

Генетический контроль устойчивости образцов местного ячменя к ринхоспориозу

О.Н. Соболева , Г.С. Коновалова, Е.Е. Радченко

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова», Санкт-Петербург, Россия

Ринхоспориоз (возбудитель – *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis) – одна из наиболее вредоносных болезней ячменя. Высокая изменчивость гриба обуславливает появление новых агрессивных патотипов и, соответственно, потерю устойчивости сортов. Установлено, что большинство районированных в последнее время сортов ячменя и выявленных ранее источников устойчивости к *R. secalis* восприимчивы к этому патогену. Лишь один ген устойчивости, *Rrs9*, сохраняет эффективность против популяций возбудителя болезни в России. Цель исследования – поиск доноров эффективных генов устойчивости ячменя к возбудителю ринхоспориоза, способных легко передавать данный признак при гибридизации. Чем больше разнообразие генов, используемых в селекции, тем медленнее приспособление паразита и длительнее срок их «полезной жизни». Изучали наследование устойчивости к ринхоспориозу у 33 выделенных нами ранее местных образцов ячменя из Китая, Индии, Непала и Эквадора. Анализ взаимодействия тест-клонов *R. secalis* с растением-хозяином показал отличие аллелей, обуславливающих устойчивость к патогену у 32 форм ячменя, от эффективных ранее генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, а также от сохраняющего эффективность *Rrs9*. Установлено, что 30 образцов защищены новыми нетождественными генами устойчивости к ринхоспориозу. Предполагается, что образцы к-18398 и к-16231 из Китая имеют аллельные гены устойчивости к *R. secalis*, а ген (гены) устойчивости образца к-31075 (Непал) аллелен гену *Rrs9*. С помощью гибридологического анализа показано, что образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481 из Китая защищены эффективными генами устойчивости к *R. secalis*, различающимися между собой и не аллельными генам *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Образцы к-15868 и к-3481 имеют по два комплементарных рецессивных гена устойчивости к *R. secalis*, к-18989 – два рецессивных гена, а образец к-3307 – один рецессивный ген устойчивости к патогену. Гены устойчивости у этих форм проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений.

Ключевые слова: ринхоспориоз; ячмень; гены устойчивости; патоген; вирулентность; устойчивость; гибридологический анализ.

Genetic control of scald resistance in barley landraces

O.N. Soboleva , G.S. Konovalova, E.E. Radchenko

N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Scald (*Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis pathogenic agent) is one of the most harmful barley diseases. A high variability of this fungi explains the occurrence of new aggressive pathotypes and, accordingly, loss of cultivar resistance. It was found that many recently selected varieties of barley and previously identified sources of resistance to *R. secalis* are now susceptible to the pathogen. There is only one gene, *Rrs9*, that maintains efficiency against pathogen populations in Russia. The aim of this study is to find donors of genes for effective resistance to scald with the ability to easily transfer this trait for hybridization. The inheritance of scald resistance in 33 barley landraces was studied. Analysis of the interaction between the pathogen test clones and the host plant revealed a difference between the alleles determining fungal resistance in 32 barley forms, the previously effective genes *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, and currently effective *Rrs9*. It was found that 30 accessions are protected by new unidentified genes for scald resistance. Accessions k-18398 and k-16231 from China are likely to possess allelic genes for scald resistance, while the gene (or genes) of accession k-31075 from Nepal is allelic to the *Rrs9* gene. It was demonstrated by hybridological analysis that accessions k-3307, k-15868, k-18989 and k-3481 are protected by effective genes for scald resistance, which differ from each other and which are not allelic to the *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* or *Rrs9* genes. Accessions k-15868 and k-3481 possess two complementary recessive genes for scald resistance, k-18989 has two recessive genes, and k-3307 carries one recessive gene for pathogen resistance. The resistance genes of these forms are manifested during all the stages of plant ontogenesis.

Key words: scald; barley; genes for resistance; pathogen; virulence; resistance; hybridological analysis.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Соболева О.Н., Коновалова Г.С., Радченко Е.Е. Генетический контроль устойчивости образцов местного ячменя к ринхоспориозу. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2016;20(5):616-622. DOI 10.18699/VJ16.141

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Soboleva O.N., Konovalova G.S., Radchenko E.E. Genetic control of scald resistance in barley landraces. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2016;20(5):616-622. DOI 10.18699/VJ16.141

Ринхоспориоз, или окаймленная пятнистость листьев (возбудитель – *Rhynchosporium secalis* (Oudem.) J.J. Davis) – одна из наиболее вредоносных болезней ячменя. Ринхоспориоз широко распространен во всех основных районах производства ячменя, особенно в прохладных влажных областях умеренного пояса. В последние годы болезнь имеет тенденцию к нарастанию в зонах достаточного увлажнения – на Северо-Западе, в Северо-Кавказском, Центральном, Волго-Вятском регионах. Одна из причин возрастающей вредоносности патогена – высокая изменчивость гриба, приводящая к возникновению новых агрессивных патотипов и, соответственно, потере устойчивости ряда сортов. По разным литературным источникам, в настоящее время известно от 14 до 17 локализованных в хромосомах *Hordeum vulgare* L. генов устойчивости к ринхоспориозу (Björnstad et al., 2002; Hanemann et al., 2009), однако большинство из них неэффективны против популяций возбудителя болезни в России. По результатам многолетней работы с почти изогенными линиями ячменя установлено, что высокоэффективны против популяций патогена, распространенных на Северо-Западе России, лишь гены устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* (Коновалова, Соболева, 2010). Эффективность генов *Rrs4* и *Rrs9* подтверждает и оценка сортов La Mesita (носитель гена *Rrs4*) и Kitchen (*Rrs9*) (Лебедева и др., 2006). В результате изучения коллекции ячменя выделен ряд образцов, устойчивых к ринхоспориозу и другим пятнистостям (Брискина, Терентьева, 2000; Анисимова, 2008), большинство из которых в наших экспериментах сильно поразились *R. secalis*.

Одним из возможных путей поиска доноров генов устойчивости рассматривается изучение местных ячменей. Среди стародавних сортов-популяций зачастую находят источники адаптивно ценных признаков, в том числе и доноры новых генов устойчивости к болезням. В результате многолетнего иммунологического скрининга коллекции местных ячменей Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР) выявлены устойчивые к ринхоспориозу формы (Коновалова, Соболева, 2010). Цель работы – изучение генетического контроля устойчивости ячменя к ринхоспориозу у выделенных в предыдущих исследованиях образцов.

Материалы и методы

Анализировали наследование устойчивости ячменя к ринхоспориозу у 33 устойчивых местных образцов ячменя из восьми стран различных эколого-географических регионов мира.

Для заражения растений использовали изоляты и моноспоровые культуры *R. secalis*, выделенные из растений, собранных в Ленинградской области, на Северном Кавказе, в Узбекистане, Сирии и Канаде. Изоляцию, клонирование и культивирование гриба проводили по методике Г.С. Коноваловой (2003) на картофельно-глюкозном агаре. В качестве инокулюма использовали культуру клонов гриба 14-дневного возраста.

При оценке ювенильной устойчивости использовали лабораторный метод инокуляции отрезков листьев ячменя, помещенных на поверхность агара (1 %), содержащего бензимидазол (50 мг/л). На поверхность листьев наносили

капли (объем 20 мкл) споровой суспензии гриба с концентрацией 500–700 тыс. конидий в 1 мл. Типы реакции растений учитывали через 21 день после инокуляции по 5-балльной шкале: 0 – отсутствие симптомов болезни; 1 – точечный некроз; 2 – некроз с хлорозом или без него, ограниченный диаметром инфекционной капли; 3 – некроз с хлорозом, распространяющийся по отрезку листа; 4 – окаймленный некроз, занимающий всю поверхность листа. Баллы 0, 1, 2 относили к реакции устойчивости, 3 и 4 – к реакции восприимчивости (Коновалова, 2003, 2008).

В полевых условиях растения в фазу кушения – выхода в трубку опрыскивали споровой суспензией гриба и накрывали полиэтиленовой пленкой на 12 ч для создания влажной камеры. Первый учет типа реакции проводили через 7–10 дней после инокуляции ячменя, второй – в фазу молочной спелости, третий – через месяц после заражения. Развитие болезни оценивали по 5-балльной шкале, по которой поражение до 2 баллов соответствует реакции устойчивости (поражено не более 30 % поверхности листьев нижнего яруса), 3–5 – реакции восприимчивости (поражено от 50 до 100 % поверхности листьев нижнего яруса) (Коновалова, 2008).

Генетический контроль устойчивости к ринхоспориозу изучали с помощью двух экспериментальных подходов: фитопатологический тест (метод тестирующих клонов) и гибридологический анализ. На основании теории Х. Флора (Flora, 1956) генотип растения-хозяина можно предположительно определить без гибридологического анализа, пользуясь изолятами возбудителей болезней, маркированными определенной вирулентностью. Если хотя бы один клон патогена, авирулентный к тестеру данного гена устойчивости, поражает изучаемый сорт, это означает, что сорт не имеет функционального аллеля данного гена.

Первоначально с помощью тест-клонов определяли генотипы восьми устойчивых образцов ячменя: к-3481, к-15868, к-18989, к-3307, к-16233 (Китай), к-27205, к-27768 (Индия) и к-22299 (Эквадор), заражая по пять отрезков листьев каждого из этих образцов и четырех почти изогенных линий с известными генами устойчивости к ринхоспориозу (*Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*) 30 моноспоровыми культурами гриба. В их числе были 15 случайно выбранных клонов, выделенных из листьев коллекционных форм ячменя, а также 15 клонов, изолированных из листьев устойчивых образцов к-15868 и к-18989 (Китай) с отдельными пятнами ринхоспориоза. В качестве контроля во всех экспериментах использовали универсально восприимчивый сорт *Cambrinus* (Голландия). Метод тест-клонов применили и для сравнения генетического контроля устойчивости к ринхоспориозу у 25 выявленных нами высокоустойчивых форм ячменя. Для заражения отрезков листьев устойчивых образцов, а также четырех почти изогенных линий с генами устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* использовали семь клонов *R. secalis* с широким спектром вирулентности, отобранных по результатам предыдущего эксперимента.

Для изучения наследования устойчивости у четырех выделенных форм ячменя проводили скрещивания на опытном поле (Санкт-Петербург, Пушкин) по стандартной методике (Мережко и др., 1973). Три скрещиваемые фор-

мы (к-15868, к-18989, к-3481) однородны по устойчивости к патогену, а из гетерогенного образца к-3307 отобрали растения без симптомов поражения. Для определения числа генов, контролирующей устойчивость к болезни, образцы скрещивали с восприимчивым сортом *Cambrinus* из Голландии. Для изучения аллельных отношений генов устойчивости выделенные образцы скрещивали между собой, а также с почти изогенными линиями. В качестве тестеров эффективных, по литературным данным, генов устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *rrs9* (Лебедева и др., 2006; Коновалова, Соболева, 2010) использовали почти изогенные линии NIL4, NIL6, NIL7 и NIL9.

Гибридологический анализ проводили в поколениях F_2 и F_3 в полевых условиях и в лаборатории. При оценке F_2 гибридов в полевых условиях к классу устойчивых относили растения, тип реакции которых соответствовал баллам 0, 1 (высокая устойчивость) и 2 (умеренная устойчивость), к классу восприимчивых – 3 (восприимчивость) и 4, 5 баллов (высокая восприимчивость) (Коновалова, 2008). В лабораторных условиях инокуляцию растений и учет поражения F_1 гибридов и семей F_3 проводили по методике Г.С. Коноваловой (2003, 2008). Типы реакции на заражение оценивали по упомянутой ранее шкале, по которой 0–2 балла соответствуют реакции устойчивости, 3 и 4 балла – восприимчивости. Для определения соответствия полученных (фактических) данных по расщеплению теоретическим использовали критерий χ^2 (Лакин, 1990).

Результаты

При тестировании устойчивости восьми образцов к коллечкии клонов, выделенных из природных популяций гриба, наблюдали дифференциальное взаимодействие паразита и хозяина. В табл. 1 представлены результаты опытов с семью наиболее «информативными» клонами гриба. При заражении экспериментального материала клонами 18, 19 и 23, вирулентными к тестерам известных генов устойчивости, наблюдали устойчивые типы реакций у образцов к-3307, к-15868, к-27768, к-16233 и к-22299, т. е. эти формы защищены аллелями генов устойчивости, не тождественных *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. На различие генетического контроля устойчивости к возбудителю ринхоспориоза у образцов к-18989, к-3481 и к-27205 и тестеров идентифицированных генов указывает дифференциальное взаимодействие изученных форм с клонами 1, 3 и 7.

Попарное сравнение устойчивости ячменя к клонам 1, 3, 7, 18, 19, 23 и 25 свидетельствует о том, что все восемь образцов защищены разными аллелями генов устойчивости (см. табл. 1). Например, восприимчивость к-3307 к клону 3 свидетельствует о различии генетического контроля устойчивости у этого образца и остальных изученных форм ячменя. Образец к-15868 имеет аллели генов устойчивости, отличающиеся от аллелей, которыми защищены образцы к-18989, к-3481, к-27205 и к-22299, на что указывают реакции на заражение клоном 19. Выявлено различие генетического контроля устойчивости у образцов к-15868 и к-27768 (взаимодействие с клоном 1 и 18), к-15868 и к-3307 (клоны 3, 7, 23), а также – у к-15868 и к-16233 (клон 7).

Применили метод тест-клонов для сравнения генетического контроля устойчивости к ринхоспориозу у 25

выделенных нами высокоустойчивых форм ячменя (табл. 2). Для заражения отрезков листьев устойчивых образцов, а также четырех почти изогенных линий с генами устойчивости *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9* использовали семь клонов *R. secalis* с широким спектром вирулентности, упомянутых в табл. 1.

При заражении экспериментального материала тест-клонами у 24 образцов выявлены типы реакции на заражение, отличающиеся от типов реакций почти изогенных линий. Следовательно, эти образцы защищены аллелями генов устойчивости, не тождественных *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Так, 22 образца были устойчивы к клону 25, который обуславливал сильное поражение линий NIL 4, NIL 6 и NIL 7. Восприимчивость к этому же клону гриба образцов к-31068, к-31071 и к-25895 свидетельствует об отличии генетического контроля устойчивости у этих форм от линии NIL 9. Отличие аллелей генов устойчивости 21 образца и линии NIL 9 выявлено при заражении клонами 3 (17 образцов) и 23 (4 образца – к-19109, к-18982, к-8383, к-8386). Вывод о различии генетического контроля устойчивости подкрепляет также попарное сравнение взаимодействия изучаемых форм не только с упомянутыми четырьмя клонами, но и с рядом других. Лишь в одном случае установлено полное совпадение реакций на заражение тест-клонами: к-31075 и NIL 9. Не исключено, что образец к-31075 защищен геном *Rrs9*.

Попарное сравнение устойчивости образцов к семи клонам свидетельствует о том, что 32 образца защищены разными аллелями генов устойчивости (см. табл. 1, 2). Например, восприимчивость образца к-13049 (Китай) к клону 1 демонстрирует отличие генетического контроля признака у этой формы от образцов к-13050, к-18398, к-29108, к-16231, к-31068, к-31071, к-31075, к-27286, к-18982, к-6841, к-9143 и к-25893, к клону 3 – от образцов к-19109, к-8383 и к-8396 (см. табл. 2), а также от образцов к-15868, к-18989, к-3481, к-27768, к-22299 и к-27205 (см. табл. 1), а по типу реакции к клону 19 – от образцов к-3307 и к-16233 (см. табл. 1). Образец к-18982 (Китай) устойчив ко всем клонам патогена. Следовательно, генетический контроль устойчивости к *R. secalis* данного образца и остальных 32 изученных форм ячменя различен. Исключение составляют озимые образцы к-18398 и к-16231 из Китая, для которых характерны идентичные типы реакции на заражение всеми клонами патогена. Вероятно, данные образцы защищены тождественными аллелями генов устойчивости к ринхоспориозу, отличающимися от генов, идентифицированных ранее.

Анализировали гибриды от скрещивания четырех устойчивых образцов ячменя из Китая с восприимчивым сортом *Cambrinus*. Растения F_1 сильно поражались патогеном (3, 4 балла) в фазе всходов, что указывает на рецессивный характер наследования устойчивости у изучаемых форм. На искусственном инфекционном фоне анализировали расщепление F_2 гибридов (табл. 3). Расщепление по моногибридной схеме выявили в F_2 к-3307 × *Cambrinus* (один рецессивный ген устойчивости). В остальных комбинациях наблюдали расщепление по двум генам устойчивости. Соотношение устойчивых (R) и восприимчивых (S) фенотипов в F_2 к-18989 × *Cambrinus* не противоречит ожидаемому при контроле признака дву-

Table 1. Resistance of barley accessions against *R. secalis* clones

| Accession | Origin | <i>R. secalis</i> clone no. | | | | | | | |
|-----------------------|---------|-----------------------------|---|---|----|----|----|----|--|
| | | 1 | 3 | 7 | 18 | 19 | 23 | 25 | |
| k-3307 | China | S* | S | S | S | R | R | R | |
| k-15868 | China | S | R | R | S | R | S | R | |
| k-18989 | China | S | R | S | S | S | S | S | |
| k-3481 | China | S | R | S | S | S | S | R | |
| k-27768 | India | R | R | R | R | R | S | R | |
| k-27205 | India | S | R | R | S | S | S | S | |
| k-22299 | Ecuador | R | R | R | R | S | R | R | |
| k-16233 | China | S | R | S | S | R | S | S | |
| NIL 4 (<i>Rrs4</i>) | Sweden | S | S | R | S | S | S | S | |
| NIL 6 (<i>rrs6</i>) | Sweden | R | R | S | S | S | S | S | |
| NIL 7 (<i>rrs7</i>) | Sweden | R | R | R | S | S | S | S | |
| NIL 9 (<i>Rrs9</i>) | Sweden | R | R | R | S | S | S | R | |

* Hereinafter R, accession resistance; S, susceptibility.

Table 2. Types of responses of barley accessions to inoculation with *R. secalis* test clones

| Accession | Origin | <i>R. secalis</i> clone no. | | | | | | | |
|-----------|------------|-----------------------------|---|---|----|----|----|----|--|
| | | 1 | 3 | 7 | 18 | 19 | 23 | 25 | |
| k-13049 | Russia | S | S | S | R | S | R | R | |
| k-13050 | Russia | R | S | R | S | S | S | R | |
| k-12136 | Russia | S | S | S | S | S | S | R | |
| k-15147 | Russia | S | S | R | R | S | R | R | |
| k-27286 | Russia | R | S | R | R | R | S | R | |
| k-18398 | China | R | S | R | R | S | S | R | |
| k-16231 | China | R | S | R | R | S | S | R | |
| k-18529 | China | S | S | R | R | R | R | R | |
| k-18986 | China | S | S | S | S | S | R | R | |
| k-18982 | China | R | R | R | R | R | R | R | |
| k-6841 | China | R | S | R | S | S | S | R | |
| k-17737 | China | S | S | S | S | R | S | R | |
| k-19754 | India | R | S | R | R | R | R | R | |
| k-29108 | India | R | S | R | R | S | S | R | |
| k-19109 | India | S | R | R | R | R | R | R | |
| k-19940 | India | S | S | S | S | S | R | R | |
| k-31068 | Pakistan | R | R | S | S | S | R | S | |
| k-31069 | Pakistan | S | S | S | R | R | S | R | |
| k-31071 | Pakistan | R | S | S | R | R | S | S | |
| k-31075 | Nepal | R | R | R | S | S | S | R | |
| k-26097 | Uzbekistan | S | S | R | S | R | R | R | |
| k-9143 | Spain | R | S | R | R | S | R | R | |
| k-25893 | Spain | R | S | S | S | R | R | S | |
| k-8383 | Cyprus | S | R | R | R | R | R | R | |
| k-8386 | Syria | S | R | S | S | R | R | R | |
| NIL 4 | Sweden | S | S | R | S | S | S | S | |
| NIL 6 | Sweden | R | S | S | S | S | S | S | |
| NIL 7 | Sweden | R | R | R | S | S | S | S | |
| NIL 9 | Sweden | R | R | R | S | S | S | R | |

Table 3. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of resistant accessions and susceptible variety Cambrinus

| Cross | Ratio of phenotypes R:S | | χ^2 | Probability. <i>P</i> |
|---------------------|-------------------------|----------|----------|-----------------------|
| | observed | expected | | |
| k-3307 × Cambrinus | 31:76 | 1:3 | 0.900 | 0.25–0.50 |
| k-18989 × Cambrinus | 51:59 | 7:9 | 0.305 | 0.50–0.75 |
| k-15868 × Cambrinus | 10:124 | 1:15 | 0.336 | 0.50–0.75 |
| k-3481 × Cambrinus | 8:105 | 1:15 | 0.132 | 0.50–0.75 |

Note: Here and in Tables 5 and 6 $\chi^2_{0.05} = 3.84$.

Table 4. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₃ hybrids from crossing of resistant accessions and susceptible variety Cambrinus

| Cross | Ratio of phenotypes R:RS:S | | χ^2 | <i>P</i> |
|---------------------|----------------------------|----------|----------|-----------|
| | observed | expected | | |
| k-3307 × Cambrinus | 21:35:24 | 1:2:1 | 1.481 | 0.25–0.50 |
| k-18989 × Cambrinus | 5:13:2 | 7:8:1 | 2.963 | 0.20–0.25 |
| k-15868 × Cambrinus | 3:10:6 | 1:8:7 | 3.441 | 0.10–0.20 |
| k-3481 × Cambrinus | 2:12:5 | 1:8:7 | 2.532 | 0.25–0.50 |

Note: $\chi^2_{0.05} = 5.99$.

Table 5. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of resistant accessions

| Cross | Ratio of phenotypes R:S | | χ^2 | <i>P</i> |
|-------------------|-------------------------|----------|----------|-----------|
| | observed | expected | | |
| k-3307 × k-15868 | 36:65 | 19:45 | 1.716 | 0.10–0.20 |
| k-3307 × k-18989 | 75:38 | 37:27 | 3.394 | 0.05–0.10 |
| k-18989 × k-3307 | 48:22 | 37:27 | 3.322 | 0.05–0.10 |
| k-18989 × k-3481 | 34:53 | 121:135 | 2.338 | 0.10–0.20 |
| k-18989 × k-15868 | 38:52 | 121:135 | 0.918 | 0.25–0.50 |
| k-15868 × k-3307 | 36:65 | 19:45 | 1.716 | 0.10–0.20 |
| k-15868 × k-18989 | 52:68 | 121:135 | 0.774 | 0.25–0.50 |
| k-15868 × k-3481 | 18:85 | 31:225 | 2.787 | 0.05–0.10 |
| k-3481 × k-15868 | 18:85 | 31:225 | 2.787 | 0.05–0.10 |
| k-3481 × k-18989 | 34:53 | 121:135 | 2.338 | 0.10–0.20 |
| k-3481 × k-3307 | 28:53 | 19:45 | 0.924 | 0.25–0.50 |

мя рецессивными генами устойчивости. Расщепление в F₂ к-15868 × Cambrinus и к-3481 × Cambrinus удовлетворяет предположению о контроле признака двумя комплементарными рецессивными генами устойчивости.

Расщепление F₃ гибридов от скрещивания устойчивых образцов с сортом Cambrinus анализировали в лабораторных условиях в фазе всходов (табл. 4). Соотношение устойчивых (R), расщепляющихся (RS) и восприимчивых (S) семей подтверждает результаты анализа F₂. Таким образом, гены устойчивости у обсуждаемых форм ячменя проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений.

Опыты с тест-клонами гриба показали, что все четыре образца защищены разными генами устойчивости. В то же время гены, идентифицированные с помощью тест-клонов, могут являться новыми эффективными аллелями уже известных локусов.

Изучили аллельные отношения генов устойчивости к *R. secalis* у выделенных образцов (табл. 5), а также ранее идентифицированных генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, *Rrs9* (табл. 6). Анализировали расщепление F₂ гибридов в период, когда поражение восприимчивого контроля (сорт Cambrinus) составляло 70 %. Поражение растений F₂ в этот период варьировало от 0 до 60 %.

Table 6. Segregation for resistance to *R. secalis* in F₂ hybrids from crossing of scald-resistant accessions and tester lines

| Cross | Ratio of phenotypes R:S | | χ^2 | P |
|-----------------|-------------------------|----------|----------|-----------|
| | observed | expected | | |
| k-3307 × NIL 4 | 88:26 | 13:3 | 1.232 | 0.25–0.50 |
| k-3307 × NIL 6 | 49:58 | 7:9 | 0.182 | 0.50–0.75 |
| k-3307 × NIL 7 | 53:61 | 7:9 | 0.348 | 0.50–0.75 |
| k-3307 × NIL 9 | 97:15 | 13:3 | 2.109 | 0.10–0.20 |
| k-18989 × NIL 4 | 87:20 | 55:9 | 1.897 | 0.10–0.20 |
| k-18989 × NIL 6 | 65:53 | 37:27 | 0.360 | 0.50–0.75 |
| k-18989 × NIL 7 | 88:49 | 37:27 | 2.316 | 0.10–0.20 |
| k-18989 × NIL 9 | 113:14 | 55:9 | 0.97 | 0.25–0.50 |
| k-15868 × NIL 4 | 67:14 | 49:15 | 1.709 | 0.10–0.20 |
| k-15868 × NIL 6 | 98:25 | 49:15 | 0.664 | 0.25–0.50 |
| | | 19:45 | 147.237 | > 0.005 |
| k-15868 × NIL 7 | 39:70 | 19:45 | 1.938 | 0.10–0.20 |
| k-15868 × NIL 9 | 89:21 | 49:15 | 1.158 | 0.25–0.50 |
| k-3481 × NIL 4 | 81:22 | 49:15 | 0.248 | 0.50–0.75 |
| k-3481 × NIL 6 | 38:65 | 19:45 | 2.562 | 0.10–0.20 |
| k-3481 × NIL 7 | 41:73 | 19:45 | 2.152 | 0.10–0.20 |
| k-3481 × NIL 9 | 72:18 | 49:15 | 0.592 | 0.25–0.50 |

Соотношение фенотипов удовлетворяет предположению о том, что образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481 защищены разными аллелями генов устойчивости. Эти гены отличаются и от идентифицированных ранее генов *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7*, *Rrs9*. Результаты опытов подтверждают также вывод о моногенном контроле устойчивости у образца к-3307 и дигенном – у к-15868, к-18989, к-3481. Исследуемые выборки малы, однако выявленное расщепление, несомненно, свидетельствует о неаллельности генов устойчивости.

При анализе F₂ от скрещивания образца к-15868 с почти изогенной линией, защищенной рецессивным геном *rrs6*, мы наблюдали расщепление, противоречащее гипотезе о контроле признака устойчивости двумя комплементарными рецессивными генами. Соотношение фенотипов соответствовало расщеплению по одному доминантному и двум комплементарным рецессивным генам устойчивости.

Обсуждение

Наши эксперименты в очередной раз продемонстрировали значение для селекции местных форм, большая часть которых собрана еще во времена первых экспедиций ВИР. Определение генотипов 33 образцов ячменя с помощью тестирующих клонов *R. secalis* показало отличие аллелей генов устойчивости у 32 образцов от *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Исключение составил образец к-31075 из Непала, типы реакции которого на заражение грибом были идентичны типам реакции линии NIL 9. Вероятно, данный образец защищен геном *Rrs9*. Большинство выделенных образцов защищены нетождественными аллелями генов устойчи-

вости к ринхоспориозу, за исключением двух образцов из Китая – к-18398 и к-16231.

Для популяций *R. secalis* характерен широкий спектр изменчивости по признаку вирулентности. Многие коммерческие сорта ячменя, защищенные известными генами устойчивости, со временем становятся восприимчивыми к грибу даже на фоне интенсивных обработок фунгицидами (Abang et al., 2006; Zaffarano et al., 2006). Все выделенные нами образцы, за исключением к-18982 из Китая, дифференциально взаимодействовали с клонами гриба, однако сохраняли устойчивость в течение шести–семи лет изучения. В течение четырех лет мы проводили мониторинг степени поражения почти изогенных линий. На начальном этапе работы линии с генами *Rrs4*, *rrs6* и *rrs7* проявляли высокую устойчивость к патогену, однако затем изменение состава инокулюма и благоприятные для развития болезни погодные условия обусловили потерю устойчивости этих линий, как и многих выделенных нами устойчивых сортов (Коновалова, Соболева, 2010). Следует отметить, что мы выделили и клоны, вирулентные к единственному эффективному гену устойчивости *Rrs9* (см. табл. 1 и 2). В полевых условиях на чрезвычайно жестком инфекционном фоне степень поражения почти изогенной линии NIL 9 в течение свыше десяти лет практически не изменялась и составляла 0–1 балл (отсутствие симптомов заболевания либо поражение 5–10 % поверхности листьев нижнего яруса). Мы полагаем, что вирулентные к сортам с геном *Rrs9* клоны гриба менее конкурентоспособны в сравнении с остальными и вытесняются в природных популяциях *R. secalis*. Следует также отметить, что даже на устойчивых растениях, без отчет-

ливых симптомов болезни, гриб способен образовывать споры (Thirugnanasambandam et al., 2011; Zhan et al., 2012).

К сожалению, пока нет надежных критериев для прогнозирования срока «полезной жизни» генов устойчивости. Лишь расширение генетического разнообразия возделываемых сортов может способствовать его продлению. Для селекции предлагаются 30 образцов, которые защищены новыми нетождественными аллелями генов устойчивости к ринхоспориозу. Наиболее эффективно могут быть использованы образцы к-3307, к-15868, к-18989 и к-3481, у которых изучено наследование устойчивости к патогену. Образцы защищены генами устойчивости к *R. secalis*, которые проявляются на протяжении всех этапов онтогенеза растений, различаются между собой и не аллельны генам *Rrs4*, *rrs6*, *rrs7* и *Rrs9*. Образцы к-15868 и к-3481 имеют по два комплементарных рецессивных гена устойчивости к *R. secalis*, к-18989 – два рецессивных гена, а образец к-3307 – один рецессивный ген устойчивости к патогену. Комплементарное взаимодействие генов образцов к-15868 и к-3481 может являться результатом аддитивного эффекта двух генов, каждый из которых по отдельности не имеет фенотипического проявления.

В F_2 от скрещивания образца к-15868 (два комплементарных рецессивных гена устойчивости) с линией NIL 6, несущей рецессивный ген *rrs6*, соотношение фенотипов соответствовало расщеплению по одному доминантному и двум комплементарным рецессивным генам устойчивости. Наиболее вероятное объяснение – смена доминирования гена *rrs6*. В литературе описаны подобные случаи – например, ген устойчивости *Lr23* к возбудителю бурой ржавчины пшеницы (*Puccinia triticina* Erikss.), проявление которого против разных клонов гриба имеет доминантный либо рецессивный характер (Одинцова, Пеуша, 1984). Не исключена также и ошибка классификации фенотипов. В любом случае ген *rrs6* и гены устойчивости образца к-15868 не аллельны, на что указывает расщепление в F_2 к-15868 \times NIL 6 (см. табл. 6).

Возрастающая генетическая однородность возделываемых культур способствует ускорению адаптивной микроэволюции вредных организмов. Результаты многочисленных исследований показывают, что по характеру фенотипического проявления и наследования нельзя отличить потенциально преодолеваемую возбудителями болезней и вредителями устойчивость от непреодолеваемой (длительной). И большие, и малые гены устойчивости зерновых культур к вредным организмам дифференциально взаимодействуют с патогенами. Следовательно, возможность приспособления вредного организма вполне очевидна в обоих случаях. Рациональная стратегия селекции предусматривает, прежде всего, расширение генетического разнообразия возделываемых сортов. Известно несколько способов восстановления генетического разнообразия зерновых культур, обсуждаемых в отечественной и зарубежной научной печати: чередование во времени сортов с разными генами устойчивости; «мозаики» (возделывание одновременно большого числа сортов с разными генами устойчивости в ареале патогена); селекция мультилинейных сортов (механических смесей фенотипически сходных линий, различающихся по генам устойчивости); пирамидирование (объединение в одном

генотипе различных факторов устойчивости). Выявленные нами устойчивые формы могут быть использованы в любой стратегии селекции и в различных комбинациях.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Abang M.M., Baum M., Ceccarelli S., Grando S., Linde C.C., Yahyaoui A.H., Zhan J., McDonald B.A. Pathogen evolution in response to host resistance genes: evidence from fields experiments with *Rhynchosporium secalis* on barley. *Phytopathology*. 2006;96(6):S2.
- Anisimova A.V. Search for sources of resistance to barley net blotch, foot rot, and scald. *Vtoraya Vserossiyskaya konferentsiya «Sovremennye problemy immuniteta rasteniy k vrednym organizmam»*. [Proc. 2nd All Russia Conference “Current Problems of Plant Immunity to Harmful Organisms”]. Saint-Petersburg, 2008;80-83. (in Russian)
- Björnstad A., Patil V., Tekauz A., Marøy A.G., Skjinner H., Jensen A., Magnus H., MacKey J. Resistance to scald (*Rhynchosporium secalis*) in barley (*Hordeum vulgare* L.) studied by near-isogenic lines: I. Markers and differentials isolates. *Phytopathology*. 2002;92(7): 710-720.
- Briskina O.S., Terentieva I.A. Screening of a barley collection for scald resistance. *Vestnik zashchity rasteniy = Plant Protection News*. 2000;1: 105-106. (in Russian)
- Flor H.H. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 1956;8:29-54.
- Hanemann A., Schweizer G.F., Cossu R., Wicker T., Röder M.S. Fine mapping, physical mapping and development of diagnostic markers for the *Rrs2* scald resistance gene in barley. *Theor. Appl. Genet.* 2009;119(8):1507-1522. DOI 10.1007/s00122-009-1152-9.
- Konvalova G.S. *Izmenchivost' vozbuditelya rinhosporioza yachmenya pri bespolom razmnozhenii. Metodicheskie ukazaniya* [Variability of the barley scald pathogenic agent at sexless propagation, a technical guide]. Saint-Petersburg, VIR Publ., 2003. (in Russian)
- Konvalova G.S. *Rinhosporioz. Izuchenie geneticheskikh resursov zernovykh kultur po ustoychivosti k vrednym organizmam. Metodicheskoe posobie* [Scald: study of genetic resources for pest resistance in cereal crops, a technical guide]. Moscow, Rosselkhozakademiya Publ., 2008;129-135. (in Russian)
- Konvalova G.S., Soboleva O.N. Barley accessions from South-East Asia as donors of resistance to the scald causative agent (*Rhynchosporium secalis* (Oud.)). *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2010;44(3):248-254. (in Russian)
- Lakin G.F. *Biometriya* [Biostatistics]. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990. (in Russian)
- Lebedeva L.V., Tvaruzek L., Konvalova G.S. Virulence analysis of Russian and Czech populations of the barley scald agent *Rhynchosporium secalis*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2006;40(4):337-342. (in Russian)
- Merezhko A.F., Erohin L.M., Judin A.E. *Effektivnyy metod opyleniya zernovykh kultur. Metodicheskie ukazaniya* [An efficient method of grain crop pollination. Technical guide]. Leningrad, VIR Publ., 1973. (in Russian)
- Odintsova I.G., Peusha Kh.O. On the composite structure of the locus *Lr23*, controlling resistance to brown rust in wheat. *Trudy po prikladnoy botanike, genetike i selektsii = Bulletin of Applied Botany, of Genetics, and Plant Breeding*. 1984;85:13-19. (in Russian)
- Thirugnanasambandam A., Wright K.M., Atkins S.D., Whisson S.C., Newton A.C. Infection of *Rrs1* barley by an incompatible race of the fungus *Rhynchosporium secalis* expressing the green fluorescent protein. *Plant Pathol.* 2011;60(3):513-521. DOI 10.1111/j.1365-3059.2010.02393.x.
- Zaffarano P.L., McDonald B.A., Zala M., Linde C.C. Global hierarchical gene diversity analysis suggests the fertile crescent is not the center of origin of the barley scald pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Phytopathology*. 2006;96(9):941-950. DOI 10.1094/PHYTO-96-0941.
- Zhan J., Yang L., Zhu W., Shang L., Newton A.C. Pathogen populations evolve to greater race complexity in agricultural systems – evidence from analysis of *Rhynchosporium secalis* virulence data. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38611. Available at: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3377678/pdf/pone.0038611.pdf>). DOI 10.1371/journal.pone.0038611.