

ИММУНИТЕТ КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья
УДК 633.111.1:632.4
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-205-214



Устойчивость стародавней озимой мягкой пшеницы к желтой пятнистости

Н. В. Мироненко¹, Н. М. Коваленко¹, О. А. Баранова¹, О. П. Митрофанова²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Нина Васильевна Мироненко, nina2601mir@mail.ru

Актуальность. Наиболее эффективный и экологически безопасный способ борьбы с болезнями пшеницы – создание устойчивых сортов к их возбудителям. Для этого часто используют генофонд стародавних сортов (landraces) как источников генетического разнообразия важных для селекции признаков. В процессе селекции пшеницы на устойчивость к возбудителю желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (сокращенно Ptr) проводят отбор против доминантного аллеля *Tsn1* – гена чувствительности к некроз-индуцирующему токсину Ptr ToxA, основному фактору патогенности Ptr, контролируемому геном *ToxA*. Цели исследования – охарактеризовать выборку образцов стародавней озимой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.) из коллекции ВИР по устойчивости к различным популяциям Ptr; генотипировать образцы с использованием ДНК-маркера *Xfcp623* гена *Tsn1*, выявить источники устойчивости к желтой пятнистости.

Материалы и методы. Изучено 67 образцов стародавней озимой мягкой пшеницы. Ювенильную устойчивость образцов к двум популяциям Ptr оценивали с использованием принятой в ВИЗР пятибалльной шкалы. Аллельное состояние *Tsn1* идентифицировали методом ПЦР.

Результаты. Доминантные аллели *Tsn1* обнаружены у 55% изученных образцов. Устойчивыми или умеренно устойчивыми к двум популяциям Ptr и ранее использованному для их характеристики изоляту из Краснодарского края были 17 образцов. Из них девять – с генотипом *tsn1tsn1*, восемь – *Tsn1Tsn1*, в основном относящиеся к агроэкологическим группам, предложенным Н. И. Вавиловым: «степная мягкая озимая пшеница (банатки)», «североевропейские лесные безостые мягкие пшеницы (сандомирки)» и «озимая горная мягкая кавказская пшеница».

Заключение. Выделенные 17 образцов, устойчивых к Ptr, являются источниками устойчивости к этому патогену. На исследованной выборке образцов не выявлено достоверной связи между аллельным состоянием гена *Tsn1* у образца и его реакцией в ответ на заражение популяциями патогена, включающими изоляты с геном *ToxA*.

Ключевые слова: коллекция генетических ресурсов растений ВИР, агроэкологическая группа, образец, *Pyrenophora tritici-repentis*, популяции патогена, *Tsn1*, *ToxA*

Благодарности: работа выполнена в рамках государственных заданий по тематическим планам: ВИЗР, проект FGEU-2022-0009 «Формирование научного задела для долгосрочного обеспечения эффективной генетической защиты растений от вредных организмов, способствующей предотвращению развития эпифитотий и пандемий и отвечающей требованиям экологической безопасности»; ВИР, проект № FGEM-2022-0009 «Структурирование и раскрытие потенциала наследственной изменчивости мировой коллекции зерновых и крупяных культур ВИР для развития оптимизированного генбанка и рационального использования в селекции и растениеводстве».

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Мироненко Н.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А., Митрофанова О.П. Устойчивость стародавней озимой мягкой пшеницы к желтой пятнистости. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(4):205-214. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-205-214

IMMUNITY OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-205-214

Resistance of old winter bread wheat landraces to tan spot

Nina V. Mironenko¹, Nadezhda M. Kovalenko¹, Olga A. Baranova¹, Olga P. Mitrofanova²¹All-Russian Research Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia²N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia**Corresponding author:** Nina V. Mironenko, nina2601mir@mail.ru

Background. The most effective and environmentally safe way to combat wheat diseases is to produce cultivars resistant to their pathogens. For this purpose, old landraces are often used as genetically diverse sources of traits important for breeding. In the process of wheat breeding for resistance to tan spot caused by the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (abbr. Ptr), selection is carried out against the dominant allele of *Tsn1*, the gene of sensitivity to the toxin Ptr ToxA, which induces necrosis and represents the main pathogenicity factor of Ptr controlled by the *ToxA* gene. The aim of the study was to characterize a set of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) accessions from the VIR collection for resistance to various Ptr populations, genotype these accessions using *Xfcp623* – a DNA marker of the *Tsn1* gene, and identify sources of tan spot resistance.

Materials and methods. Sixty-seven accessions of winter bread wheat landraces were studied. Seedling resistance to two Ptr populations was assessed using a 5-point scale adopted at VIZR. The allelic state of *Tsn1* was identified by PCR.

Results. Dominant alleles of *Tsn1* were found for 55% of the studied accessions. Seventeen accessions were resistant or moderately resistant to two Ptr populations and an isolate from Krasnodar Territory previously used for their characterization. Nine of them had the *tsn1tsn1* genotype, and 8 had *Tsn1Tsn1*. The accessions mainly belonged to three agroecological groups proposed by N. I. Vavilov: “steppe winter bread wheat (Banatka wheats)”, “North European forest awnless bread wheats (Sandomirka wheats)”, and “Caucasian mountain winter bread wheat”.

Conclusion. The identified 17 accessions resistant to Ptr are potential breeding sources of resistance. In the studied set of accessions, no significant relationship was found between the allelic state of the *Tsn1* gene in the accession and its response to the infection with pathogen populations, including isolates with the *ToxA* gene.

Keywords: VIR plant genetic resources collection, agroecological group, accession, *Pyrenophora tritici-repentis*, pathogen populations, *Tsn1*, *ToxA*

Acknowledgements: the study was carried out within the framework of the state tasks according to the thematic plans: VIZR, Project FGEM-2022-0009 “Formation of scientific groundwork for the long-term provision of effective genetic protection of plants from harmful organisms, contributing to the prevention of the development of epiphytotic and pandemics and meeting the requirements of environmental safety”; VIR, Project No. FGEM-2022-0009 “Structuring and disclosing the potential of hereditary variation in the global collection of cereal and groat crops at VIR for the development of an optimized genebank and its sustainable utilization in plant breeding and crop production”.

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Mironenko N.V., Kovalenko N.M., Baranova O.A., Mitrofanova O.P. Resistance of old winter bread wheat landraces to tan spot. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(4):205-214. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-4-205-214

Введение

Желтая пятнистость считается экономически важной болезнью пшеницы во всем мире. Возбудитель ее – аскомицетный гриб *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (далее сокращенно Ptr). Известно, что гриб продуцирует относящиеся к факторам патогенности хозяина специфические токсины, индуцирующие образование некрозов и/или хлорозов в тканях листьев растений восприимчивых образцов пшеницы (Ballance et al., 1989; Lamari, Bernier, 1989; Tomas et al., 1990; Tuori et al., 1995). Среди них – белковый токсин Ptr ToxA, кодируемый геном *ToxA*, который считается основным фактором патогенности (Strelkov, Lamari, 2003; Ciuffetti et al., 2010). Действие этого гена проявляется на образцах пшеницы, обладающих геном восприимчивости *Tsn1*, который детерминирует чувствительность к токсину Ptr ToxA (Faris et al., 2010). До сих пор механизм взаимодействия продуктов генов *ToxA* и *Tsn1* при заражении растения и развитии болезни окончательно не выяснен. Вредоносность данной болезни зависит от генотипа растения пшеницы, а также от агрессивности и вирулентности популяции патогена и других факторов, например почвенно-климатических условий, в которых выращивают пшеницу, а также от использования комплексов агротехнических приемов, направленных на повышение ее устойчивости к вредоносным болезням. В условиях эпифитотии потери зерна могут достигать 65% (Rees et al., 1987), при этом наблюдают и ухудшение качества зерна (Ciuffetti et al., 1997). Решение проблемы видят в создании сортов пшеницы с высокой устойчивостью к данной болезни.

При создании сортов пшеницы часто используют генотип стародавних сортов (landraces) как источников генетического разнообразия важных для селекции признаков (Cseh et al., 2021; Tehseen et al., 2022). У стародавних сортов уровень полиморфизма по многим признакам, в том числе толерантности или устойчивости ко многим биотическим и биотическим стрессорам, выше, чем у современных селекционных сортов. Так, генетическое разнообразие коллекции местных сортов мягкой пшеницы из Центральной и Восточной Европы было оценено с помощью 20 тыс. SNP (single nucleotide polymorphism). При этом у стародавних сортов, устойчивых к засухе, тепловому стрессу и обладающих высокой способностью к кущению, присутствовали новые редкие аллели, а полиморфные маркеры были локализованы вместе с генами, имеющими большое агрономическое значение. Авторы сравнили генетическое разнообразие современных и стародавних сортов пшеницы и выявили потерю примерно 97% разнообразия за период между 1955 и 2015 г. (Cseh et al., 2021).

Ранее нами был проведен скрининг по устойчивости к желтой пятнистости 397 образцов стародавней мягкой пшеницы коллекции ВИР, из них 105 – с озимым типом развития (Korniyukhin et al., 2013). Устойчивость оценивали к изоляту возбудителя болезни из Краснодарского края. К группе устойчивых были отнесены 46 образцов. Представляло интерес с интервалом в десять лет с помощью той же методики, но с использованием других популяций *P. tritici-repentis*, повторно исследовать репрезентативную выборку образцов озимой стародавней мягкой пшеницы для уточнения характеристик образцов по устойчивости и подтверждения статуса источника устойчивости к желтой пятнистости у ряда образцов.

Цель настоящей работы – охарактеризовать выборку образцов стародавней озимой мягкой пшеницы (*Triticum*

aestivum L.) из коллекции ВИР по устойчивости к тамбовской и ленинградской популяциям Ptr, генотипировать образцы с использованием ДНК-маркера гена *Tsn1*, определить достоверность связи доминантных аллелей этого гена с устойчивостью образцов, выявить источники устойчивости.

Материалы и методы

При подборе материала для исследования опирались на агроэкологическую классификацию, разработанную Н. И. Вавиловым для пшеницы еще в 1940 г. Эта классификация приведена в его посмертно изданных рукописях (Vavilov, 1957, 1964). Классификация охватывает мировое разнообразие стародавней пшеницы и базируется на историко-географическом делении обширных территорий ее возделывания на агроэкологические области и районы, которые характеризуются определенными почвенно-климатическими условиями и экологическим типом стародавних сортов (landraces). Все мировое внутривидовое многообразие мягкой пшеницы, возникшее в основном благодаря естественному отбору, Н. И. Вавилов распределил по 39 агроэкологическим группам (= эколого-географическим группам).

Для проведения исследования нами было взято 67 образцов стародавней озимой мягкой пшеницы из различных агроэкологических групп. При подборе образцов учитывали географическое место сбора, год включения в коллекцию, упоминание названия образца в текстах изданных рукописей Н. И. Вавилова (Vavilov, 1957, 1964). Из них 57 образцов поступили в коллекцию ВИР в период с 1908 по 1940 г. и десять – с 1947 по 1970 г. В таблице 1 приведены названия агроэкологических групп по классификации Н. И. Вавилова (Vavilov, 1964), число изученных образцов в каждой группе, а также указана страна их происхождения по паспортной базе данных коллекции ВИР.

Для оценки устойчивости образцов к Ptr на стадии проростков использовали тамбовскую популяцию 2021 года (сокращенно она обозначена как Тамб-21) и популяцию из Ленинградской области 2021 года (Лен-21). Для инокуляции проростков создавали конидиальную суспензию из смеси наиболее агрессивных изолятов каждой популяции. Изоляты гриба выращивали в течение 5–7 суток под эритемными лампами на среде V4 (Mikhailova et al., 2002). Нами сделана молекулярная диагностика генов *ToxA* и *ToxB* изолятов патогена методом ПЦР с геноспецифичными праймерами (Andrie et al., 2007). Ген *ToxB* не выявлен в изолятах исследуемых популяций, тогда как ген *ToxA* обнаружен у большинства изолятов обеих популяций (данные не приводятся).

Метод определения устойчивости к возбудителю желтой пятнистости основан на анализе размеров некротических и хлоротичных пятен, образующихся после инокуляции листьев проростков пшеницы конидиальной суспензией гриба. Оценка образцов по устойчивости к данному возбудителю проводили с помощью бензимидазольного метода на отрезках листьев (Mikhailova, Kovalenko, 2009). В таблице 2 указаны выявляемые симптомы поражения, приведены типы реакции образцов на заражение патогеном в баллах по некрозу и хлорозу (некроз/хлороз), а также расшифрованы обозначения выявляемых фенотипов (Mikhailova, Kovalenko, 2009).

Присутствие в генотипе образца доминантного аллеля *Tsn1* определяли по наличию диагностического фрагмента SSR-маркера *Xfcp623*, разработанного на внутрен-

Таблица 1. Распределение изученных образцов стародавней озимой мягкой пшеницы из коллекции ВИР по агроэкологическим группам согласно классификации Н. И. Вавилова (Vavilov, 1964)**Table 1.** Distribution of the studied accessions of winter bread wheat landraces from the VIR collection into agroecological groups according to the classification by N. I. Vavilov (1964)

Агроэкологическая группа	Происхождение	Изучено образцов
Кашгарская мягкая пшеница	Китай	1
Нахичеванская мягкая пшеница	Азербайджан	2
Белуджистанская	Пакистан	1
Кашмирская	Индия	9
Северокитайская	Китай	1
Южнокитайская	Китай	4
Озимая горная мягкая кавказская пшеница	Армения, Грузия, Россия	12
Предгорная азербайджано-дагестанская группа мягких пшениц	Азербайджан	9
Степная мягкая озимая пшеница (банатки)	Белоруссия, Канада, Молдавия, Польша, Россия, Украина, Югославия до 1990 г.	14
Североевропейские лесные безостые мягкие пшеницы (сандомирки)	Польша, Россия	10
Южноевропейская крупнозерная мягкая пшеница	Италия	1
Альпийская группа местных озимых и яровых сортов мягкой горной пшеницы	Швейцария	3

Таблица 2. Шкала оценки устойчивости пшеницы к *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (Mikhailova, Kovalenko, 2009)**Table 2.** Scale for assessing wheat resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. (Mikhailova, Kovalenko, 2009)

Симптомы поражения / Damage symptoms	Тип реакции* / Reaction type	Фенотип пшеницы / Wheat phenotype	Обозначение фенотипа / Phenotype designation
Мелкие черные или темно-коричневые пятна до 0,5 мм, хлороз отсутствует или малозаметен / Small black or dark brown spots up to 0.5 mm, chlorosis is absent or hardly noticeable	1/0, 1/1	Устойчивый / Resistant	R
Мелкие черные или темно-коричневые пятна 0,5–1,0 мм, окруженные зоной хлороза до 2 мм / Small black or dark brown spots of 0.5–1.0 mm, surrounded by a zone of chlorosis up to 2 mm	1/2, 2/1, 2/2	Умеренно устойчивый / Moderately resistant	MR
Темно-коричневые пятна до 1,0 мм, хлороз до 2-3 мм / Dark brown spots up to 1.0 mm, chlorosis up to 2-3 mm	2/3, 2/4	Умеренно восприимчивый / Moderately susceptible	MS
Темно-коричневые пятна до 2,0 мм, хлороз до 5 мм / Dark brown spots up to 2.0 mm, chlorosis up to 5 mm	3/2, 3/3, 3/4	Восприимчивый / Susceptible	S
Коричневые, сливающиеся пятна, мацерация ткани листа / Brown, confluent spots, leaf tissue maceration	4/3, 4/4, 4/5, 5/4, 5/5	Весьма восприимчивый / Highly susceptible	HS

Примечание: * – над чертой – балл развития некроза, под чертой – хлороза

Note: * – above the line is the score for the development of necrosis, and below the line for chlorosis

нюю часть гена (Faris et al., 2010). Отсутствие фрагмента рассматривали как наличие в генотипе образца «нулевых» рецессивных аллелей *tsn1tsn1*. Негативный результат подтверждали амплификацией ITS (внутреннего транскрибируемого спейсера рДНК) с праймерами ITS1 и ITS4 (White et al., 1990; Ahmadi et al., 2022). ДНК выделяли из листьев растений с помощью СТАВ (Murray, Thompson, 1980).

Проверку степени однородности полученных распределений образцов по типу реакции на популяции патогена, а также достоверность связи между наличием/отсутствием диагностического фрагмента маркера *Xfcp623* и устойчивостью образца к Ptr определяли с помощью критерия «хи-квадрат» (χ^2) (Zaitsev, 1984).

Результаты

По отношению к каждой популяции образцы стародавней озимой мягкой пшеницы распределились по трем группам: устойчивые (R), умеренно устойчивые (MR) и восприимчивые (S). В последнюю группу вошли фенотипы MS, S и HS (табл. 3). Доля устойчивых образцов к популяции Лен-21 составила 11,9%, Тамб-21 – 19,4%, умеренно устойчивых – 43,3% и 40,3% соответственно. С реакцией R одновременно к двум популяциям патогена

было выявлено всего два образца – к-8518 (Московская 2411, Россия, Московская обл.) и к-25071 (Rouge de la Venoge, Швейцария). Проверка степени однородности полученных распределений образцов по типу реакции на заражение популяциями Лен-21 и Тамб-21 с использованием критерия χ^2 показала, что распределения однородны ($\chi^2 = 1,42$, $df = 2$; $\chi_{кр}^2 = 5,99$ при уровне значимости 0,05).

Все взятые в анализ 67 образцов стародавней озимой мягкой пшеницы были протестированы на наличие диагностического фрагмента маркера *Xfcp623* доминантного аллеля *Tsn1*. Маркер расположен в длинном плече хромосомы 5В, интроне 5 гена *Tsn1* (Faris et al., 2010). Согласно полученным данным генотипы *Tsn1Tsn1* были представлены примерно в равных долях с генотипами *tsn1tsn1*, у которых диагностический фрагмент не был обнаружен: 37 *Tsn1Tsn1* и 30 *tsn1tsn1*. Пример идентификации диагностического фрагмента маркера *Xfcp623* гена *Tsn1* у образцов приведен на рисунке.

Образцы с доминантными и рецессивными аллелями гена *Tsn1* были выявлены в разных агроэкологических группах стародавней пшеницы (табл. 4). В кашмирской и предгорной азербайджано-дагестанской группе мягких пшениц преобладали образцы с генотипом *Tsn1Tsn1*, в группе «североевропейские лесные безостые мягкие

Таблица 3. Процент встречаемости (число) образцов с разным типом реакции при инокуляции проростков различными популяциями *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.

Table 3. Percentage of occurrence (number) of accessions with different reaction types when seedlings were inoculated with different populations of *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.

Тип реакции образца / Accession's reaction type	Популяция/изолят / Population/isolate		χ^2
	Лен-21	Тамб-21	
R (устойчивый)	11,9 (8)	19,4 (13)	1,42
MR (умеренно устойчивый)	43,3 (29)	40,3 (27)	
S (восприимчивый)	44,8 (30)	40,3 (27)	
Всего / Total	67	67	

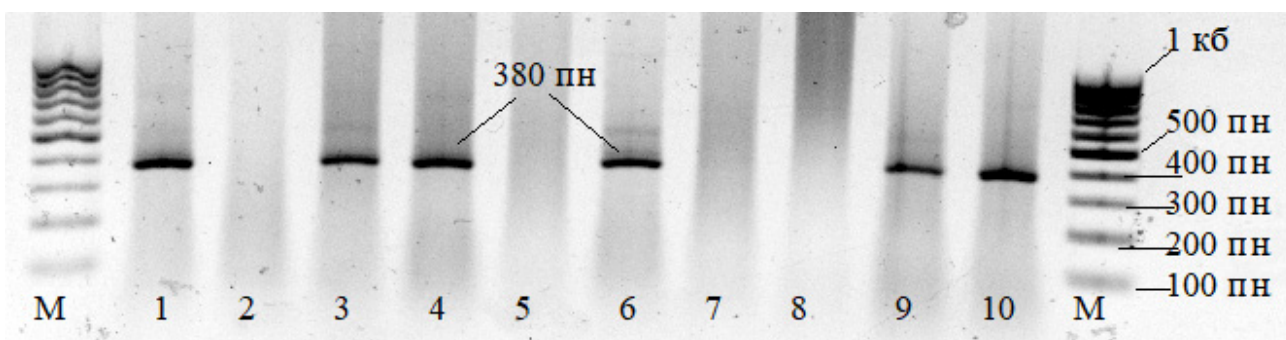


Рисунок. Идентификация диагностического фрагмента 380 пн маркера *Xfcp623* гена *Tsn1* у образцов стародавней мягкой пшеницы. Образцы из агроэкологической группы «степеньные мягкие озимые пшеницы (банатки)»: 1 – к-26550, 2 – к-26582, 3 – к-31919, 4 – к-33922, 5 – к-39008, 6 – к-8518, 7 – к-457, 8 – к-2167, 9 – к-2606, 10 – к-3902; М – маркер молекулярного веса 100 пн (GeneRuler DNA Ladder, Fermentas)

Figure. Identification of the 380 bp diagnostic fragment of the *Xfcp623* marker of the *Tsn1* gene in wheat landraces.

Accessions from the agroecological group of “steppe winter bread wheat (Banatka wheats)”: 1 – k-26550, 2 – k-26582, 3 – k-31919, 4 – k-33922, 5 – k-39008, 6 – k-8518, 7 – k-457, 8 – k-2167, 9 – k-2606, 10 – k-3902; M – 100 bp molecular weight marker (GeneRuler DNA Ladder, Fermentas)

Таблица 4. Встречаемость доминантных и рецессивных аллелей гена *Tsn1* у образцов стародавней озимой мягкой пшеницы из разных агроэкологических групп**Table 4.** Occurrence of dominant and recessive alleles of the *Tsn1* gene in winter bread wheat landraces from different agroecological groups

Агроэкологическая группа по Н. И. Вавилову (Vavilov, 1964)	Число образцов с аллелями / Number of accessions with alleles	
	<i>Tsn1Tsn1</i>	<i>tsn1tsn1</i>
Кашгарская мягкая пшеница	1	
Нахичеванская мягкая пшеница	1	1
Белуджистанская	1	
Кашмирская	7	2
Северокитайская	–	1
Южнокитайская	2	2
Озимая горная мягкая кавказская пшеница	5	7
Предгорная азербайджано-дагестанская группа мягких пшениц	8	2
Степная мягкая озимая пшеница (банатки)	8	5
Североевропейские лесные безостые мягкие пшеницы (сандомирки)	2	8
Южноевропейская крупнозерная мягкая пшеница	–	1
Альпийская группа местных озимых и яровых сортов мягкой горной пшеницы	2	1
Всего	37	30

пшеницы (сандомирки)» – *tsn1tsn1*, а в группах «степная мягкая озимая пшеница (банатки)» и «озимая горная мягкая кавказская пшеница» образцы с доминантными и рецессивными аллелями встречались примерно в равных пропорциях.

Устойчивыми или умеренно устойчивыми (реакция на заражение R или MR) к двум популяциям возбудителя желтой пятнистости, а также к упомянутому во «Введении» изоляту из Краснодарского края (Kornuyukhin et al., 2013) были 17 образцов. Они отнесены нами к источникам устойчивости. Среди них девять образцов имели генотип *tsn1tsn1*, остальные восемь – *Tsn1Tsn1* (табл. 5). В основном это были образцы из трех агроэкологических групп: «степная озимая мягкая пшеница (банатки)», «североевропейские лесные безостые мягкие пшеницы (сандомирки)» и «озимая горная мягкая кавказская пшеница».

Чтобы выяснить, достоверна или нет сопряженность между присутствием/отсутствием диагностического фрагмента маркера *Xfcp623* гена *Tsn1* и устойчивостью/восприимчивостью к Ptr при заражении инокулятами двух популяций, образцы были объединены в группы с учетом выявленных у них аллельных форм гена *Tsn1* и устойчивости/восприимчивости к патогену (табл. 6) и методом «хи-квадрат» проведена оценка достоверности сопряженности признаков. Вычисленные значения хи-квадрата с поправкой Йейтса для каждой популяции патогена были меньше, чем критическое значение при доверительном уровне $P_1 = 0,95$ ($\chi^2 = 3,841$, $df = 1$), следовательно нулевую гипотезу, что признаки не связаны друг с другом, отвергнуть нельзя.

Обсуждение результатов

При заражении 67 образцов стародавней озимой мягкой пшеницы смесями изолятов, выделенных из тамбовской и ленинградской популяций возбудителя желтой пятнистости 2021 года, были выявлены устойчивые, умеренно устойчивые и восприимчивые образцы. К группе устойчивых, с реакцией на заражение R или MR, мы отнесли 17 образцов, которые также были устойчивыми или умеренно устойчивыми при заражении изолятом из Краснодарского края (см. Kornuyukhin et al., 2013). Именно эти образцы определены как источники устойчивости.

С помощью ДНК-маркера *Xfcp623* вся выборка образцов была проверена на наличие доминантного аллеля гена чувствительности *Tsn1* к основному фактору патогенности гриба – токсину Ptr ToxA, индуцирующему некроз на листьях восприимчивых сортов. Показано, что реакция образца в ответ на заражение популяциями патогена, включающими изоляты, несущие ген *ToxA*, прямо не связана с аллельным состоянием гена *Tsn1*. Этот вывод иллюстрируют и данные по генотипам источников устойчивости (см. табл. 5).

Известно, что ген *Tsn1* длиной 10581 пн имеет восемь экзонов. Предсказанный на основании его последовательности белок состоит из 1490 аминокислот и содержит три высококонсервативных домена. Первые пять экзонов гена кодируют домен белка S/TPK (Serine/Threonine Protein Kinase), представляющий серин/треониновую протеинкиназу, которая является фактором активации транскрипции и других сигнальных путей. Шестой экзон контролирует второй домен белка NBS (the N-terminal

Таблица 5. Разнообразие образцов – источников устойчивости к желтой пятнистости по аллелям гена *Tsn1*
Table 5. Diversity of accessions – sources of tan spot resistance – in alleles of the *Tsn1* gene

Номер по каталогу ВИР / VIR catalogue No.	Образец / Accession	Генотип образца / Accession's genotype	Степень устойчивости к популяциям Ptr / Level of resistance to Ptr populations	
			Тамб-21	Лен-21
Кашгарская мягкая пшеница				
43251	Яркендская	<i>Tsn1Tsn1</i>	MR	MR
Нахичеванская				
18719	–	<i>tsn1tsn1</i>	R	MR
Кашмирская				
23956	Pr 6	<i>tsn1tsn1</i>	R	MR
Озимая горная мягкая кавказская пшеница				
11225	–	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
18104	–	<i>Tsn1 Tsn1</i>	MR	MR
23924	Гюльгери	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
35921	Долис пури	<i>Tsn1 Tsn1</i>	MR	R
40182	Гюльгери	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
Степная озимая мягкая пшеница (банатки)				
457	Банатка поздняя	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
3902	Красная	<i>Tsn1 Tsn1</i>	MR	MR
8518	Московская 2411	<i>Tsn1 Tsn1</i>	R	R
26550	Banatka	<i>Tsn1 Tsn1</i>	MR	MR
Североевропейские лесные безостые мягкие пшеницы (сандомирки)				
622	Sandomierka	<i>tsn1tsn1</i>	MR	R
9463	Sandomierka	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
9815	Sandomierka	<i>Tsn1 Tsn1</i>	MR	MR
14977	Sandomierka	<i>tsn1tsn1</i>	MR	MR
Альпийская группа местных озимых и яровых сортов мягкой горной пшеницы				
25064	Ble Rouge de Vaumarcus	<i>Tsn1 Tsn1</i>	R	R

Таблица 6. Сопряженность между наличием/отсутствием диагностического фрагмента маркера *Xfcp623* и устойчивостью/восприимчивостью к возбудителю желтой пятнистости

Table 6. Association between the presence/absence of the *Xfcp623* diagnostic fragment and tan spot resistance/susceptibility

Популяция патогена Pathogen population	Генотип образца / Accession's genotype	Число образцов с фенотипом / Number of accessions with the phenotype		χ^2
		R + MR	S	
Тамб-21	<i>Tsn1Tsn1</i>	26	11	2.918
	<i>tsn1tsn1</i>	14	16	
Лен-21	<i>Tsn1Tsn1</i>	20	17	0,001
	<i>tsn1tsn1</i>	17	13	

Nucleotide-Binding Site) сигнальной области, обеспечивающей связь с нуклеотидами и обладающей функцией АТФ-азы. Седьмой кодирует повторяющиеся 24 раза белковые последовательности с высоким содержанием лейцина (Leucine-Rich Repeats), которые служат рецептором, связывающимся с элиситором патогена. Последний восьмой экзон не кодирует очевидных консервативных доменов (Faris et al., 2010).

Показано, что все три домена необходимы для чувствительности к токсинам и, следовательно, восприимчивости к болезни (Faris et al., 2010). Поскольку использованный для оценки аллелей гена *Tsn1* маркер *Xfcp623* локализован в 5-м интроне, устойчивость образцов с генотипом *Tsn1Tsn1*, можно объяснить либо наличием мутаций, изменивших какой-либо из доменов, либо нарушением экспрессии самого гена *Tsn1*. Устойчивость образцов с генотипом *Tsn1Tsn1* также может быть связана с наличием генов неспецифической устойчивости. Следует отметить, что для образцов с генотипом *tsn1tsn1*, обладающих расоспецифической устойчивостью, также нельзя исключить присутствие генов неспецифической устойчивости. Источники устойчивости к желтой пятнистости с доминантными и рецессивными аллелями *Tsn1* различаются по механизму устойчивости к изолятам Ptr, продуцирующим токсин Ptr ToxA, и поэтому каждый из них по-своему ценен для селекции.

Из всей выборки проанализированных нами образцов стародавней мягкой пшеницы лишь образцы предгорной азербайджано-дагестанской группы мягких пшениц в основном реагировали в ответ на инокуляцию Ptr в соответствии с представлениями о комплементарности генов *Tsn1* и *ToxA*. Известно, что взаимоотношения в патосистеме «мягкая пшеница – *P. tritici-repentis*» осуществляются по типу «ген-на-ген» в зеркальном отражении, то есть следует ожидать, что изоляты, несущие ген *ToxA* и продуцирующие некроз-индуцирующий токсин, должны вызывать реакцию восприимчивости у сортов, имеющих в своем генотипе доминантный аллель *Tsn1* (Strelkov, Lamari, 2003; Ciuffetti et al., 2010). Для образцов из других агроэкологических групп не наблюдали достоверной связи между наличием/отсутствием доминантного аллеля *Tsn1* и устойчивостью/восприимчивостью к желтой пятнистости.

Из литературы известно, что экспрессия некоторых генов восприимчивости растений и генов – эффекторов патогенов, включая *Tsn1* и *ToxA*, регулируется циркадными ритмами и светом (Faris et al., 2010; Oliver et al., 2012; McDonald, Solomon, 2018). Предполагают, что с помощью вариаций длин волн света можно контролировать или предотвращать вспышки заболеваний растений (Breen et al., 2023). Полученные нами данные о дифференциации стародавней озимой мягкой пшеницы, относящейся к разным агроэкологическим группам, по присутствию/отсутствию доминантных аллелей *Tsn1* и устойчивости/восприимчивости к желтой пятнистости могут быть использованы при подборе исходного материала для более углубленного изучения особенностей взаимодействия этого патогена и растения-хозяина, а также влияния на них внешних условий.

Заключение

По результатам оценки устойчивости к возбудителю желтой пятнистости выделены 17 образцов стародавней пшеницы (к-457, к-622, к-3902, к-8518, к-9463, к-9815, к-11225, к-14977, к-18104, к-18719, к-23924, к-23956,

к-25064, к-26550, к-35921, к-40182, к-43251), устойчивых или умеренно устойчивых к популяциям патогена Тамб-21 и Лен-21, а также к ранее использованному изоляту из Краснодарского края. Это позволяет считать образцы источниками устойчивости к этому экономически значимому заболеванию пшеницы. Отмечены образцы с реакцией R к обеим популяциям – к-8518 (Московская 2411, Россия, Московская обл.) и к-25064 (Rouge de la Venoge, Швейцария).

Доминантный аллель гена восприимчивости *Tsn1* к *P. tritici-repentis* найден у 55% образцов изученной выборки стародавней озимой мягкой пшеницы, которые относятся к различным агроэкологическим группам по классификации Н. И. Вавилова (Vavilov, 1964).

На исследованной выборке образцов не обнаружено достоверной связи между выявленным с помощью маркера *Xfcp623* аллельным состоянием гена *Tsn1* у образца и его реакцией в ответ на заражение популяциями патогена, включающими изоляты с геном *ToxA*.

References / Литература

- Ahmadi H., Solouki M., Fazeli-Nasab B., Heidari F., Sayyed R.Z. Internal Transcribed Spacer (ITS) regions: a powerful tool for analysis of the diversity of wheat genotypes. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2022;60(2022):137-143.
- Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology*. 2007;97(6):694-701. DOI: 10.1094/PHYTO-97-6-0694
- Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1989;35(3):203-213. DOI: 10.1016/0885-5765(89)90051-9
- Breen S., McLellan H., Birch P.R.J., Gilroy E.M. Tuning the wavelength: manipulation of light signaling to control plant defense. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(4):3803. DOI: 10.3390/ijms24043803
- Ciuffetti L.M., Manning V.A., Pandelova I., Betts M.F. Host-selective toxins, Ptr ToxA and Ptr ToxB, as necrotrophic effectors in the *Pyrenophora tritici-repentis*-wheat interaction. *New Phytologist*. 2010;187(4):911-919. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2010.03362.x
- Ciuffetti L.M., Tuori R.P., Gaventa J.M. A single gene encodes a selective toxin causal to the development of tan spot of wheat. *The Plant Cell*. 1997;9(2):135-144. DOI: 10.1105/tpc.9.2.135
- Cseh A., Poczai P., Kiss T., Balla K., Berki Z., Horváth Á. et al. Exploring the legacy of Central European historical winter wheat landraces. *Scientific Reports*. 2021;11(1):23915. DOI: 10.1038/s41598-021-03261-4
- Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S. et al. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(30):13544-13549. DOI: 10.1073/pnas.1004090107
- Korniyukhin D.L., Mitrofanova O.P., Mikhailova L.A., Kovalenko N.M. Genetic diversity of landraces and old local cultigens of bread wheat for resistance to leaf blotch, tan spot, and spot blotch (catalogue) (Genofond staromestnykh i starodavnikh selektsionnykh sortov myagkoj pshenitsy po ustoychivosti k buroy rzhavchine, zheltoy i temno-buroy pyatnistosti [katalog]). St. Petersburg: VIZR; 2013. [in Russian] (Корнюхин Д.Л., Митрофанова О.П.,

- Михайлова Л.А., Коваленко Н.М. Генофонд староместных и стародавних селекционных сортов мягкой пшеницы по устойчивости к бурой ржавчине, желтой и темно-бурой пятнистости (каталог). Санкт-Петербург: ВИЗР; 2013).
- Lamari L., Bernier C.C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction. *Phytopathology*. 1989;79:740-744.
- McDonald M.C., Solomon P.S. Just the surface: advances in the discovery and characterization of necrotrophic wheat effectors. *Current Opinion in Microbiology*. 2018;46:14-18. DOI: 10.1016/j.mib.2018.01.019
- Mikhailova L.A., Gulyaeva E.I., Kokorina N.M. Laboratory methods of cultivation of wheat tan spot causal agent *Pyrenophora tritici-repentis* (Laboratornye metody kultivirovaniya vzbuditelya zheltoy pyatnistosti pshenitsy *Pyrenophora tritici-repentis*). *Mycology and Phytopathology*. 2002;36(1):63-67. [in Russian] [Михайлова Л.А., Гульяева Е.И., Кокорина Н.М. Лабораторные методы культивирования возбудителя желтой пятнистости пшеницы *Pyrenophora tritici-repentis*. *Микология и фитопатология*. 2002;36(1):63-67).
- Mikhailova L.A., Kovalenko N.M. Characterization of bread and durum wheat resistance to the *Pyrenophora tritici-repentis* pathogen (Kharakteristika ustoychivosti myagkoy i tverday pshenitsy k vzbuditelyu zheltoy pyatnistosti *Pyrenophora tritici-repentis*). *Plant Protection News*. 2009;(1):10-15. [in Russian] [Михайлова Л.А., Коваленко Н.М. Характеристика устойчивости мягкой и твердой пшеницы к возбудителю желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis*. *Вестник защиты растений*. 2009;(1):10-15).
- Murray M.G., Thompson W.F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*. 1980;8(19):4321-4325. DOI: 10.1093/nar/8.19.4321
- Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., Solomon P.S. *Stagonospora nodorum*: from pathology to genomics and host resistance. *Annual Review of Phytopathology*. 2012;50:23-43. DOI: 10.1146/annurev-phyto-081211-173019
- Rees R.G., Platz G.J., Mayer R.J. Susceptibility of Australian wheats to *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australian Journal of Agricultural Research*. 1987;39:141-151.
- Strelkov S., Lamari L. Host-parasite interactions in tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) of wheat. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2003;25(4):339-349. DOI: 10.1080/07060660309507089
- Tehseen M.M., Tonk F.A., Tosun M., Istipliler D., Amri A., Sansaloni C.P. et al. Exploring the genetic diversity and population structure of wheat landrace population conserved at ICARDA Genebank. *Frontiers in Genetics*. 2022;13:900572. DOI: 10.3389/fgene.2022.900572
- Tomas A., Feng G.H., Reeck G.R., Bockus W.W., Leach J.E. Purification of a cultivar-specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1990;3(4):221-224.
- Tuori R.P., Wolpert T.J., Ciuffetti L.M. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 1995;8(1):41-48. DOI: 10.1094/mpmi-8-0041
- Vavilov N.I. World resources of cereals, grain leguminous crops and flax and their utilization in plant breeding. Agroecological survey of the principal field crops. Moscow; Leningrad: USSR Academy of Sciences; 1957. [in Russian] (Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. Опыт агроэкологического обзора важнейших полевых культур. Москва; Ленинград: АН СССР; 1957).
- Vavilov N.I. World resources of cereals, grain leguminous crops and flax and their utilization in plant breeding. Wheat (Mirovye resursy sortov khlebnykh zlakov, zernovykh bobovykh, lna i ikh ispolzovaniye v selektsii. Pshenitsa). Moscow; Leningrad: Nauka; 1964. [in Russian] (Вавилов Н.И. Мировые ресурсы сортов хлебных злаков, зерновых бобовых, льна и их использование в селекции. Пшеница. Москва; Ленинград: Наука; 1964).
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. London: Academic Press; 1990. p.315-322.
- Zaitsev G.N. Mathematical statistics in experimental botany (Matematicheskaya statistika v eksperimentalnoy botanike). Moscow: Nauka; 1984. [in Russian] (Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. Москва: Наука; 1984).

Информация об авторах

Нина Васильевна Мироненко, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, nina2601mir@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3383-2973>

Надежда Михайловна Коваленко, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, nadyakov@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9577-8816>

Ольга Александровна Баранова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, 3, baranova_oa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9439-2102>

Ольга Павловна Митрофанова, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42, 44, o.mitrofanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9171-2964>

Information about the authors

Nina V. Mironenko, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbel'skogo Hwy, Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, nina2601mir@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3383-2973>

Nadezhda M. Kovalenko, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, nadyakov@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9577-8816>

Olga A. Baranova, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, All-Russian Research Institute of Plant Protection, 3 Podbelskogo Hwy., Pushkin, St. Petersburg 196608, Russia, baranova_oa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9439-2102>

Olga P. Mitrofanova, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42, 44 Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg 190000, Russia, o.mitrofanova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9171-2964>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 07.08.2023; одобрена после рецензирования 23.10.2023; принята к публикации 05.12.2023.
The article was submitted on 07.08.2023; approved after reviewing on 23.10.2023; accepted for publication on 05.12.2023.