

УДК: 632.42: 633:576.3/7.086.83:581.4

¹А.М. Кохметова*, ²З.Б. Сапахова, ¹М.Н. Атишова, ³Н.Ж. Султанова,
⁴А.А.Алшораз, ¹Д. Жанузак

¹РГП Институт биологии и биотехнологии и растений, г. Алматы, Казахстан,

²Казахский Национальный аграрный университет, г. Алматы, Казахстан,

³Казахский Научно-исследовательский институт защиты и карантина растений, п. Рахат, Казахстан,

⁴Красноводопадская СХОС, ЮКО, Казахстан

*e-mail: gen_kalma@mail.ru

Идентификация носителей устойчивости к пиренофорозу пшеницы (*Drechslera tritici-repentis*) на основе маркер-сопутствующей селекции

Пиренофороз является одной из самых вредоносных заболеваний пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах мира, включая Казахстан. Это ставит задачу создания новых сортов пшеницы на основе выявления носителей устойчивости к болезни с использованием молекулярных маркеров. В результате молекулярного скрининга с использованием SSR маркеров Xfcp1 и Xfcp394 идентифицировано 38 носителей эффективного гена *tsn1*, включая 20 казахстанских сортов и перспективных линий пшеницы и 18 зарубежных образцов, нечувствительных к токсину Ptr ToxA. Это позволило сформировать идентифицированную коллекцию носителей гена *tsn1*, обеспечивающего защиту от агрессивного токсина пиренофороза пшеницы Ptr ToxA.

Ключевые слова: генетика, гены устойчивости, генетические маркеры, пиренофороз, пшеница.

А.М. Кохметова, З.Б. Сапахова, М.Н. Атишова, Н.Ж., Султанова Н.Ж., А.А. Алшораз, Д.Жанузак Д.

Глеспелі-маркер селекциясының негізінде бидайдың пиренофорозға (*Drechslera tritici-repentis*) төзімділіктің тасмалдаушыларын идентификациялау

Пиренофороз әлемнің, оның ішінде Қазақстанның көптеген ауылшаруашылық аймақтарында таралған бидай ауруларының ішіндегі ең зияндыларының бірі болып табылады. Бұл бидайдың жаңа сорттарын, ауруға төзімділікті тасымалдауды молекулалық маркерлердің көмегімен анықтау негізінде құру міндетін қоюды алға тартады. SSR Xfcp1 және Xfcp394 маркерлерін пайдаланып жасалған молекулалық скрининг нәтижесінде *tsn1* эффективті генінің 38 иесі анықталды, оның ішінде қазақстандық 20 бидай сорты мен үлгілі бидай линиялары және 18 шетелдік үлгілер Ptr ToxA токсиніне сезімтал еместігін көрсетті. Сонымен, Ptr ToxA бидай пиренофорозының қарқынды токсинінен қорғауды қамтамасыз ететін *tsn1* генінің 38 иесінен тұратын анықталған коллекциясын құруға мүмкіндік туды.

Түйін сөздер: генетика, төзімділік гендері, генетикалық маркерлер, пиренофороз, бидай.

A.M. Kokhmetova, Z.B. Sapakhova, M.N. Atishova, N.Zh. Sultanova, A.A. Alshoraz, D. Zhanuzak

Identification of carriers of resistance to wheat tan spot (*Drechslera tritici-repentis*) under marker assisted selection

Tan spot is one of the harmful wheat diseases in many agricultural areas of the world including Kazakhstan. This poses a task of creating new wheat varieties on the basis of identification of carriers of resistance to disease using molecular markers. Therefore it is necessary to develop of new wheat varieties on the basis of identification of carriers of resistance to disease using molecular markers. As a result of molecular screening using SSR markers Xfcp1 and Xfcp394 38 sources of effective gene *tsn1*, including 20 Kazakhstani varieties and advanced lines of wheat and 18 foreign entries insensitive to toxin Ptr ToxA were identified. It allowed forming identified collection of sources of *tsn1* gene that could provide defense from the aggressive wheat tan spot toxin Ptr ToxA.

Keywords: Genetics, resistance genes, genetic markers, tan spot, wheat.

В последние годы в Казахстане обострилась фитосанитарная обстановка в связи с распространением желтой пятнистости [1]. *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechsler (несовершенная стадия *Drechslera tritici-*

repentis (Died) Shoem) вызывает пиренофороз или желтую пятнистость листьев на пшенице. Пиренофороз является одной из самых вредоносных заболеваний пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах мира. Потери

зерна в условиях эпифитотии достигают 65%, при этом ухудшается качество зерна пшеницы. Отмечается нарастающее распространение и вредоносность пиренофороза пшеницы в Казахстане. В предгорной зоне южного и юго-восточного Казахстана эпифитотийное развитие грибных пятнистостей листьев на озимой пшенице за указанный период наблюдали 4 раза: в 1993, 2002, 2003 гг. [2]. Распространение пиренофороза в Центральной Азии связано с минимальной обработкой почвы с сохранением стерни, монокультурой пшеницы или чрезмерной насыщенностью ею севооборотов и возделыванием неустойчивых к патогену сортов. В стабилизации производства зерна большое значение имеет генетическая защита растений, решаемая путем выведения устойчивых к болезням новых сортов растений. Решение этой задачи затруднено тем, что источники устойчивости к пиренофорозу встречаются крайне редко. Проблемы создания устойчивых сортов, связаны также с вариабельностью патогена.

Для того чтобы с большей надежностью контролировать болезнеустойчивость, очень важно иметь в распоряжении молекулярно-генетические маркеры, сопряженные с этим признаком. Надежные генетические маркеры, как правило, нейтральны по отношению к признакам, на которые ведется селекция, кодоминантны для распознавания родительских форм и стабильно сохраняются в потомстве. В практическом отношении выявление молекулярных маркеров устойчивости к пиренофорозу ускоряет и облегчает перенос генов и делает его более эффективным [3, 4].

Таким образом, в связи с интенсификацией производства пшеницы, переходом на минимизацию обработки почвы, восприимчивостью сортов пшеницы и широким применением пестицидов, пиренофороз становится широко распространенным, экономически значимым во всем мире, в том числе и в Казахстане. Наличие и активизация напряженных очагов инфекции пиренофороза, требует скорейшего создания новых сортов на основе выявления генетических механизмов устойчивости, маркирования носителей устойчивости к пиренофорозу и внедрения их в производство.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись районированные и перспективные сорта озимой пшеницы отечественной и зарубежной селекции и гибридные популяции F3-F5 пшеницы.

Полевая оценка устойчивости к пиренофорозу осуществлялась по шкале Rees [5]. Выделение геномной ДНК из растительного материала проводили с использованием СТАВ-буфера по методике Edwards [6]. Для осуществления молекулярного скрининга коллекции пшеницы на наличие генов устойчивости будет проведен ПЦР со специфичными праймерами, сопряженными с генами устойчивости к пиренофорозу [7]. Маркерная селекция на устойчивость к токсину будет основана на генетике признака чувствительности к патогену, которая по своей природе является доминантной, а устойчивость рецессивной [8]. Наиболее адекватными для идентификации носителей устойчивости к пиренофорозу являются молекулярные SSR маркеры Xfcp1 и Xfcp394, предложенные Faris [9], которые будут использованы в ПЦР-анализе.

Результаты и их обсуждение

Для выявления ценных доноров и источников устойчивости к *Drechslera tritici-repentis* оценивали коммерческие сорта и перспективные линии пшеницы из казахстанских и зарубежных питомников. Оценку на устойчивость к пиренофорозу проводили по показателю степени поражения листовой пластинки пшеницы пиренофорозом (%) на стадии полного колошения.

Проведена фитопатологический скрининг к пиренофорозу и генетико-селекционная оценка образцов пшеницы, предоставленных международным центром ICARDA. Из изученных 47 образцов пшеницы выделено 10 лучших в отношении продуктивности и устойчивости к болезни генотипов. В таблице представлены результаты структурного анализа элементов продуктивности и фитопатологической оценки устойчивости к пиренофорозу образцов пшеницы, характеризовавшихся сочетанием продуктивности и устойчивости к болезни. В результате фитопатологической оценки установлено, что поражение пиренофорозом

было невысоким, процент пораженности пиренофорозом проявлялся в пределах 1-5%.

Структурный анализ элементов продуктивности показал, что высота растения изученных образцов варьировала в пределах 72-85 см. Наиболее высокорослым был образец KR12-5075 (82,5 см). Продуктивная кустистость на выше стандарта Алмалы отмечена у образца Jaikhun. К крупноколосым генотипам можно отнести образцы KR11-9025, KR12-9012, KR12-5075 и Bunyodkor, формировавшие колосья длиной 11-12,9 см. Все отобранные генотипы отличались высокой озерненностью, массой зерна с колоса и

растения и превышали по этим показателям стандарт Алмалы. Самое высокое значение признака масса 1000 зерен отмечено у сорта Jaikhun (50г). Превышение над стандартом Алмалы по этому показателю наблюдалось также у остальных образцов (43-46 г.). Оптимальное сочетание признаков продуктивности и устойчивости к пиренофорозу обнаружено у 10 образцов из международного питомника ICARDA, включающих Jaikhun, KR11-20, KR11-9025, KR12-9011, KR12-9012, KR12-5075, Elomon, Bunyodkor, KR12-14 и Shafag-2.

Таблица – Фитопатологическая и селекционная оценка образцов из международного питомника ICARDA (естественный фон, Алмалыбак, 2013 г.)

№ кат. ИББР	Название сорта и линии	Высота растения, см	Продукт кустистость, шт	Длина колоса, см	Число зерен в главном колосе, шт	Масса зерна главного колоса, г	Масса зерна в растения, г	Масса ницы 1000 зерен, г	Оценка к пиренофорозу, %
1754	Jaikhun	72,08±6,96	7±1,41	9,27±0,7	52,70±6,67	2,63±0,33	13,87±2,21	50,04±4,68	1-5
1755	KR11-20	73,78±4,91	6,7±1,25	9,92±0,8	66,8±9,95	2,69±0,42	13,63±1,4	40,27±2,4	1-5
1763	KR11-9025	74,9±5,3	4,3±0,82	12,14±0,75	76,5±8,8	3,32±0,49	10,18±2,12	43,38±4,25	1-5
1771	KR12-9011	72,1±3,81	6,1±1,37	10,41±0,6	56,4±13,43	2,48±0,68	12,2±3,08	43,86±3,57	1-5
1772	KR12-9012	76,0±7,91	5,44±0,8	12,08±0,64	55,78±7,63	2,52±0,3	9,78±1,89	45,59±6,06	1-5
1783	KR12-5075	85,5±6	5,9±1,85	12,9±0,51	65,4±9,72	2,87±0,51	12,62±3,19	43,8±3,7	1-5
1788	Elomon	72,1±5,09	5,9±1,37	10,4±0,97	69,5±9,64	2,92±0,54	14,42±5,17	41,8±2,22	1-5
1790	Bunyodkor	73,1±3,73	5,4±1,65	11,49±0,53	66,9±9,16	3,09±,59	12,34±4,17	46,01±3,98	1-5
1768	KR12-14	68,85±3,65	4,6±1,43	9,75±0,57	63,6±5,15	2,58±0,38	9,6±1,73	40,4±4,51	0-1
1797	Shafag-2	72,67±2,31	5,33±1,5	12,5±1,5	73,67±9,07	2,83±0,67	12,88±4,64	39,04±5,9	0-1
42	St Алмалы	67,50±7,82	7,60±0,9	11,43±1,04	50,30±13,0	2,13±0,27	10,17±2,13	38,65±0,68	5

Известно, что в результате специфического взаимодействия между растением-хозяином и патогеном индивидуальные изоляты гриба могут вызвать на генотипах пшеницы различные симптомы (некроз и хлороз) [10]. Чувствительность к токсину Ptr ToxA, производимого изолятами расы 2 (nec+chl-) контролируется одним доминантным геном *Tsn1*, расположенном на длинном плече хромосомы 5B. Предполагается, что чувствительность к токсину Ptr ToxA и восприимчивость к некрозу гриба контролируется одним и тем же геном [11]. Ген *Tsn1* ответственен за чувствительность к белковым компонентам токсинов растения Ptr ToxA, продуцируемых грибом пиренофороза *Pyrenophora tritici-repentis* [10]. Чувствительность к токсинам контролируется доминантным аллелем, в то время как нечувствительность контролируется рецессивным или нуль аллелем. К настоящему времени разработано несколько молекулярных

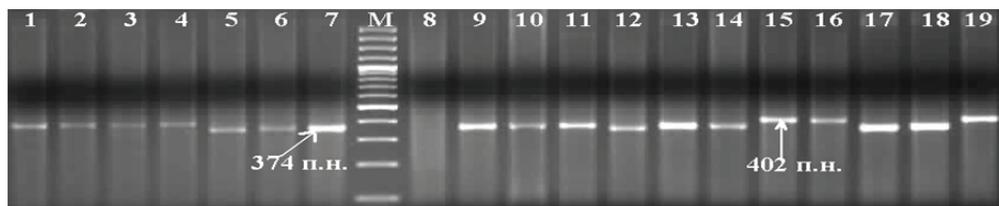
маркеров, тесно сцепленных с геном *Tsn1*, которые могут быть полезны для маркерной селекции – Marker-Assisted Selection. Маркеры Xfcp1, Xfcp393 и Xfcp394 локализованы на длинном плече хромосомы 5B в интервале 0.4 сМ. Между этими маркерами локализован ген *Tsn1*. Маркер Xfcp2 расположен дистально на расстоянии около 0.4 сМ (400 kb) от маркера Xfcp394, и это может представлять интерес для идентификации гена *Tsn1* в случае.

SSR маркер Xfcp1 формирует фрагмент размером 402 п.н., который, как правило, ассоциируется с чувствительностью генотипа к ToxA (доминантный аллель *Tsn1*) и фрагмент в 374 п.н., характерным для генотипов, нечувствительных к ToxA (рецессивный аллель *tsn1*). Из 68 образцов фрагмент ДНК размером 402 п.н. формировался у 28 и у такого же количества сортов формировался ПЦР-продукт размером 374 п.н. SSR маркер Xfcp394 формирует фрагмент размером 328 п.н., который ассоциируется с *Tsn1* аллелем,

чувствительным к Тох А. Другой аллель обнаруженный с помощью маркера Xfcp394 содержал фрагмент ДНК в 383 п.н., характерный для нечувствительных к ТохА генотипов (рецессивный аллель *tsn1*). Из 68 сортов фрагмент 328 п.н. обнаружен у 9, а фрагмент в 383 п.н. – у 54 сортов пшеницы.

На рисунке представлены результаты ПЦР-анализа перспективных линий пшеницы, созданных в ИББР с использованием праймеров к локусу Xfcp1, сцепленному с геном *Tsn1*. ПЦР с использованием праймеров Xfcp1 показал, что из 18 перспективных

линий пшеницы образцов пшеницы фрагмент ДНК размером 402 п.н., ассоциирующийся с чувствительным к Тох А генотипом (доминантный аллель *Tsn1*) формировался у 7 генотипов. ПЦР-продукт размером 374 п.н., характерным для генотипов, нечувствительных к ТохА (рецессивный аллель *tsn1*) амплифицировался у 11 образцов пшеницы, включая 8 линий комбинации Алмалы/Үг18 и сорта-дифференциаторы 6В602 Ламари-Канада, Ламари 6В602 и Opata85.



1–F₅Babax 2/ 137-1, 2 –F₅Babax 2 137-2, 3 –F₅ Наз 5242, 4 –F₅Babax 2/137-3, 5 –F₅ Алмалы/ Үг18-7, 6 –F₅ Алмалы/ Үг18-8, 7 – Opata85, М – Маркер молекулярного веса (Gene-Ruler 100bp DNA Ladder), 8 – ddH₂O, 9 –F₅ Алмалы /Үг18-1, 10 –F₅ Алмалы/ Үг18-2, 11 –F₅ Алмалы/Үг18-3, 12 –F₅ Алмалы/Үг18-4, 13 –F₅ Алмалы/ Үг18-5, 14 –F₅ Алмалы/Үг18-6, 15 –Д. 854 F₇ (Наз x ГФ55), 16 –RILs F₇ Алмалы x Avocet (S), 17 – 6В602 Ламари-Канада, 18 – Ламари 6В602, 19 – Ламари 6В365

Рисунок – Продукты амплификации ДНК сортов пшеницы с использованием праймеров к локусу Xfcp1, сцепленному с геном *Tsn1*

Таким образом, в результате молекулярного скрининга 68 образцов пшеницы с использованием SSR маркеров Xfcp1 и Xfcp394 идентифицировано 38 носителей эффективного гена *tsn1*, включая 6 казахстанских сортов пшеницы, 14 перспективных линий пшеницы и 18 зарубежных образцов, демонстрировавших нечувствительность к токсину Ptr ТохА. Это

позволило сформировать идентифицированную коллекцию носителей эффективного гена *tsn1*, обеспечивающего защиту от наиболее агрессивного токсина пиренофороза Ptr ТохА пшеницы. Коллекция состоит из 38 сортов и перспективных линий пшеницы, имеющих в генотипе ген устойчивости к пиренофорозу *tsn1*.

Литература

- 1 Койшибаев М.К. Особенности развития желтой ржавчины на озимой пшенице в южном и юго-восточном Казахстане. 145-147 // Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур: тез. Докл. междунар. науч. конф. – Алмалыбак: Асыл кітап, 2010. – С.145-147.
- 2 Койшибаев М.К. Болезни растений. – Алматы: Бастау, 2002. – 367 с.
- 3 Justin D. Faris, Zhaohui Liu, and Steven S. Xu. Genetics of tan spot resistance in wheat // Theor. Appl. Genet. – 2013. – Vol. – 126. – No 9. – P. 2197-2217.
- 4 Singh P.K., Singh R.P., Duveiller E., Mergoum M., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat–*Pyrenophora tritici-repentis* interactions // Euphytica. – 2010. – Vol. 171. – No 1. – P.1-13.
- 5 Rees R.G. Susceptibility of Australian wheats to *P. tritici-repentis* // Aust. J. Agric. Res. – 1987. – Vol. 39. – P. 141-151.
- 6 Edwards K., Johnstone C., Thompson C. A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis // Nucl Acids Res. – 1991. - Vol.19. - № 6. – P.1349.

- 7 Singh S., Bockus W.W. Novel source of resistance in wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* Race // Plant Disease. – 2008. – Vol. 92. - № 1. – P. 91- 95.
- 8 Singh P.K., Singh R.P., Duveiller E., Mergoum M., Adhikari T.B., Elias E.M. Genetics of wheat – *Pyrenophora tritici-repentis* interactions // Euphytica. – 2010. – Vol. 171. – P. 1-13.
- 9 Faris J.D. Disease resistance. Insensitivity to the toxins produced by *Pyrenophora tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum* // <http://maswheat.ucdavis.edu>
- 10 Faris J.D., Anderson J.A., Francl L.J., Jordahl J.G. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathology. – 1996. – Vol. 86. – P. 459-463.
- 11 Lamari L., Bernier C.C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: Host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction // Phytopathology. – 1989. – Vol. 79. – No 7. – P.740-744.