

УДК 633.11:632.4:575.22

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИСТОЧНИКОВ УСТОЙЧИВОСТИ К СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЕ ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ

© 2012 г. А.М. Кохметова, М.Н. Атишова

РГП Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Республика Казахстан,
e-mail: gen_kalma@yahoo.com

Поступила в редакцию 18 ноября 2011 г. Принята к публикации 19 декабря 2011 г.

Стеблевая ржавчина относится к наиболее вредоносным заболеваниям пшеницы. Вирулентная по отношению к большинству сортов пшеницы раса Ug99 возбудителя болезни *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* имеет патотипный состав TTKS. По прогнозам FAO, заболевание может распространиться на восток от Ирана во многих странах Средней Азии, включая Казахстан. Защиту от расы Ug99 обеспечивают гены *Sr2*, *Sr22*, *Sr24/Lr24* и *Sr46*. Для перспективной селекции пшеницы проведен скрининг образцов на присутствие эффективных генов устойчивости к стеблевой ржавчине. С использованием молекулярных маркеров ген *Sr2* идентифицирован у 12 образцов, *Sr24/Lr24* – у 7, *Sr46* – у 1, *Sr22* – у 6 линий. Полученные результаты используются в Казахстане для создания устойчивых к стеблевой ржавчине сортов пшеницы с применением MAS-селекции.

Ключевые слова: пшеница, гены устойчивости, стеблевая ржавчина, молекулярные маркеры.

Введение

По оценке экспертов Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (Food and Agriculture Organization – FAO), на рубеже последнего столетия потери пшеницы в мире от болезней достигли 33,5 млн т, что составляет около 10 % потенциального урожая этой важнейшей продовольственной культуры. Стеблевая ржавчина (возбудитель – гриб *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*) относится к наиболее вредоносным заболеваниям пшеницы. В истории земледелия известны эпифитотии, охватывавшие целые континенты, что приводило к катастрофическим потерям урожая (Pretorius *et al.*, 2000). В 1967 г. в северных областях Казахстана эпифитотия стеблевой ржавчины охватила свыше 5 млн га посевов. При этом поражаемость пшеницы достигла 70–90 %, а потери урожая превысили 50 % (Плахотник, 1969). После этого массовое развитие стеблевой ржавчины на посевах пшеницы в мире, включая Казахстан, отмечалось очень редко. Однако в 1999 г. в Уганде была обнаружена новая раса гриба с характеристикой патотипа TTKS,

получившая обозначение Ug99 (Jeffrey *et al.*, 2007). В следующем году она была обнаружена уже в Эфиопии и Кении (Pretorius *et al.*, 2007). Впоследствии из расы TTKS были выделены три разных изолята: TTKSK, TTKST и TTSSK, вирулентных к разным генам устойчивости (Jin *et al.*, 2008). Известно, что споры ржавчинных грибов воздушным путем могут переноситься на сверхдальние расстояния, иногда и через океаны. Раса Ug99 оказалась высоковирулентной, она поражает большую часть коммерческих сортов пшеницы. По сравнению с другими видами ржавчины (желтой и бурой), наносящими меньший урон, стеблевая ржавчина может привести к полной потере урожая.

В масштабах земного шара в текущее время под угрозой эпифитотии ржавчины находится 65 млн га сельскохозяйственных земель. Согласно некоторым прогнозам, распространение расы Ug99 может привести к потере двух третей урожая пшеницы в США и 80 % – в странах Азии и Африки (Jin *et al.*, 2008). Специалисты предупреждают о том, что заболевание может распространиться к востоку от Ирана во многих странах Средней Азии, в том числе в Казахста-

не. Гриб распространяется очень быстро и может нанести серьезный урон урожаю пшеницы в этих странах (Wanyera *et al.*, 2006). Это не может не вызывать тревогу в Казахстане, где пшеница – важная экономическая культура.

На севере и востоке Казахстана развитие стеблевой ржавчины происходит ежегодно. С 1990 по 1999 гг. в Северном Казахстане на яровой пшенице 6 раз наблюдали позднее проявление и слабое развитие стеблевой ржавчины (Койшибаев и др., 1999). В Костанайской и Северо-Казахстанской областях в 2006–2007 гг. отмечалось поражение посевов в пределах 20–40 %, а в других областях – 80–100 %. Отмечено, что казахстанская популяция стеблевой ржавчины 2006–2007 гг. включала высоковирулентные патотипы (TFK/R, TKT/C, TPS/H, TKN/RS, TDT/HS и TTH/KQ), некоторые из них поражают все изученные изогенные *Sr*-линии и по номенклатурному индексу сходны с патотипом из Африки Ug99 (ТТКС) (Рсалиев, 2008). Представительством Международного центра по улучшению пшеницы и кукурузы (International Maize and Wheat Improvement Center – CIMMYT) в Казахстане (СИММИТ) совместно с учреждениями-участниками сети КАСИБ (Казахстанско-Сибирской сети улучшения пшеницы) в 2007–2010 гг. проведена оценка более 1200 образцов пшеницы на устойчивость к расе Ug99. Работы, проведенные в Исследовательском центре по селекции растений (Кения, г. Нджеро), выявили только 3 сорта яровой пшеницы, устойчивые к Ug99 (Зеленский и др., 2010).

Наиболее эффективным способом защиты растений является использование устойчивых к болезням сортов. Применение молекулярно-генетических маркеров позволяет идентифицировать эффективные гены устойчивости в сортах и гибридах, что ускоряет отбор целевых генотипов и повышает эффективность селекционного процесса. Преимуществом селекции с применением молекулярных маркеров (marker assisted selection – MAS) является возможность проведения отбора растений независимо от условий среды и на любой стадии развития (Shi *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2002). ДНК-маркеры широко используются как для непосредственного проведения селекции с помощью маркеров, так и для поиска доноров генов устойчивости к

стеблевой ржавчине в перспективном материале пшеницы.

К настоящему времени в базе данных Komugi Wheat Genetics Resource Database зарегистрировано 69 генов устойчивости к стеблевой ржавчине (SHIGEN, 2011), в том числе 45 идентифицированных *Sr*-генов и 24 *Sr*-гена, имеющих временное обозначение. По данным ряда исследователей, гены *Sr2*, *Sr13*, *Sr14*, *Sr22*, *Sr25*, *Sr26*, *Sr27*, *Sr28*, *Sr29*, *SrTmp*, *Sr32*, *Sr33*, *Sr35*, *Sr36*, *Sr37*, *Sr39*, *Sr40*, *Sr43*, *Sr44*, *Sr45*, *Sr46* и *Sr1A.1R* эффективны против расы Ug99 (Singh *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2007). В настоящем исследовании внимание было обращено на часть эффективных генов – *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr36*, и *Sr46*. Ген *Sr2* локализован в хромосоме 3BS, тестирующей линией этого гена является CS(Hope 3B), а источником гена – *Triticum turgidum* (Yaroslav emmer) (Knott, 1968). Ген *Sr2* является геном возрастной устойчивости широкого спектра (APR-ген, adult plant resistance gene). Однако уровень защитного ответа может зависеть от генетического окружения, окружающей среды и инфекционной нагрузки, поэтому для эффективной защиты от ржавчины рекомендуется «пирамидирование» этого гена с другими генами (Jin *et al.*, 2007). Ген *Sr22* локализован в хромосоме 7AL, источником гена является *T. monocoocum*, а тестирующей линией – SwSr22T.B. (Knott, 1968). Ген *Sr24* локализован в хромосоме 3DL, тесно сцеплен с геном устойчивости к бурой ржавчине *Lr24*, источником гена является *Agropyron elongatum*, а тестирующей линией – BrSr24Ag (McIntosh *et al.*, 1977). Ген *Sr36* локализован в хромосоме 2BS, источником гена является *T. timopheevii*, а тестирующей линией – W2691SrTt-1 (McIntosh, Guarfas, 1971). Ген *Sr46* локализован в хромосоме 2DS, источником гена является *Aegilops tauschii*, а тестирующей линией – L-18913 (Lagudah, 2008).

С учетом возможности воздушного переноса урединиоспор *P. graminis*. f. sp. *tritici* в регион Центральной Азии и Казахстана поиск и создание новых доноров и перспективных линий пшеницы, устойчивых к стеблевой ржавчине, становятся весьма актуальными и своевременными. Цель настоящей работы – идентификация источников с эффективными генами устойчивости к стеблевой ржавчине пшеницы.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований были использованы 88 образцов, включающих 40 перспективных линий яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L., и пшенично-пырейные гибриды (ППГ), созданные в лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений Казахстана. Кроме того, в данной статье представлены результаты конкурсного сортоиспытания лучших из 48 перспективных линий озимой пшеницы, проведенного в 2011 г. в условиях полевого стационара отдела генофонда полевых культур Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства, п. Алмалыбак Алматинской области (КазНИИЗР). Нами также изучено 45 линий пшеницы, предоставленных СИММИТ и созданных по программе повышения устойчивости пшеницы к расе возбудителя стеблевой ржавчины Ug99. Анализ устойчивости образцов пшеницы проводили в Казахстане (Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, п. Гвардейский, Жамбылская область) и в Кении (Институт сельскохозяйственных исследований Кении – Исследовательский центр селекции растений, г. Нджеро). В Кении экспериментальный материал испытывали на фоне естественной эпифитотии, популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* включала расу Ug99. Оценку развития болезни стеблевой ржавчиной в Казахстане и Кении проводили в фазу молочно-восковой спелости по принятой в СИММИТ методике, определяя инфекционный тип и степень поражения: R (Resistant – устойчивый тип) – 1 балл (поражение 5 %); MR (Moderately resistant – относительно устойчивый тип) – 2 балла (поражение до 20–30 %); MS (Moderately susceptible – относительно восприимчивый тип) – 3 балла (поражение до 40–50 %); S (Susceptible – восприимчивый тип) – 4 балла (поражение более 60 %) (Peterson *et al.*, 1948). В качестве восприимчивого контроля в полевых экспериментах в Кении и Казахстане использовали сорт пшеницы Безостая 1. Коллекции образцов пшеницы высевали во всех фитопатологических опытах на делянках площадью 1 м² в трехкратной повторности.

Для создания искусственного инфекционного фона в Казахстане образцы урединиоспор

возбудителя стеблевой ржавчины собирали в процессе обследований и экспедиций на производственных и селекционных посевах пшеницы в Алматинской, Жамбылской и Акмолинской областях. После размножения урединиоспор проводили инфицирование растений в фазе колошения смесью инокулюма с тальком в соотношении 1 : 100, инфекционная нагрузка урединиоспор составляла 20 мг/м². Для накопления инфекции и перезаражения растений через каждые пять опытных делянок высевали универсально восприимчивый сорт Мороссо и сорт-стандарт (Безостая 1).

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из 5-дневных проростков пшеницы с помощью СТАВ-метода (Riede, Anderson, 1996). Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве положительного контроля при идентификации генов использованы образцы пшеницы, в которых гены устойчивости идентифицированы, а в качестве отрицательного контроля – образцы, в которых гены устойчивости не выявлены. Носители гена *Sr2* выявляли на основе ПЦР с использованием SSR-маркера GWM533 (Hayden *et al.*, 2004), ген *Sr22* – с использованием маркера cfa2123 (Khan *et al.*, 2005), ген *Sr46* – с использованием маркера csSC46 (Lagudah, 2008), а гены *Sr24/Lr24* – с использованием STS маркера Sr24#12 (Mago *et al.*, 2005). Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ каждого нуклеотида), 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 18 мкл MQ-H₂O. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 %-м агарозном или 8 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1 мМ EDTA, pH 8) (Chen *et al.*, 1998). Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) при следующих параметрах: начальная денатурация – 94 °С в течение 5 мин; 45 циклов – 1 мин при 94 °С; 1 мин – 45 °С; 2 мин – 72 °С; финальная элонгация проводилась в течение 7 мин при 72 °С.

Изучение селекционного материала и статистическую обработку данных проводили по общепринятым методикам (Седловский и др., 1982).

Результаты и обсуждение

Оценка устойчивости перспективных линий пшеницы к возбудителю стеблевой ржавчины расы Ug99 в Исследовательском центре селекции растений (Кения, г. Нджеро)

В лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений были созданы интрогрессивные образцы мягкой пшеницы с участием диких и культурных сородичей *Triticum dicoccum*, *T. compactum*, *T. maha*, *T. spelta*, *T. turgidum*, *Aegilops triaristata*, а также пшенично-пырейные гибриды (ППГ), созданные на основе пырея удлиненного *Agropyron elongatum*. 40 перспективных по продуктивности образцов были изучены по устойчивости к стеблевой ржавчине. В 2008 г. коллекция образцов была испытана на инфекционном фоне на устойчивость к казахстанской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*. Образцы были устойчивы (оценка от 5R до 20–40MR). В 2009 г. коллекция образцов пшеницы была оценена в Исследовательском центре селекции растений (Кения) к популяции возбудителя стеблевой ржавчины, включающей вирулентную расу Ug99 (табл. 1).

Большинство образцов в условиях Кении оказались восприимчивыми к возбудителю ржавчины. В то же время результаты исследований позволили выявить 4 линии с умеренно устойчивым типом реакции (MR) на заражение. При этом указанные образцы отличались по степени поражения от низкой (5 %) до средней (40 %): № 28 Женис / *T. dicoccum* (5MR), № 32 Саратовская 29 / *T. maha* (20MR) и № 36 Женис / *T. compactum* (30MR), № 23 Женис / ППГ-27 (40MR). Выделено 14 линий с умеренно восприимчивой реакцией MS (табл. 1). Принимая во внимание тот факт, что у контрольного сорта интенсивность поражения болезнью составляет 60–70S, результаты испытания в Кении можно считать достаточно успешными. Изучение 4 перспективных устойчивых образцов в селекционных питомниках (СП-1 и СП-2) Казахского НИИ земледелия и растениеводства подтвердило ожидания в отношении продуктивности этих линий пшеницы.

Идентификация носителей генов устойчивости с использованием молекулярных маркеров

Поиск носителей генов устойчивости к стеблевой ржавчине был основан на молекулярном скрининге образцов пшеницы. В образцах идентифицировали гены, эффективные против расы стеблевой ржавчины Ug99 (ТТКСК): *Sr2*, *Sr22*, *Sr24*, *Sr36* и *Sr46*. Эффективность генов *Sr24* и *Sr36* подвергается сомнению, так как в последнее время обнаружены две новые разновидности расы Ug99, ТТКСТ и ТТССК, вирулентные к генам *Sr24* и *Sr36* соответственно (Jin *et al.*, 2007). Однако предполагается, что их целесообразно использовать в сочетании с другими эффективными генами устойчивости для создания пирамид генов (Tsilo *et al.*, 2008).

Ген возрастной устойчивости (adult plant resistance) *Sr2* обеспечивал полувековую стабильную устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине во многих регионах мира. Ген *Sr2* содержится во многих современных коммерческих сортах пшеницы (McIntosh, 1988). 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*. С ним тесно сцеплены 2 морфологических маркера, псевдоочерная колосковая чешуя (PBC, pseudo-black chaff) и проростковый хлороз, индуцированный высокой температурой (HTISC, high-temperature-induced seedling chlorosis), которые используют для косвенного отбора устойчивых фенотипов в селекционных программах (Eagles *et al.*, 2001). Для более надежного отбора носителей данного гена устойчивости к стеблевой ржавчине использован SSR-маркер GWM533, тесно сцепленный с *Sr2*-геном, преимуществом которого является то, что он выявляется независимо от влияния среды и стадии развития растений (Hayden *et al.*, 2004).

Для идентификации носителей этого гена проведен ПЦР-анализ 19 устойчивых к стеблевой ржавчине генотипов пшеницы с использованием указанного молекулярного маркера. Материалом для исследования служили линии пшеницы, предоставленные СИММИТ.

Таблица 1

Результаты изучения образцов пшеницы и пшенично-пырейных гибридов казахстанской селекции на устойчивость к стеблевой ржавчине (Кения, г. Нджеро, 2009 г.)

| № п/п | № каталога ИББР* | Образец-источник гена устойчивости | Степень поражения (%) и инфекционный тип |
|-------|------------------|--|--|
| 1 | – | Контроль – Безостая 1 | 60–70S |
| 2 | 1S-259-1 | ППГ-23 <i>Ag. elongatum</i> /239 | 70S |
| 3 | 2S-259-2 | ППГ-18 <i>Ag. elongatum</i> /239 | 60S |
| 4 | 3S-260-1 | ППГ-14 <i>Ag. elongatum</i> /239 | 60S |
| 5 | 4S-261-1 | ППГ-26 <i>Ag. elongatum</i> /Женис | 40MS |
| 6 | 5S-262-1 | Женис /ППГ-26 <i>Ag. elongatum</i> | 50S |
| 7 | 6S-263-1 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 40MS |
| 8 | 7S-266-1 | Саратовская 29/ <i>T. maha</i> | 60S |
| 9 | 8S-268-1 | Саратовская 29 / <i>T. maha</i> | 60S |
| 10 | 9S-271-1 | L719-99 / <i>T. maha</i> | 40MS |
| 11 | 10S-273-1 | <i>T. comractum</i> / Женис | 30MS |
| 12 | 11S-274-1 | Женис / <i>T. comractum</i> | 20MS |
| 13 | 12S-275-5 | Казахстанская 10/ <i>Ae. triaristata</i> | 40MS |
| 14 | 13S-276-1 | Карабалыкская 84 / <i>T. spelta</i> | 70S |
| 15 | 14S-278-1 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 70S |
| 16 | 15S-279-1 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 50MS |
| 20 | 16S-280-1 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 50MS |
| 21 | 20S-283-2 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 70S |
| 22 | 21S-284-3 | ППГ-27 <i>Ag. elongatum</i> / Женис | 80S |
| 23 | 22S-285-1 | ППГ-14 <i>Ag. elongatum</i> / Женис | 50MS |
| 24 | 23S-286-1 | Женис/ППГ-27 <i>Ag. elongatum</i> | 40MR |
| 25 | 24S-287-1 | Женис / <i>T. turgidum</i> | 40MS |
| 26 | 25S-287-4 | Женис / <i>T. turgidum</i> | 60MS |
| 27 | 26S-287-5 | Женис / <i>T. turgidum</i> | 60MS |
| 28 | 27S-289-5 | Женис / <i>T. turgidum</i> | 50MS |
| 29 | 28S-289-6 | Женис / <i>T. turgidum</i> | 5MR |
| 30 | 29S-290-1 | Женис / <i>T. maha</i> | 60S |
| 31 | 30S-265-2 | <i>T. spelta</i> / Женис | 40S |
| 32 | 31S-265-5 | <i>T. spelta</i> / Женис | 50S |
| 33 | 32S-266-4 | Саратовская 29 / <i>T. maha</i> | 20MR |
| 34 | 33S-266-7 | Саратовская 29 / <i>T. maha</i> | 60S |
| 35 | 34S-271-5 | L719-99 / <i>T. maha</i> | 20MS |
| 36 | 35S-274-3 | Женис / <i>T. comractum</i> | 60S |
| 37 | 36S-274-6 | Женис / <i>T. comractum</i> | 30MR |
| 38 | 37S-276-8 | Карабалыкская 84 / <i>T. spelta</i> | 70S |
| 39 | 38S-276-13 | Карабалыкская 84 / <i>T. spelta</i> | 60S |
| 40 | 39S-278-2 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 70S |
| 41 | 40S-279-2 | Женис / <i>Ae. triaristata</i> | 40MS |

* ИББР – Институт биологии и биотехнологии растений.

Ожидаемый размер фрагмента амплификации для локуса *Xgwm533* – 120 п.н. (Hayden *et al.*, 2004). Среди продуктов амплификации ДНК положительного контроля, почти изогенной линии сорта Чайниз Спринг (CS*6/Норе 3В), присутствует характерный фрагмент размером 120 п.н. (рис.).

Анализ результатов ПЦР показал, что 12 генотипов формировали амплифицированный продукт, аналогичный маркеру гена *Sr2*. К носителям этого гена можно отнести линии: 1 – 1212/8 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/GRISSET-4); 2 – 1216/7 (TAM200/3/F60314.76/MRL//CNO79/4/84.40022/5/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT); 6 – 1213/8 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/PYN/BAU); 7 – 1213/5 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/PYN/BAU); 8 – 1213/1 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/PYN/BAU); 9 – 1212/3 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/GRISSET-4); 10 – 1211/4 (KINACI97/4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT); 12 – 1212/1 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/GRISSET-4); 13 – 1212/1 (AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT/4/GRISSET-4); 15 – 1211/7 (KINACI97/4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT); 19 – 1210/10 (338-K1-1//ANB/BUC/3/GS50A/4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT) и 20 – 1210/4 (338-K1-1//ANB/BUC/3/GS50A/4/AGRI/NAC//KAUZ/3/1D13.1/MLT). Оценка устойчивости к стеблевой ржавчине на инфекционном фоне к казахстанской популяции стеблевой ржавчины показала высокую устойчивость указанных 12 линий пшеницы

(5R–20MR). Присутствие в геноме изученных линий гена *Sr2* было подтверждено проявлением морфологического маркера «псевдочерная колосковая чешуя» (PBC, pseudo-black chaff), тесно сцепленного с геном. Таким образом, результаты ПЦР-анализа и фитопатологической оценки свидетельствуют о том, что из 19 проанализированных перспективных линий пшеницы 12 содержат в своем генотипе эффективный ген *Sr2*.

При изучении этих же 19 образцов пшеницы из СИММИТ на наличие гена *Sr46* был использован молекулярный маркер *csSC46*, который был разработан на основе ВАС-клона, содержащего локус *Xpsr649* (Lagudah, 2008). В результате ПЦР с маркером *csSC46*, сцепленным с геном *Sr46*, образовывался фрагмент длиной 600 п.н. ПЦР-анализ выявил присутствие продукта амплификации характерного размера лишь у линии 338-K1-1//ANB/BUC/3/GS50A/4/422/5/BAYRAKTAR; в остальных генотипах он не обнаружен.

С целью идентификации носителей гена *Sr22* проведен ПЦР-анализ с праймерами к SSR-локусу *Xcfa2123*, расположенному на расстоянии 6 сМ от гена *Sr22* (Khan *et al.*, 2005). Анализу были подвергнуты 19 образцов пшеницы казахстанской селекции, показавшие устойчивость к местной популяции стеблевой ржавчины на инфекционном фоне (5R–30MR). При использовании праймеров к локусу *Xcfa2123* амплифицировались фрагменты ДНК размером 245 п.н. (в случае сцепления с доминантным аллелем

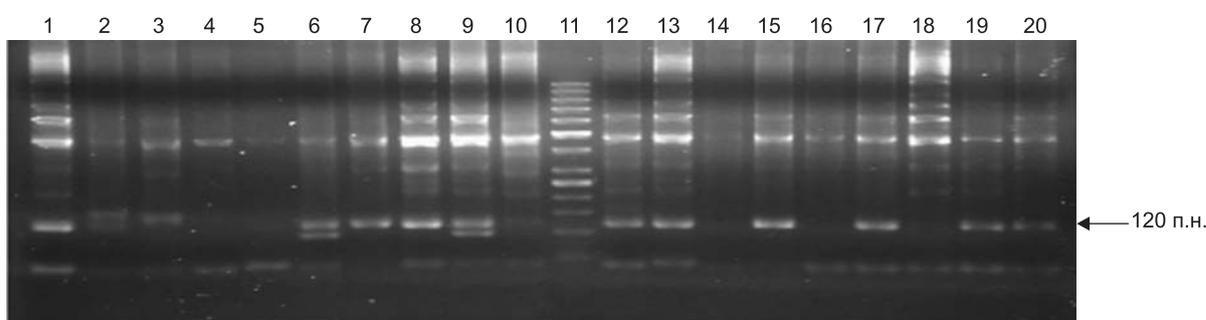


Рис. Продукты амплификации ДНК образцов пшеницы с использованием праймеров к локусу *Xgwm533*, сцепленному с геном устойчивости *Sr2*.

1 – 1212/8; 2 – 1216/7; 3 – 1216/6; 4 – 1216/5; 5 – 1213/9; 6 – 1213/8; 7 – 1213/5; 8 – 1213/1; 9 – 1212/3; 10 – 1211/4; 11 – маркер молекулярного веса (Gene-Ruler, 50 bp DNA Ladder); 12 – 1212/1; 13 – 1212/1; 14 – 1211/9; 15 – 1211/7; 16 – 1211/6; 17 – положительный контроль, *Sr2*, почти изогенная линия CS*6/Норе 3В; 18 – отрицательный контроль сорт Могоссо; 19 – 1210/10; 20 – 1210/4. Гель 2 %-й агарозный.

гена *Sr22*) или 260 п.н. (при рецессивном аллеле гена *Sr22*). Фрагменты, указывающие на присутствие доминантного аллеля гена *Sr22*, выявлены у 6 из 19 проанализированных линий пшеницы, включая положительный контроль – тестирующую линию Sw*Sr22*T.B. К носителям гена *Sr22* следует отнести линии: 185-6 (More/Carrawong / LawsonC90-1(Marquis*8/*Sr39Lr35*), KS5 (Женис / *T. dicoccum*), KS9 (Саратовская 29 / *T. maha*), KS12 (Женис / *T. compactum*) KS15 (Раминал), KS16 (Женис / 96Argus).

Ранее нами был проведен молекулярный скрининг 42 линий селекции СИММИТ на наличие генов *Sr24/Lr24* (Kokhmetova *et al.*, 2011). Среди изученного материала характерные ПЦР-продукты размером 500 п.н. выявлены у 7 линий пшеницы. Фитопатологическая оценка казахстанской популяции в условиях искусственного инфекционного фона показала устойчивую (5R) и умеренно-устойчивую (20MR) реакцию этих образцов на заражение стеблевой ржавчиной. У остальных 35 генотипов пшеницы маркер гена не обнаружен (Kokhmetova *et al.*, 2011). Присутствие генов *Sr24/Lr24* предполагается

у следующих линий пшеницы: Progress/94*Sr36*, 94*Sr36*/Progress, MV10-2000/4/ AGRI/NAC//KAUZ, KALYOZ-18//8229/OK81306/4/, SILVERSTAR/4/338-K1-1// ANB/, 338-K1-1//ANB/BUC/3/GS50A/4/422/5/BAYRAKTAR и TREGO/BTYSIB// ZARGANA-3/3/.

Отбор линий мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине и по количественным признакам

В питомнике конкурсного сортоиспытания отдела генофонда полевых культур Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства (КазНИИЗР) в 2011 г. испытано 48 перспективных линий озимой пшеницы, созданных в нашей лаборатории. Основными критериями отбора были высокая урожайность и устойчивость к стеблевой ржавчине. В табл. 2 приведены данные за 2011 г. по лучшим 9 линиям пшеницы, которые проявили высокую устойчивость к казахстанской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* (поражение не более 5%). Выделены 4 линии, превышающие по

Таблица 2

Результаты изучения перспективных линий озимой пшеницы в питомнике конкурсного сортоиспытания, Алмалыбак, КазНИИЗР, 2011 г.

| № каталога | Образец | Высота растения, см | Степень развития, инфекционный тип стеблевой ржавчины* | Урожайность, т/га | Отклонение урожайности от стандарта, % | Идентифицированные гены устойчивости |
|------------|-------------------------------|---------------------|--|-------------------|--|---|
| 529 | Санзар / Анза | 100,2 ± 2,1 | 0 | 8,52 | +16,9 | <i>Sr22</i> |
| 519 | А-А р-к / Прогресс | 80,1 ± 1,7 | 5R | 8,15 | +11,7 | – |
| 512 | Таза / МК 3750 | 85,4 ± 2,3 | 0 | 7,97 | +9,3 | – |
| 531 | Тилек / RWKLDN-33 | 110,1 ± 2,0 | 0 | 7,59 | +4,1 | – |
| 539 | RWKLDN-9 / FAWWON 3750 | 101,3 ± 1,9 | 5R | 8,83 | +21,1 | <i>Sr24/Lr24</i> |
| 526 | Мого*2/c90/More*2 | 120,0 ± 2,4 | 5R | 7,25 | –0,54 | <i>Sr22</i> |
| 508 | 181(Комсомол.1 / Карлыгаш 06) | 100,6 ± 1,6 | 5R | 7,24 | –0,68 | – |
| 19W-207 | Progress / 94 <i>Sr36</i> | 95,1 ± 1,5 | 5R | 6,61 | –9,3 | <i>Sr22</i> , <i>Sr36</i> , <i>Sr24/Lr24</i> |
| 514 | More / Carraway / Lawson | 100,7 ± 1,7 | 5R | 6,46 | –11,4 | <i>Sr22</i> , <i>Sr36</i> |
| | Стандарт – Алмалы | 97,6 ± 1,4 | 40MS | 7,29 | 0 | – |
| | НСР _{0,05} | 2,6 | – | 0,29 | – | – |

* Степень поражения и инфекционный тип по методике, принятой в СИММИТ.

урожайности сорт-стандарт Алмалы: № 529 F4 Санзар / Анза, № 519 А-А р-к / Прогресс, № 512 Таза / МК3750, № 531 Тилек / RWKLDN-33. По признаку «высота растения» отобранные линии в основном относились к среднерослым. Выраженность признака варьировала в пределах от 80 см у линии А-А р-к / Прогресс до 120 см у линии Мого*2/с90/Море*2. Селекционная линия № 539 комбинации RWKLDN-9/FAWWON 3750, характеризующаяся высокой продуктивностью и устойчивостью к стеблевой ржавчине, в 2011 г. передана на Государственное сортоиспытание в Госсортсеть Республики Казахстан.

С использованием молекулярных маркеров в перспективном селекционном материале идентифицированы гены устойчивости к стеблевой и бурой ржавчине. При проведении ПЦР с использованием молекулярного маркера Cfa2123 установлено, что носителями гена *Sr22* являются образцы пшеницы из комбинаций Санзар / Анза, Мого*2/с90/Море*2, Progress /94*Sr36* и Море / Carrawary / Lawson. Фрагменты ДНК, характерные для носителей генов *Sr36* и *Sr24/Lr24*, выявлены у линий RWKLDN-9 / FAWWON 3750, Progress / 94*Sr36* и Море / Carrawary / Lawson при использовании молекулярных маркеров *Sr24#12* для локуса *Sr24/Lr24* и *STM773-2* для гена *Sr36* (Tsilo *et al.*, 2008). Все испытанные линии показали высокий уровень устойчивости к стеблевой ржавчине, однако не во всех идентифицированы известные гены *Sr* (табл. 2). Возможно, что в них присутствуют неидентифицированные гены устойчивости к болезни. Ряд устойчивых к болезням образцов уступали сорту-стандарту по урожайности, что предполагает дальнейшую селекционную работу с ними.

Таким образом, в связи с возможной угрозой развития эпифитотий болезней необходимо создание новых доноров устойчивости к стеблевой ржавчине и селекционного материала пшеницы на их основе. В результате последовательной оценки на восприимчивость перспективных линий пшеницы на инфекционном фоне в Казахстане, а затем к кенийской популяции, включающей вирулентную расу Ug99, нами отобран ряд устойчивых к *P. graminis* f. sp. *tritici* линий. С использованием молекулярных маркеров, сцепленных с *Sr*-генами устойчивости, выявлены линии, несущие эффективные гены устойчиво-

сти к стеблевой ржавчине пшеницы. Отобранный материал проявил устойчивость к казахстанской популяции при повторном испытании, а в настоящее время проходит испытание в Кении. В питомнике КСИ выделены 4 высокоурожайные линии пшеницы, превышающие по урожайности сорт-стандарт. Эти образцы, устойчивые к казахстанской популяции стеблевой ржавчины и к расе Ug99, вовлечены в селекционные программы по повышению устойчивости к ржавчинным болезням. В селекционных питомниках младшего звена изучаются гибриды с участием этих линий. Для ускорения селекционного процесса нами будет продолжен отбор устойчивых к болезням линий с использованием молекулярных маркеров, сопряженных с этим признаком.

Для успешной селекции на иммунитет большое значение имеет международное сотрудничество с СИММИТ. Наши исследования показали, что сорта, устойчивые к стеблевой ржавчине, нужно создавать на основе казахстанских сортов пшеницы, адаптированных к условиям региона. В качестве доноров устойчивости необходимо вовлекать в гибридизацию и образцы из коллекции СИММИТ, а также линии с новыми генами устойчивости, полученные в Казахстане. Результаты нашей работы создают возможность для перехода селекционного процесса в Казахстане на новый научный уровень за счет применения молекулярно-генетических методов.

Багодарности

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений, отдела фитопатологии Института проблем биологической безопасности, отдела генофонда полевых культур Казахского НИИ земледелия и растениеводства и А.И. Моргунову (Представительство СИММИТ в Турции) за содействие в проведении исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках программы НТП 0.0492.

Литература

Зеленский Ю.И., Койшибаев М.К., Моргунов А.И. Повышение устойчивости яровой мягкой пшеницы к видам ржавчины и септориозу в Северном Казахстане

- // Матер. конф. «Биологическая защита растений как основа экологического земледелия и фитосанитарной стабилизации агроэкосистем», посвященной 50-летию ВНИИБЗР, Краснодар, 21–24 сентября 2010. Краснодар: ВНИИБЗР, 2010. С. 583–585.
- Койшибаев М., Пономарева Л.А., Кочоров А.С. Динамика болезней зерновых культур с листостебельной инфекцией в различных агроландшафтных зонах // Междунар. конф. «Стратегия земледелия и растениеводства на рубеже XXI века», Алматы, 1–3 июля 1999. Алматы, 1999. С. 108–110.
- Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на Севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы (ВНИИЗХ) // Тр. Всесоюз. совещ. по иммунитету растений. Киев, 1969. Вып. 3. С. 72–75.
- Рсалиев Ш.С. Вирулентность новых патотипов стеблевой ржавчины в Казахстане // Вторая Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам», Санкт-Петербург, 29 сентября–2 октября 2008. СПб: Инновационный центр защиты растений, 2008. С. 87–90.
- Седловский А.И., Мартынов С.П., Мамонов Л.К. Генетико-статистические подходы к теории селекции самоопыляющихся культур. Алма-Ата: Наука, 1982. С. 47–143.
- Castro A., Chen X.M., Hayes P.M., Johnston M. Pyramiding quantitative trait locus (QTL) alleles determining resistance to barley stripe rust: effects on resistance at the seedling stage // Crop Sci. 2002. No 43. P. 651–659.
- Chen X.M., Line R.F., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis // Theor. Appl. Genet. 1998. No 97. P. 345–355.
- Eagles H.A., Bariana H.S., Obgonaya F.C. *et al.* Implementation of markers in Australian wheat breeding // Austr. J. Agric. Res. 2001. No 52. P. 1349–1356.
- Hayden M.J., Kuchel H., Chalmers K.J. Sequence tagged microsatellites for the *Xgwm533* locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance genes *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) // Theor. Appl. Genet. 2004. No 109. P. 1641–1647.
- Jeffrey G. E., Mago R., Kota R. *et al.* Wheat rust resistance research at CSIRO // Austr. J. Agric. Res. 2007. V. 58. Issue 6. P. 507–511.
- Jin Y., Singh R.P., Ward R.W. *et al.* Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic *Sr* gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2007. No 91. P. 1096–1099. DOI:10.1094/PDIS-91-9-1096.
- Jin Y., Szabo Z.A., Pretorius Z.A. *et al.* Detection of virulence to *Sr24* within race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Plant Disease. 2008. V. 92. P. 923–926.
- Khan R., Bariana H., Naik S. *et al.* Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. 2005. No 111. P. 846–850.
- Knott D.R. The inheritance of resistance to stem rust races 56 and 15B-1L (Can.) in wheat varieties Hope and H-44 // Can. J. Genet. Cytol. 1968. No 10. P. 311–320.
- Kokhmetova A., Morgounov A., Rsaliev Sh. *et al.* Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques // Czech J. Genet. Plant Breeding. 2011. V. 47. P. 146–154.
- Lagudah E.S. Personal communication. Catalogue of gene symbols for wheat: 2008 Supplement // Annu. Wheat Newslett. 2008. V. 54. P. 209–225.
- Mago R., Bariana H.S., Dundas I.S. *et al.* Development of PCR markers for the selection on wheat stem rust resistance genes *Sr24* and *Sr26* in diverse wheat germplasm // Theor. Appl. Genet. 2005. No 111. P. 496–504.
- McIntosh R.A. The role of specific genes in breeding for durable stem rust resistance in wheat and triticale // Breeding Strategies for Resistance to the Rust of Wheat / Eds N.W. Simmonds, S. Rajaram. CIMMYT, Mexico, 1988. P. 1–9.
- McIntosh R.A., Guarfas J. *Triticum timopheevii* as a source of resistance to wheat stem rust // Z. Pflanzenzucht. 1971. V. 66. P. 240–248.
- McIntosh R.A., Dyck P., Green G. Inheritance of leaf rust and stem rust resistance in wheat cultivars Agent and Agatha // Aust. J. Agric. Res. 1977. V. 28. P. 37–45.
- Peterson R.F., Campbell A.B., Hannah A.E. A diagrammatic scale for estimating rust intensity on leaves and stems of cereals // Can. J. Res. 1948. V. 26. P. 496–500.
- Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance genes *Sr31* in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda // Plant Disease. 2000. V. 84. P. 203.
- Pretorius Z.A., Pienaar L., Prins R. Greenhouse and field assessment of adult plant resistance in wheat to Greenhouse and field assessment of adult plant resistance in wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* // Australian Plant Pathol. 2007. V. 36. No 6. P. 905–909.
- Riede C.R., Anderson, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat // Crop Sci. 1996. No 36. P. 905–909.
- Shi Z.X., Chen X.M., Line R.F. *et al.* Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust // Genome. 2001. V. 44. P. 509–516.
- SHIGEN (2011): Shared Information of GENetic Resources. Available at: www.shigen.nig.ac.jp. Accessed 26 June 2011.
- Singh R.P., Hodson D.P., Jin Y. *et al.* Current status, likely migration and strategies to mitigate the threat to wheat production from race Ug99 (TTKS) of stem rust pathogen // CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources. 2006. 1. N 054 DOI: 10.1079/PAVSNNR20061054
- Tsilo T., Jin Y., Anderson J. Diagnostic microsatellite markers for detection of stem rust resistance gene *Sr36* in diverse genetic backgrounds of wheat // Crop Sci. 2008. V. 48. P. 253–261.
- Wanyera R., Kinyua M. G., Jin Y., Singh R.P. The spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, with virulence on *Sr31* in wheat in Eastern Africa // Plant Disease. 2006. V. 90. P. 113.

IDENTIFICATION OF STEM RUST RESISTANCE SOURCES IN WHEAT BY USING MOLECULAR MARKERS

A.M. Kokhmetova, M.N. Atishova

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan,
e-mail: gen_kalma@yahoo.com

Summary

Puccinia graminis f. sp. *tritici* induces stem rust, which is the cause of a considerable crop loss. Race Ug99 of *P. graminis* f. sp. *tritici* (pathotype TTKS) is virulent to the majority of wheat varieties. According to FAO reports, major wheat-producing countries to the east of Iran (Afghanistan, India, Pakistan, Turkmenistan, Uzbekistan and Kazakhstan) are greatly endangered. It is necessary to seek resistance sources to stem rust with identified *Sr* genes. Screening with PCR SSR and STS markers associated with effective *Sr* genes (*Sr2*, *Sr22*, *Sr24* and *Sr46*) was undertaken to identify *Sr* gene sources. Twelve accessions with the *Sr2*-gene were identified. Seven resistant lines were found to possess *Sr24/Lr24* genes. *Sr46* was identified in one line. PCR analysis revealed the presence of *Sr22* in six promising lines. The results are used in wheat breeding programs for stem rust resistance with marker-assisted selection.

Key words: wheat, resistance genes, stem rust, molecular markers.