы (ООО «Биосан», Россия), 10,5 мкл вода стерильная, свободная от нуклеазы (Biotechnology Grade).

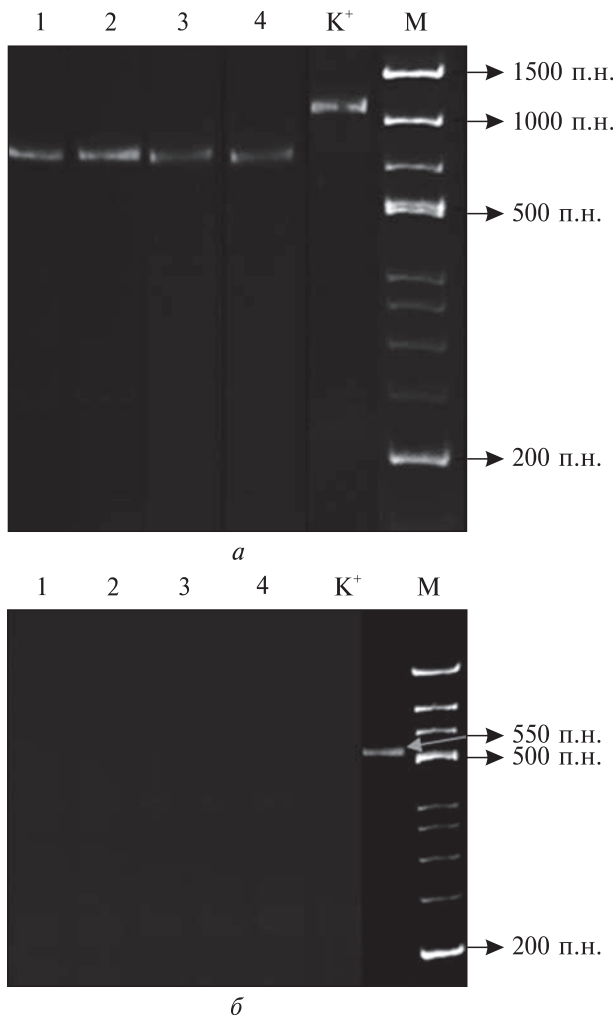


Рис. 1. Продукты амплификации ДНК образцов тритикале с использованием маркеров, сцепленных с геном *Lr9*: *а* – маркер *J13*: М-маркер 1500 п.н. (Step 50), 1 – Дуплет, 2 – Хайкар, 3 – Рубик, 4 – Русло, 5 – K⁺ положительный контроль (Phyton *Lr9*); *б* – маркер *SCS5*: М-маркер 1500 п.н. (Step 50), 1 – Хайкар, 2 – Лэгинь харкивс'кий, 3 – Passi Nimir, 4 – Рубик, 5 – Виктория, 6 – K⁺ положительный контроль (Phyton *Lr9*)

Рестрикционный анализ продуктов амплификации маркера *csSr2* проведен в объеме 31 мкл, включающей 10 мкл продукта ПЦР, 2 мкл 10 × Buffer 0, 18 мкл очищенной воды, свободной от нуклеаз (Biotechnology Grade), 1 мкл рестриктазы *PagI* (*Vsp*NI), 10 U/мкл («Thermo Scientific», США). Пробирки с готовой смесью инкубировали при 37 °С в течение 4 ч.

Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5–2%-ных агарозных гелях («Sigma Life Science», США), а так же в 8%-ном акриладмидном геле («Sigma Life Science», Китай) окрашенных бромистым этидием. Визуализацию продуктов амплификации проводили в гельдокументирующей камере (QUANTUMST 4, Франция). В качестве маркеров молекулярных весов использовали ДНК маркер «Step50» plus, ДНК маркер «Step100» (ООО «Биолаб-микс», Россия), ДНК маркер 10–300 п.н. O'GeneRuler Ultra Low Rang («Thermo Scientific», США).

Статистическая обработка выполнена в программной среде R (R version 3.6.1 (2019-07-05) «Action of the Toes») с открытым исходным кодом. Проведен стандартный непараметрический тест Хи-квадрат (*chisq.test*) из встроенного пакета {stats}, позволяющий выявлять зависимость частоты исходов от фактора.

Результаты исследований. В целях идентификации у 86 коллекционных образцов яровой тритикале эффективных генов против бурой и стеблевой ржавчин проведен молекулярный анализ с использованием метода ПЦР на обнаружение *Lr*- и *Sr*-генов (*Lr9*, *Lr28*, *Lr35/Sr39*, *Sr2*, *Sr22*).

ПЦР – анализ по выявлению носителей гена *Lr9* в коллекционных образцах был проведен с использованием двух маркеров *J13* [11] и *SCS5* [12]. Анализ с маркером *J13* показал, что амплификация ожидаемого фрагмента с длиной 1100 п.н. зафиксирована только у положительного контроля *Phyton Lr9*. У изогенной линии *Transfer/6*TC* (RL6010), используемой в качестве второго положительного контроля и 51 образцов из 86 отмечена амплификация фрагмента длиной 800 п.н. (рис. 1).

По результатам ПЦР – анализа с маркером *SCS5* амплификация фрагмента длиной 550 п.н. зафиксирована так же, только у положительных контролей (табл. 2S, <http://cytgen.com/articles/5460054s.pdf>).

Для идентификации носителей гена *Lr28*, гена устойчивости к бурой ржавчине использован *STS*-маркер *Lr28-01* [13] и *SCAR*-маркер *SCS421* [14], тесно сцепленные с *Lr28*. Положительным контролем служила линия *CS2D-2M*. Проведение ПЦР – анализа с использованием

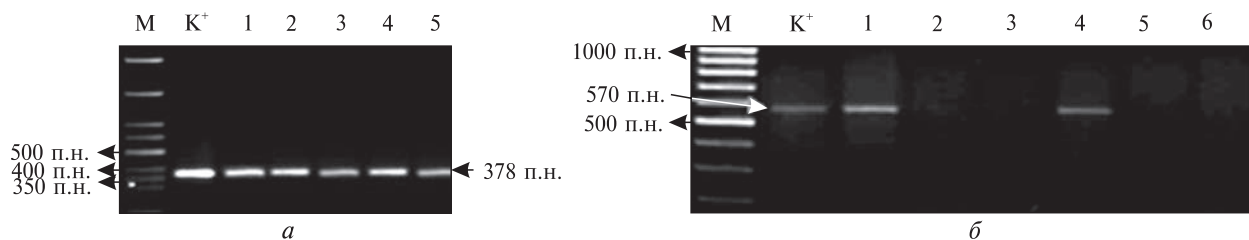


Рис. 2. Продукты амплификации ДНК образцов яровой тритикале с использованием маркеров, сцепленных с геном *Lr28*. *a* – маркер *Lr28-01*: М-маркер 1500 п.н. (50 step), K^+ положительный контроль (CS2D-2M), 1 – коровой харківський, 2 – № 7 (Ровня × Лотос), 3 – Виктория, 4 – Muiz, 5 – Л2226; *б* – маркер *SCS421*: М-маркер 1000 п.н. (100 step), K^+ положительный контроль (CS2D-2M), 1 – Хайкар, 2 – Passi 4/NIMIR, 3 – Рубик, 4 – Лэгинь харківський, 5 – Русло, 6 – Праг 501

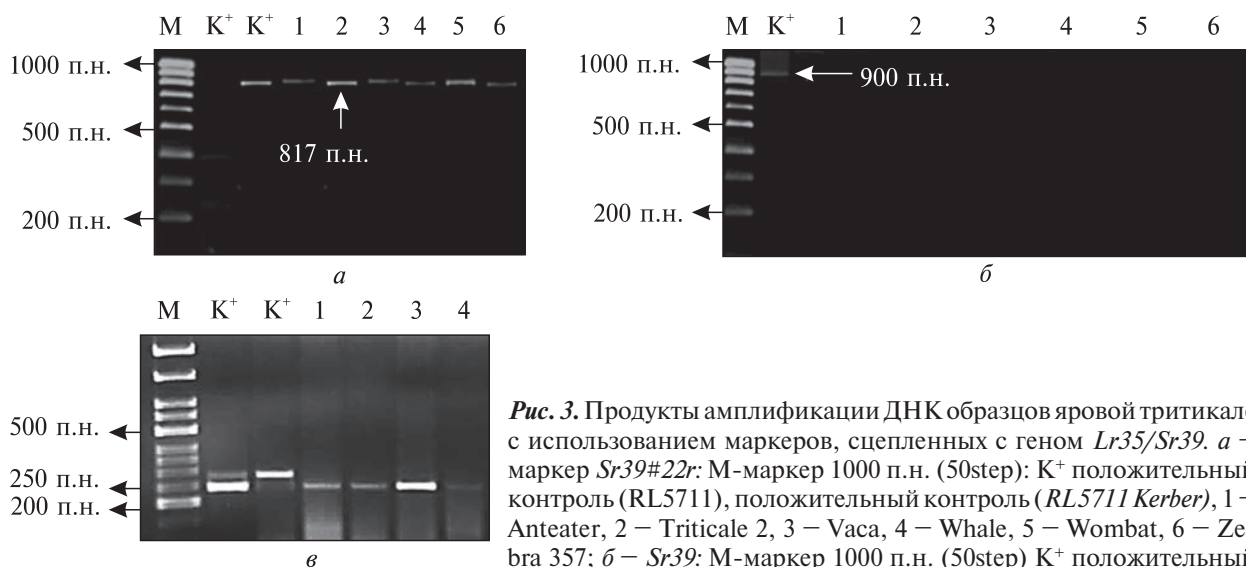


Рис. 3. Продукты амплификации ДНК образцов яровой тритикале с использованием маркеров, сцепленных с геном *Lr35/Sr39*. *a* – маркер *Sr39#22r*: М-маркер 1000 п.н. (50step): K^+ положительный контроль (RL5711), положительный контроль (RL5711 Kerber), 1 – Anteater, 2 – Triticale 2, 3 – Vaca, 4 – Whale, 5 – Wombat, 6 – Zebra 357; *б* – *Sr39*: М-маркер 1000 п.н. (50step) K^+ положительный контроль (RL5711), положительный контроль (RL5711 Kerber), 1 – Addax, 2 – Anteater, 3 – Vacum, 4 – Lobo, 5 – Badger, 6 – Bronco 90, *в* – *Sr39#50s*: М-маркер 1500 п.н. (50step), 1. K^+ положительный контроль (RL5711), положительный контроль (RL5711 Kerber), 1 – Укро, 2 – Dahbi/3/Fahad8-2*2// PTP, 3 – MX107, 4 – Дулет

маркера *Lr28-01* показало, что у всех изучаемых образцов присутствует характерный фрагмент размером 378 п.н. (рис. 2 и табл. 2S).

Анализ 86 образцов коллекции со вторым маркером *SCS421* позволил выделить 14 образцов (Хайкар, Саур, Лэгинь харківський, Рубик, MX58, MX 101, Fahad 8-2*2// PTP U 3878, AC Cetra, Tiga, Coorong, Darbo, WANAD, Pollmer 2.1.1., Mieszko) у которых была зафиксирована амплификация фрагмента 570 п.н. (рис. 2, б).

Для достоверного детектирования наличия генов *Lr35/Sr39* в генотипах яровой тритикале проведен ПЦР – анализ с использованием 4 маркеров – *Sr39#22r* [15], *Sr39#50s* [15],

BE500705 (маркер на отсутствие гена) [15], *Sr39* [16]. В качестве положительных контролей использованы изогенные линии пшеницы – RL5711 (с геном *Lr35*) и RL5711 Kerber (с геном *Sr39*).

Анализ с использованием доминантного STS маркера *Sr39#22r* показал, что у 59 испытываемых генотипов тритикале амплифицировался ожидаемый фрагмент размером 817 п.н. [15] (рис. 3, а).

STS маркер *Sr39#50s* является доминантным маркером, который детектирует единичный locus в 167 п.н. в восприимчивых линиях и две полосы в гомозиготных резистентных линиях. В гетерозиготных рекомбинантных растениях

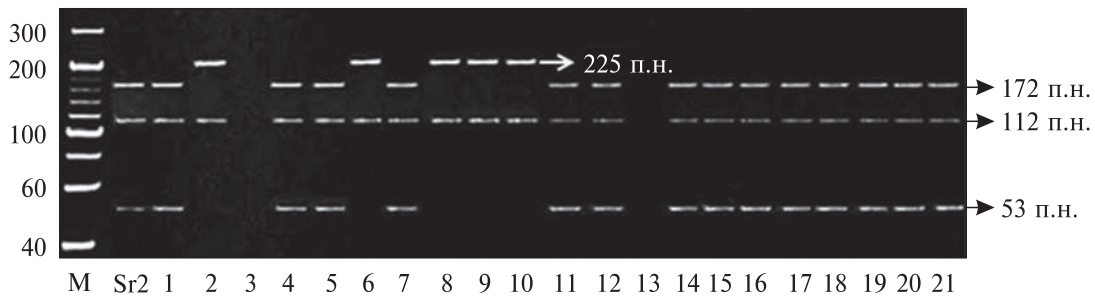


Рис. 4. Продукты амплификации ДНК образцов яровой тритикале с маркером CsSr2, сцепленного с геном *Sr2* после рестрикционного анализа. М – маркер на 300 п.н., К+ положительный контроль (*Pavon 76*), 1 – Золотой гребешок, 2 – № 7, 3 – MX 58, 4 – Ardi 1/Торо 1419// Erizo, 5 – MX72, 6 – № 15, 7 – MX31, 8 – Соловей харкивский, 9 – Mieszko, 10 – Крупильское, 11 – Addax, 12 – Vacuum, 13 – Lobo, 14 – Bura, 15 – Caborca79, 16 – Cheetah, 17 – Currency, 18 – Esel, 19 – Gazelle, 20 – Tarasca87_1/Yogui_1, 21 – IA-T

должна амплифицироваться только нижняя полоса с размером 167 п.н. ПЦР – анализ с указанным маркером позволил идентифицировать двойную полосу с размерами фрагментов 250 и 285 п.н. только у двух положительных контролей. У всех изучаемых образцов яровой тритикале амплифицировался только фрагмент длиной 250 п.н. (рис. 3, в).

Идентификация генов *Lr35/Sr39* с использованием SCAR маркера *Sr39* амплифицировала фрагмент 900 п.н. только у ДНК устойчивой изогенной линии *RL5711 Kerber*.

Маркер EST BE500705 является доминантным маркером, который идентифицирует единую полосу длиной 166 п.п. (<https://maswheat>), также связанную с исходным сегментом пшеницы (восприимчивой аллелью), поэтому этот маркер используется для подтверждения отсутствия генов *Lr35/Sr39*. ПЦР анализ показал у всех диагностируемых 86 образцов присутствие фрагмента длиной 290 п.н., но не 166 п.н. По ряду авторов используется именно длина фрагмента 290 п.н., идентифицирующая отсутствие искомого аллеля [21].

Таким образом, на основании анализа с 4 маркерами сделан вывод об отсутствии искомым аллелей генов *Lr35/Sr39* в коллекционных образцах яровой тритикале.

Для ДНК – идентификации образцов тритикале по устойчивости к стеблевой ржавчине выбраны два эффективных *Sr* – генов: *Sr2*, *Sr22*, которые локализованы в геномах А и В и могут присутствовать в тритикале. Ген *Sr2* локализован в хромосоме 3BS и является геном

возрастной устойчивости широкого спектра. Ген *Sr22* локализован в хромосоме 7AL, источником гена является *T. monosocum*.

Для идентификации носителей гена *Sr2*, гена устойчивости к стеблевой ржавчине использован SSR – маркер gwm 533, тесно сцепленный с *Sr2* – геном [17]. В качестве положительного контроля была использована линия *Pavon 76*. Проведение ПЦР – анализа с использованием указанного маркера показало, что у 29 изучаемых образцов присутствует характерный фрагмент размером 120 п.н. (табл. 2). Для проверки достоверности результатов использован второй маркер CsSr2, который с высокой точностью позволяет идентифицировать три разных аллеля *Sr2* [18], рис. 4. Для детекции трех фрагментов (172, 112 и 53 п.н.), связанных с присутствием *Sr2* после амплификации проведено разрезание ферментом BspHI. Результаты показали, что три искомого фрагмента обнаружены у 19 образцов коллекции (№ 15, № 20, Золотой гребешок, U 3879, MX31, MX 72, Addax, Vacuum, Bura, Cheetah, Currency, Esel, Gazelle, Tarasca87_1/Yogui_1, IA-T, Yoco, Camel, Lince, Towan, Vaca).

У 5 образцов после рестрикционного анализа были зафиксированы два фрагмента (225 и 112 п.н.). По данным Mago R. [18] эта аллель связана с пшеницей, не содержащей *Sr2*, которые распространены в Северной Америке и CIMMYT.

С целью идентификации носителей гена *Sr22* проведен ПЦР – анализ с двумя маркерами – *CFA2019* [19] и *BARC121* [20]. В качестве по-

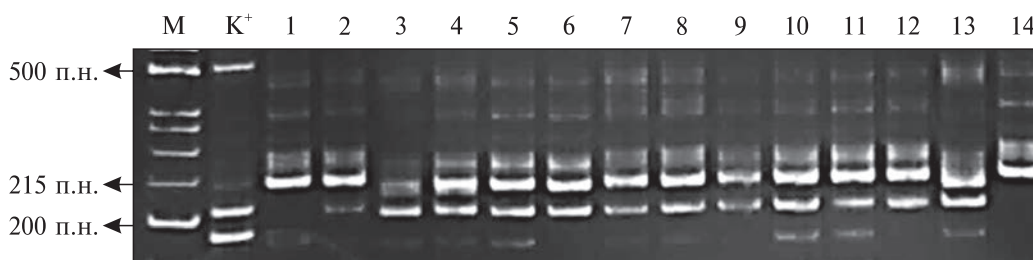


Рис. 5. Продукты амплификации ДНК образцов тритикале с использованием маркера *BARC121*, сцепленного с *Sr22*. М-маркер 1500 п.н. (50step), K⁺ положительный контроль (Mq*6//Stewart*3/RL 5244), 1 – Dakold 97, 2 – MX 101 Caniero/Zilo, 3 – Ardi 1/Торо 1419// Erizo, 4 – AC Cetra, 5 – Caborca 79, 6 – Праг 499, 7 – MX 72, 8 – Инесса, 9 – Л2118, 10 – Праг 503, 11 – Rapion, 12 – Л 5635, 13 – Tiga, 14 – MX 30

ложительного контроля была использована линия Mq*6//Stewart*3/RL 5244.

При использовании праймеров к локусу *Xcfa2019* амплифицировались фрагменты ДНК с размером 200, 235, 250 п.н. Фрагмент (235 п.н.), указывающий на присутствие гена *Sr22*, выявлен у 17 генотипов из 86 проанализированных (табл. 2S).

С использованием маркера *Xbarc121* установлено, что 20 образцов полностью повторяют гаплотип (197 и 215 п.н.) контрольной линии Mq*6//Stewart*3/RL 5244, содержащий ген *Sr22*. Ампликон размером 215 п.н., описанный Yu L-X. С соавт. [20] как диагностический фрагмент, наблюдался у 49 образцов яровой тритикале (рис. 5).

Совпадение по двум маркерам отмечено по сортам № 20, Ardi 1/Торо 1419// Erizo, AC Cetra, Caborca 79, MX-72, Праг 503, Реуга 5-1, Примэвара, Дуплет. 86 коллекционных образцов яро-

вой тритикале были изучены по устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине на искусственном инфекционном фоне КазНИИЗиР. По устойчивости к стеблевой ржавчине 81 % образцов коллекции показали устойчивость (оценка 0R). По устойчивости к бурой ржавчине 27 образцов показали среднюю устойчивость (MR) с процентом поражения 5–70 % и 20 образцов среднюю восприимчивость (MS) с процентом поражения от 5 до 70 %. Выделено 19 образцов с типом реакции R и процентом поражения 0–5 % (табл. 2S).

Для анализа влияния наличия эффективных генов на устойчивость сортообразцов коллекции к ржавчине на инфекционном фоне был использован статистический метод – Хи-квадрат, позволяющий выявлять зависимость частоты исходов от фактора, табл. 1. Были сопоставлены данные наличия гена и иммунологической оценки на инфекционном фоне.

Таблица 1. Результаты статистической обработки данных иммунологической оценки и ДНК-идентификации с использованием Хи-квадрата

Зависимость	Значение Хи-квадрат	Степень свободы	P-значение
<i>Стеблевая ржавчина</i>			
Влияние гена <i>Sr2</i> на тип реакции линий	5,6	3	0,128
Влияние гена <i>Sr2</i> на процент поражения линий	3,7	5	0,579
Влияние гена <i>Sr22</i> на тип реакции линий	3,9	3	0,271
Влияние гена <i>Sr22</i> на процент поражения линий	18,14	5	0,0027
<i>Бурая ржавчина</i>			
Влияние гена <i>Lr28</i> на тип реакции линий	10,3	3	0,015
Влияние гена <i>Lr28</i> на процент поражения линий	5,05	10	0,88

Исходя из результатов, мы можем сказать, что достоверная зависимость вклада гена на иммунитет растений наблюдается по гену *Sr22* (р-значение = 0,0027) и гену *Lr28* (р-значение = 0,015). В остальных случаях достоверность не превышает 0,05.

Обсуждение. По данным исследователей расспецифический ген *Lr9* является эффективным геном защищающим пшеницу от бурой ржавчины в Поволжье [22], а так же в Северо-Кавказском регионе, Центральной и Северо-Западной части России [23], однако ген потерял эффективность в условиях Новосибирской области [24]. По данным Гулятьевой Е.И. [25] сорта с геном *Lr9* в Государственном реестре РФ составляют 10 % общего числа яровых и 1 % озимых сортов пшеницы. В наших исследованиях по идентификации гена *Lr9* в коллекции яровой тритикале не обнаружены сорта, несущие этот ген. У изогенной линии *Transfer/6*TC* (RL6010) с геном *Lr9* и 40 образцов яровой тритикале с использованием маркера J13 была амплификация другого фрагмента 800 п.н., что так же зафиксировано в исследованиях Тырышкина Л. [26].

Один из эффективных источников *Lr*-генов является вид *Aegilops speltoides* Tausch. Описано шесть *Lr*-генов (*Lr28*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr66*), перенесенных в мягкую пшеницу от этого вида, и почти все они относятся к группе эффективных, защищающих растения пшеницы и тритикале от поражения бурой ржавчиной в различных регионах мира [14, 15, 27].

Ген *Lr 28* локализован на длинном плече хромосомы 4A [28]. Исследования Kumar A. с соавторами на почти изогенных линиях, несущих *Lr28* показали, что привнесение данного гена увеличивало массу 1000 зерен, и не оказало отрицательного влияния на урожайность и качество зерна [29]. По данным исследователей ген *Lr28* является эффективным геном против бурой ржавчины Казахстана и Сибири [30], однако присутствие гена *Lr28* не были обнаружены в 90 сортах мягкой пшеницы, допущенных к использованию в РФ в 2009–2011 гг. [17] и коллекции яровой тритикале [31]. В исследованиях Давоян Р.О. идентификация гена *Lr28* у 115 интрогрессивных линий, созданных с использованием *Aegilops speltoides* дала положительный результат только у синте-

тической формы Авродес и линии AD771 [32]. В исследованиях Гулятьевой Е.И. ген *Lr28* был зафиксирован только у линий *Ae. speltoides* из мировой коллекции ВИР с географическим происхождением Ирана, Турции и Израиля и *T. timopheevii* из Грузии [17]. В наших исследованиях по идентификации гена *Lr28* с использованием маркера STS-маркер *Lr28-01* [13] амплификация искомого фрагмента размером 378 п.н. зафиксирована у всех 86 образцов, что вызывает сомнение. Подобный факт наблюдался и в исследованиях иранских ученых [33]. В связи с этим, можно сделать вывод, что данный маркер не дает достоверной идентификации гена. Использование второго маркера SCAR-маркер SCS421 [14], позволило детектировать 14 образцов с фрагментом 570 п.н. У данных 14 образцов проявлялось стабильное воспроизведение указанного фрагмента, однако учитывая редкость данного гена среди сортов пшеницы и тритикале, для достоверного утверждения о сортах, как о носителях гена *Lr28* необходимы дополнительные исследования с маркером Xwmc 313 [34].

Ген *Lr35* локализован в длинном плече хромосомы 2B [28]. Образцы, несущие гены *Lr35/Sr39*, особо значимы для селекции, поскольку у них устойчивость к бурой ржавчине сочетается с устойчивостью к высокоагрессивной расе возбудителя стеблевой ржавчины U99. Использование данной транслокации в практической селекции является редким явлением, в связи с его отрицательным влиянием на другие хозяйственные признаки [15, 28]. Одним из основных работ по созданию линий с транслоцированным сегментом *Lr35/Sr39* является работа Mago R. [15]. Исследования коллекции коммерческих сортов мягкой пшеницы и тритикале РФ по наличию генов *Lr35/Sr39* не дали положительных результатов [17]. В наших исследованиях идентификация 86 сортов коллекции яровой тритикале генов *Lr35/Sr39* проведена с использованием 4-х маркеров. Детекция фрагментов связанных с указанными генами зафиксирована лишь по одному маркеру Sr39#22г. По остальным маркерам фрагменты не обнаружены. Результаты одного маркера являются не достаточными для заключения по наличию генов *Lr35/Sr39* в 59 образцах тритикале.

Гены *Sr2* и *Sr22* по данным российских ученых являются эффективными против расы Ug99 [35, 36]. *Sr2* является геном возрастной устойчивости (adult plant resistance). Известно, что наследование гена *Sr2* носит рецессивный характер, что усложняет отбор по фенотипу. Проявление устойчивости на взрослой стадии развития также способствует поздней идентификации носителей гена *Sr2*. В настоящее время *Sr2* широко используется в комбинациях с другими генами в селекционных программах на устойчивость ко всем вирулентным расам стеблевой ржавчины [37]. Исследования Кохметовой А.М., проведенные на селекционных линиях пшеницы, полученных из СИММИТ показали, что международная организация так же активно внедряет данный ген в практическую селекцию [38]. Идентификация рабочей коллекции яровой тритикале КазНИИЗиР позволила выделить 19 носителей гена *Sr2*, из них 79 % образцы из коллекции СИММИТ.

Ген *Sr22* был интродуцирован из *T. monosocum* L. ssp. *Aegilopoides* (синоним *T. boeoticum* Boiss.). Три тесно связанных молекулярных маркеров Xcfa2019, Xcfa2123 и Xbarc121 с диагностическими фрагментами 235, 245 и 215 п.н. соответственно, обычно используются для идентификации этого гена, расположенного на длинном плече хромосомы 7A пшеницы. С использованием маркера Xbarc121 амплифицировались фрагменты разных размеров, не только обозначенные как диагностические, что согласуется с данными российских ученых [35]. Установлено, что 20 образцов полностью повторяют гаплотип (197 и 215 п.н.) контрольной линии Mq*6//Stewart*3/RL 5244, содержащий ген *Sr22*. Ампликон размером 215 п.н., описанный Yu et al. [21] как диагностический фрагмент, наблюдался у 49 образцов яровой тритикале. При использовании маркера CFA2019 амплифицировались три фрагмента 200, 235 и 250 п.н. Амплификация диагностического фрагмента 235 п.н. наблюдалась у контрольной линии Mq*6//Stewart*3/RL 5244 и 17 образцах. На основании результатов – совпадений по двум маркерам можно предположить, что 9 сортов являются носителями гена *Sr22*.

Выводы. По результатам ДНК – идентификации 86 коллекционных образцов яровой

тритикале на наличие *Lr-* и *Sr-*генов (*Lr9*, *Lr28*, *Lr35/Sr39*, *Sr2*, *Sr22*) выделены: 19 образцов коллекции с геном *Sr2* (№ 15, № 20, Золотой гребешок, Ardi 1/Торо 1419// Erizo, MX31, MX 72, Addax, Bacum, Bura, Cheetah, Currency, Esel, Gazelle, Tarasca87_1/Yogui_1, IA-T, Yoco, Camel, Lince, Towan, Vaca); 9 образцов коллекции с геном *Sr22* (№ 20, Ardi 1/Торо 1419// Erizo, AC Cetra, Caborca 79, MX-72, Праг 503, Peura 5-1, Примэвара, Дуплет); 14 образцов коллекции с геном *Lr28* (Хайкар, Саур, Лэгинь Харьковский, Рубик, MX58, MX 101, Fahad 8-2*2// PTP U 3878, AC Cetra, Tiga, Coorong, Дагво, WANAD, Pollmer 2.1.1., Mieszko). Среди коллекции не обнаружены носители генов *Lr9* и *Lr35/Sr39*.

На основании изучения 86 коллекционных образцов яровой тритикале по устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине на искусственном инфекционном фоне выделено 19 устойчивых к двум видам ржавчины образцов с типом реакции R и процентом поражения 0–5 %.

Образцы с эффективными генами *Sr2*, *Sr22*, *Lr28* и высокой устойчивостью в полевых условиях могут быть использованы в селекции по созданию устойчивых к ржавчине сортов яровой тритикале.

Сопоставление данных наличия гена и иммунологической оценки на инфекционном фоне показали достоверную зависимость вклада гена на иммунитет растений по гену *Sr22* (р-значение = 0,0027) и гену *Lr28* (р-значение = 0,015).

Соответствие этическим стандартам. Доклинические и клинические исследования с привлечением людей и животных не проводились.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках финансирования Комитета науки МОН РК по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» проекту № AP05132430 «Внедрение ДНК – маркеров и андрогенной технологии в селекцию ярового тритикале».

STUDY OF A SPRING TRITICALE COLLECTION CONCERNING ITS RESISTANCE TO LEAF AND STEM RUSTS USING ALLELE-SPECIFIC MARKERS

R.S. Yerzhebayeva, T.A. Bazylova, D.I. Babissekova,

A.A. Amangeldiyeva, D. Tajibayev, A. Ydyrys

LLP «Kazakh Research Institute of Agriculture and Plant growing», 040909, Republic of Kazakhstan, Almaty Region, Almalyk v., Yerlepesov st., 1
E-mail: raushan_2008@mail.ru

Development and use of rust-resistant varieties is the most environmentally-friendly and effective way to protect wheat and triticale crops. To successfully select spring triticale for its rust resistance, it is necessary to have genetic material with effective genes. In order to identify carriers of leaf and stem rust resistance genes, a collection of spring triticale (86 samples) was studied using molecular markers and phytopathology methods. In artificial inoculation study, 81 % of samples in the spring triticale collection demonstrated high resistance (OR) to a stem rust population. 19 samples that showed resistance (0–5 %R) to the leaf rust population were selected. Identification of the collection using DNA markers made it possible to isolate samples with the Sr2 gene (19 samples), Sr22 (9 samples) and Lr28 (14 samples). No carriers of the Lr9 and Lr35 / Sr39 genes were found in the collection. Samples with effective Sr2 and Sr22 genes were included into crosses to create stem rust resistant domestic varieties.

ВИВЧЕННЯ КОЛЕКЦІЇ ЯРОГО ТРИТИКАЛЕ НА ОПІРНІСТЬ ДО БУРОЇ І СТЕБЛОВОЇ ІРЖІ З ВИКОРИСТАННЯМ АЛЕЛЬ-СПЕЦИФІЧНИХ МАРКЕРІВ

Створення і використання стійких до іржі сортів є найбільш екологічним і ефективним засобом захисту посівів пшениці і тритикале. Для успішної селекції ярої тритикале на стійкість до іржі необхідно мати генетичний матеріал з ефективними генами. З метою виявлення носіїв генів стійкості до бурї і стеблової іржі була вивчена колекція ярої тритикале (86 зразків) з використанням молекулярних маркерів і методів фітопатології. На штучному інфекційному фоні 81 % колекційні зразки ярої тритикале показали високу стійкість (OR) до популяції стеблового іржі. Виділено 19 зразків, що показали стійкість (0–5% R) до популяції бурї іржі. Ідентифікація колекції з використанням ДНК-маркерів дозволила ідентифікувати зразки з геном Sr 2 (19 зразків), Sr22 (9 зразків) і Lr28 (14 зразків). Серед колекції не виявлені носії генів Lr9 і Lr35/Sr39. Зразки з ефективними генами Sr2 і Sr22 були включені в схрещування для створення стійких до стеблової іржі вітчизняних сортів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Olivera, P.D., Pretorius, Z.A., Vadebo, A., and Jin, Y., Identification of Resistance to Races of Puccinia

graminis f. sp tritici with Broad Virulence in Triticale (×Triticosecale). *Plant disease*, 2013, vol. 97, no. 4, pp. 479–84. doi: 10.1094/PDIS-05-12-0459-RE.

2. Wojtowicz, A., Wojtowicz, M., Sigvald, R., Czernecki, B., Ratajkiewicz, H., Lacka, A., Zacharczuk, M., and Pasternak, M., Assessment of the impact of climate change on the latency period of leaf rust on triticale in Poland. *Acta Agric. Scand. Sect. B-Soil Plant Sci.* doi: 10.1080/09064710.2019.1696394.
3. Herrera-Foessel, S., Singh, P.K., Singh, S., and Govindan, V., The emergence of Ug99 races of the stem rust fungus is a threat to world wheat production. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2011, vol. 49, pp. 465–81. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095423.
4. Rsaliyev, A.S., Rsaliyev, S.S., Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust, *Vavilov. Zhurn. Genet. Select.*, 2018, vol. 22, no. 8, pp. 967–77. doi: 10.18699/VJ18.439.
5. Shamanin, V., Salina, E., Wanyera, R., Zelenskiy, Y., Olivera, P., and Morgounov, A., Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica*, 2016, vol. 212, no. 2, pp. 287–96. doi: 10.1007/s10681-016-1769-0.
6. Rsaliev, Sh.S., Koysybaev, M.K., Morgunov, A.I., and Kolmer, D., Analysis of the composition of the stem and leaf rust of wheat in Kazakhstan. In: *Modern Problems of Plant Protection and Quarantine: Collection of articles of the Int. scientific-practical conf. Almaty, 2005*, pp. 267–72. (in Russian)
7. Stakman, E.C., Stewart, D.M., and 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, 1962, 154 p.
8. Mains, E.B., Jackson, H.C., Physiologic specialization in the leaf rust of wheat *Puccinia tritici* Erikss, *Phytopath.* 1926, vol. 16, no. 1, pp. 89–120.
9. Peterson, R.F., Campbell, A.B., and Hannah, A.E., A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals, *Can. J. Res.*, 1948., vol. 26, no. 5, pp. 496–500.
10. Delaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B., A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1983, vol. 4, pp. 19–21.
11. Schachermayer, G., Siedler, H., and Gale, M.D., Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 1994, vol. 88, pp. 110–5. doi: 10.1007/BF00222402.
12. Gupta, S.K., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K.V., Haq, and Q.M., Development and validation of molecular markers linked to an *Aegilops umbellulata*-derived leaf-rust-resistance gene, *Lr9*, for marker-

- assisted selection in bread wheat, *Genome*, 2005, vol. 48, no. 5, pp. 823–30. doi: 10.1139/g05-051.
13. Naik, S., Gill, K.S., Rao, V.S., Gupta V.S., Tamhankar S.A., Pujar, S., Gill, B.S., and Ranjekar, P.K., Identification of a STS marker linked to an *Aegilops speltoides* – derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 1998, vol. 97, pp. 535–40.
 14. Cherukuri, D., Gupta, S., Charpe, A., Koul, S., Prabhu, K., Singh, R.B., and Singh Haq, Q.M., Molecular mapping of *Aegilops speltoides* derived leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat, *Euphytica*, 2005, vol. 143, pp. 19–26 doi: 10.1007/s10681-005-1680-6.
 15. Mago, R., Zhang, P., Bariana, H.S., Verlin D.C., Bansal U.K., Ellis J.G., and Dundas, I.S., Development of wheat lines carrying stem rust resistance gene *Sr39* with reduced *Aegilops speltoides* chromatin and simple PCR markers for marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 2009, vol.119, pp. 141–50. doi: 10.1007/s00122-009-1146-7.
 16. Gold, J., Harder, D., Townley Smith, F., Aung T., and Procinier, J., Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines, *Electron. J. Biotechnol.*, 1999, vol. 2, no. 1, pp. 35–40.
 17. Hayden, M.J., Kuchel, H., and 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, vol. 109, pp.1641–7. doi: 10.1007/s00122-004-1787.
 18. Mago, R., Brown-Guedira, G., Dreisigacker, S., Breten, J., Jin, Y., Singh, R., Appels, R., Lagudah, E.S., Ellis, J., and Spielmeyer, W., An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 2011, vol. 122, pp. 735–44. doi: 10.1007/s00122-010-1482-7.
 19. Khan, R.R., Bariana, H.S., Dholakia, B.B., Naik, S.V., Lagu, M.D. Rathjen, A.J., Bhavani, S., and Gupta, V.S., Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat, *Theor. Appl. Genet.* 2005, vol. 111, pp. 846–50. doi: 10.1007/s00122-005-0005-4.
 20. Yu, L-X, S. Liu, J. A., Anderson, R. P., Singh, Y., Jin, J., Dubcovsky, G., Brown-Guidera, S. Bhavani, A., Morgounov, Z., He, J., and Huerta-Espino, M.E., Sorrells Haplotype diversity of stem rust resistance loci in uncharacterized wheat lines. *Mol. Breed.*, 2010, vol. 26, pp. 667–80. doi: 10.1007/s11032-010-9403-7.
 21. Gulyaeva, E.I., Orina, A.S., Gannibal, Ph.B., Mitrofanova, O.P., Odintsova, I.G., and Laikova, L.I., The Effectiveness of Molecular Markers for the Identification of *Lr28*, *Lr35*, and *Lr47* Genes in Common Wheat. *Rus. J. Genet.*, 2014, vol. 50, no. 2, pp. 131–9. doi: 10.1134/S1022795414020069.
 22. Tyryshkin, L.G., Zakharov, V.G., and Syukov, V.V., Comparative characteristics of *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. syn.: *Puccinia triticina* Erikss. Virulence in the Middle Volga region, *Rus. J. Genet. Appl. Res.* 2014, vol. 4, pp. 583–6. doi: org/10.1134/S2079059714060203.
 23. Gulyaeva, E.I., Shaidayuk, E.L., Kazartsev, I.A., and Aristova, M.K., Structure of Russian populations of *Puccinia triticina*. *Plant Protec. News*, 2015, vol. 3, no. 85, pp. 5–10.
 24. Sochalova, L.P., Lihenko, I.E., Evaluation of resistance to brown rust of Ir-lines and varieties of wheat, isogenic in genes, under conditions of Novosibirsk region, 2016, *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, vol. 30, no. 3, pp. 46–9. (in Russian).
 25. Gulyaeva, E.I., Sadovaya, A.S., Breeding of wheat for resistance to brown rust in Russia, *Zashchita i karantin rasteniy*, 2014, no. 10, pp. 24–6. (in Russian).
 26. Tyryshkin, L.G., Gul'tyaeva, Alpat'eva, N.V., and Kramer, I., Identification of Effective Leaf-Rust Resistance Genes in Wheat (*Triticum aestivum*) Using STS Markers. *Rus. J. Genet.*, 2006, vol. 42, no. 6, pp. 662–6. doi: 10.1134/S1022795406060111.
 27. Helguera, M., Khan, I.A., and Dubcovsky, J., Development of PCR markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr47*, *Theor. Appl. Genet.*, 2000, vol. 101, pp. 625–631.
 28. McIntosh, R.A., Wellings, C.R., and Park, R.F., *Wheat Rusts: an Atlas of Resistance Genes*, Australia: CSIRO Publ., 1995.
 29. Kumar, A.A., Raghavaiah, P. Effect of the leaf rust resistance gene *Lr28* on grain yield and bread-making quality of wheat, *Plant Breed.*, 2008, vol. 123, no. 1, pp. 35–8. doi: 10.1046/j.1439-0523.2003.00937.x.
 30. Morgounov, A., Rosseeva, L., and Koyshibayev, M., Leaf rust of spring wheat in Northern Kazakhstan and Siberia: incidence, virulence, and breeding for resistance. *Austral. J. agric. Res.*, 2007, vol. 58, no. 9, pp. 847–53. doi: 10.1071/AR07086.
 31. Kroupin, P.Y., Gruzdev, I.V., Divashuk, M.G., Bazhenov, M.S., Kocheshkova, A.A., Chernook, A.G., Dudnikov, M.V., Karlov, G.I., and Soloviev, A.A., Analysis of Spring Triticale Collection for Leaf Rust Resistance Genes with PCR Markers, *Rus. J. Genet.*, 2019, vol. 55, no. 8, pp. 945–54. doi: 10.1134/S1022795419080088.
 32. Davoyan, R.O., Bebyakina, I.V., Davoyan, E.R., Mikov, D.S., Badaeva, E.D., Adonina, I.G., Salina, E.A., Zinchenco, A.N., and Zubanova, Y.S., Use of a synthetic form Avrodes for transfer of leaf rust resistance from *Aegilops speltoides* to common wheat.

- Vavilov. J. Genet. Breed.* 2017, vol. 21, no. 6, pp. 663–70. doi: 10.18699/VJ17.284 (in Russian).
33. Kadhodaie, M., Dadkhodaie, A., Assad, M.T., Heidari, B., and Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. Identification of the Leaf Rust Resistance genes *Lr9*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr34*, and *Lr35* in a Collection of Iranian Wheat Genotypes Using STS and SCAR Markers. *J. Crop Sci. Biotech.*, 2012, vol. 15, no. 4, pp. 267–74. doi: 10.1007/s12892-012-0035-9.
34. Bipinraj, A., Honrao, B., Prashar, M., Bhardwaj, S., Rao, S., and Tamhankar, Sh., Validation and identification of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr28* in wheat, *J. Appl. Genet.*, 2011, vol. 52, pp. 171–5. doi: 10.1007/s13353-010-0026-9.
35. Baranova, O.A., Lapochkina, I.F., Anisimova, A.V., Gajnullin, N.R., Iordanskaya, I.V., and Makarova, I.Yu., Identification of Sr Genes in New Common Wheat Sources of Resistance to Stem Rust Race Ug99 Using Molecular Markers, *Rus. J. Genet. Appl. Res.*, 2016, vol. 6, no. 3, pp. 344–50. doi: 10.1134/S2079059716030011.
36. Baranova, O.A., Lapochkina, I.F., Anisimova, A.V., Gajnullin, N.R., Iordanskaya, I.V., and Makarova, I.Yu., Identification of *Sr* genes in new common wheat sources of resistance to stem rust race Ug99 using molecular markers, *Vavilov. J. Genet. Breed.*, 2015, vol. 19, no 3, pp. 316–22. doi: 10.18699/VJ15.041 37(in Russian).
37. 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.* 2013, vol. 8, no. 50, pp. 6670–80. doi: 10.5897/AJAR2013.7257.
38. Kokhmetova, A.M., Atishova, M.N., Identification of stem rust resistance sources in wheat by using molecular markers, *Vavilov. J. Genet. Breed.*, 2012, vol. 16, no. 1, pp. 132–41. (in Russian).

Поступила в редакцию 13.06.20
После доработки 10.07.20
Принята к публикации 18.11.20