

УДК 632.938+[633.11:632.4]

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

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

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

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

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

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

Введение

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

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

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

Результаты

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

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

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

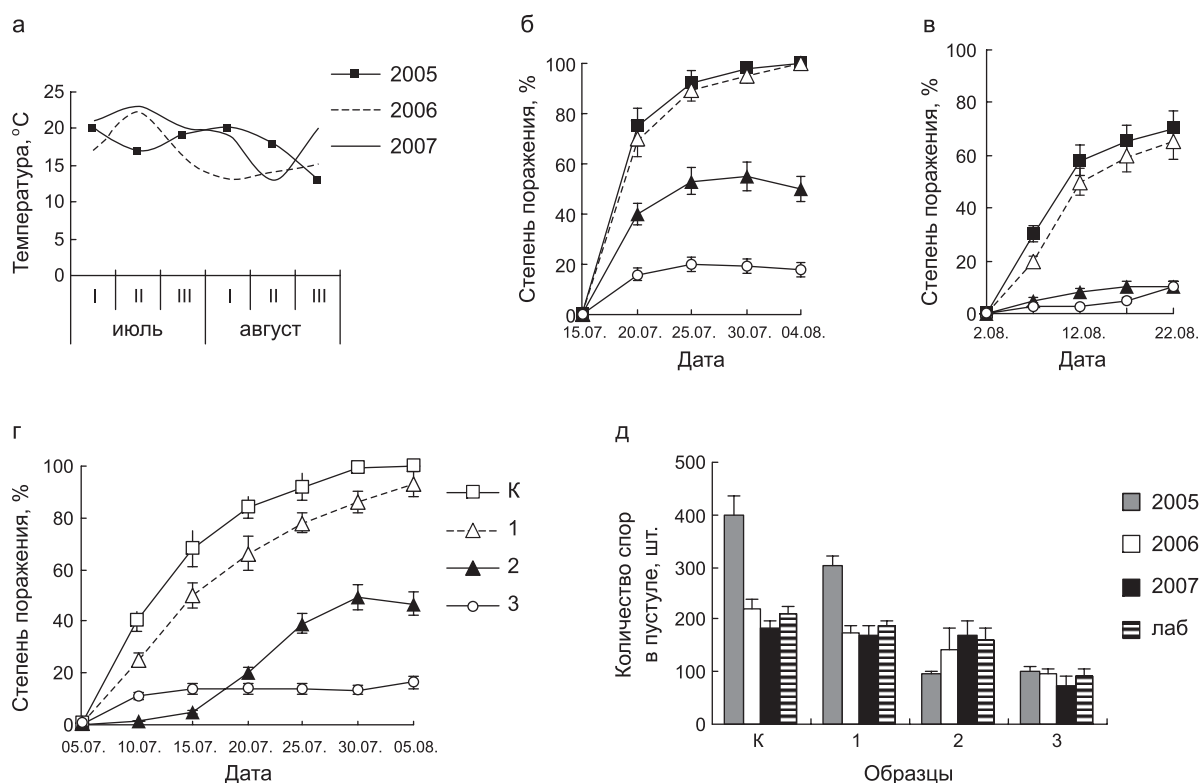


Рис. 1. Кривые развития бурой ржавчины и интенсивность образования спор в пестулах на сорте Тэтчер и его изогенных линиях с генами возрастной устойчивости в 2005–2007 гг.

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

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

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

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

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

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

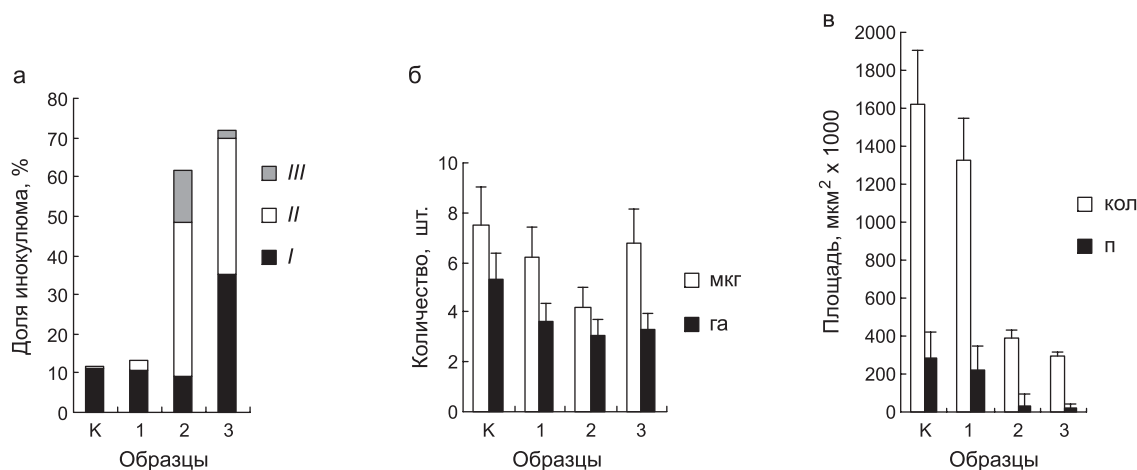


Рис. 2. Особенности взаимодействия *P. triticina* с сортом Тэтчер и изогенными линиями с генами возрастной устойчивости.

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

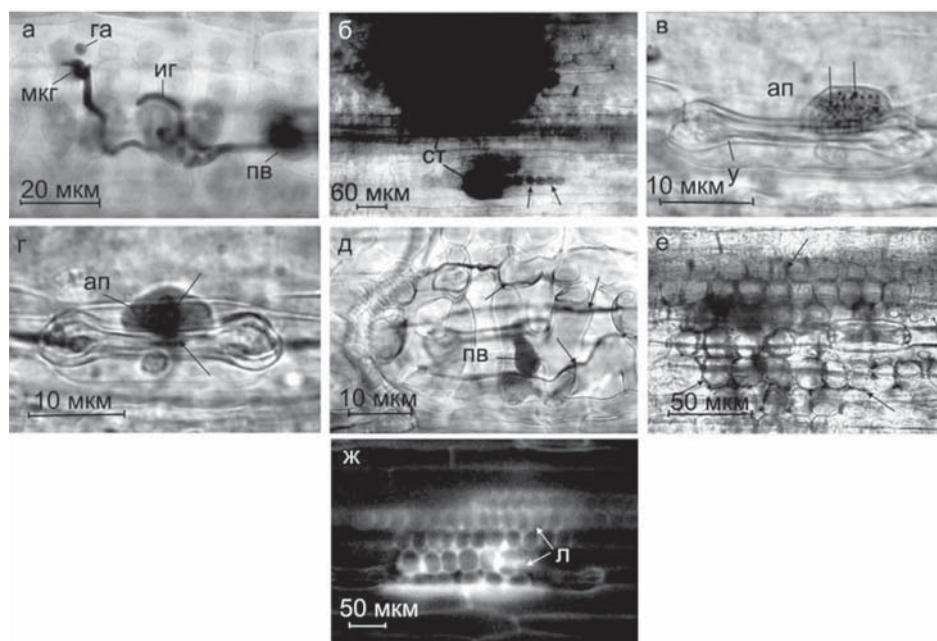


Рис. 3. Цитофизиологические особенности взаимодействия *P. tritricina* с линиями пшеницы, несущими гены возрастной устойчивости.

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

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

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

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

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

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

Обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Литература

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

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

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

L.Ya. Plotnikova, T.Yu. Shtubey

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

Summary

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

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