Вавиловский журнал генетики и селекции. 2020;24(7):722-729
DOI 10.18699/VJ20.666

Структура популяции *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и идентификация устойчивой к пиренофорозу гермоплазмы пшеницы

А.М. Кохметова[1, 3] ✉, Н.М. Коваленко[2], М.Т. Кумарбаева[1, 3]

[1] Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан
[2] Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Пушкин, Санкт-Петербург, Россия
[3] Казахский национальный аграрный университет, Алматы, Казахстан
✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

Аннотация. Возбудитель пиренофороза *Pyrenophora tritici-repentis* – одна из наиболее вредоносных болезней листовых пятнистостей пшеницы. В последние годы отмечаются нарастающее распространение и вредоносность пиренофороза в Казахстане. Расовый состав *P. tritici-repentis* претерпевает изменения из-за климатических и средовых флуктуаций, а также из-за все более усиливающейся тенденции возделывания одних и тех же сортов пшеницы на больших территориях. В настоящее время имеется лишь ограниченная информация о расовой структуре популяции *P. tritici-repentis* в Казахстане. Целью исследований были изучение популяций *P. tritici-repentis* по расовому составу на юго-востоке Республики Казахстан, а также идентификация устойчивых к пиренофорозу образцов пшеницы. Коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы, включающая перспективные линии и сорта из Казахстана и из международных центров CIMMYT и ICARDA, была подвергнута оценке устойчивости к возбудителю пиренофороза в теплице и охарактеризована с использованием молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для гена *Tsn1*. Моноконидиальные изоляты *P. tritici-repentis*, выделенные из популяции патогена юго-восточного региона, были отнесены к определенным расам на основе проявления симптомов некроза/хлороза с использованием стандартных образцов-дифференциаторов (Glenlea, 6B662, 6B365). Идентифицировано пять рас *P. tritici-repentis*, включающих расы 1, 2, 3, 7 и 8. Показано, что доминируют расы 1 и 8 *P. tritici-repentis*. В результате анализа частоты встречаемости рас возбудителя желтой пятнистости *P. tritici-repentis* установлено, что доминирующей оказалась раса 1 (50 %), продуцирующая Ptr ToxA и Ptr ToxB, и раса 8 (35 %), продуцирующая Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC. С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили нечувствительность к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских линий: 4_PSI, 10204_2_KSI, 10204_3_KSI, 10205_2_KSI, 10205_3_KSI, 605_SP2, 632_SP2, Dana и семь зарубежных линий: KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003. Результаты этого исследования представляют интерес для программы селекции пшеницы на устойчивость к пиренофорозу.
Ключевые слова: пшеница; пиренофороз; расы; молекулярные маркеры; *Tsn1*; ToxA.

Для цитирования: Кохметова А.М., Коваленко Н.М., Кумарбаева М.Т. Структура популяции *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и идентификация устойчивой к пиренофорозу гермоплазмы пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2020;24(7):722-729. DOI 10.18699/VJ20.666

Pyrenophora tritici-repentis population structure in the Republic of Kazakhstan and identification of wheat germplasm resistant to tan spot

A.M. Kokhmetova[1, 3] ✉, N.M. Kovalenko[2], M.T. Kumarbaeva[1, 3]

[1] Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan
[2] All-Russian Research Institute of Plant Protection, Pushkin, St. Petersburg, Russia
[3] Kazakh National Agrarian University, Almaty, Kazakhstan
✉ e-mail: gen_kalma@mail.ru

Abstract. *Pyrenophora tritici-repentis* is a causative agent of tan spot in wheat. In recent years, there has been an increasing spread and harmfulness of wheat tan spot. The aim of the research was to study the racial composition of the *P. tritici-repentis* population in the Republic of Kazakhstan. A collection of 30 common wheat accessions, including promising lines and cultivars from Kazakhstan and CIMMYT–ICARDA, was assessed for resistance to *P. tritici-repentis* in a greenhouse and characterized using the *Xfcp623* molecular marker, diagnostic for the *Tsn1* gene. Monosporic isolates of *P. tritici-repentis* isolated from the southeastern region were assigned to certain races based on the manifestation of symptoms of necrosis/chlorosis on standard differentials (Glenlea, 6B662, 6B365). Five races of *P. tritici-repentis* have been identified, including races 1, 2, 3, 7 and 8. It has been shown that races 1 and 8 of

© Кохметова А.М., Коваленко Н.М., Кумарбаева М.Т., 2020
Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

P. tritici-repentis are dominant. As a result of the analysis of the frequency of occurrence of the *P. tritici-repentis* races, it was found that race 1 (50 %) producing Ptr ToxA and Ptr ToxB and race 8 (35 %) producing Ptr ToxA, Ptr ToxB and Ptr ToxC turned out to be dominant. From a practical point of view, of greatest interest are 16 wheat samples, which demonstrated resistance to race 1 and confirmed insensitivity to Ptr ToxA in a molecular screening. These include eight Kazakhstani (4_PSI, 10204_2_KSI, 10204_3_KSI, 10205_2_KSI, 10205_3_KSI, 605_SP2, 632_SP2, Dana) and seven foreign lines (KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003). The results of this study are of interest in wheat breeding programs for tan spot resistance.
Key words: wheat; tan spot; races; molecular markers; *Tsn1*; ToxA.

For citation: Kokhmetova A.M., Kovalenko N.M., Kumarbaeva M.T. *Pyrenophora tritici-repentis* population structure in the Republic of Kazakhstan and identification of wheat germplasm resistant to tan spot. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2020;24(7):722-729. DOI 10.18699/VJ20.666

Введение

Одна из основных причин недобора урожая пшеницы в Казахстане – болезни с воздушно-капельной инфекцией. Доминирующее положение в составе патогенного комплекса пшеницы на юге и юго-востоке Казахстана занимают ржавчинные грибы (желтая, стеблевая и бурая ржавчины) (Kokhmetova et al., 2011, 2016, 2018; Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S., 2018), а также болезни листовых пятнистостей (пиренофороз и септориоз) (Kokhmetova et al., 2017, 2019; Кохметова и др., 2018).

Возбудитель пиренофороза пшеницы – гриб *Pyrenophora tritici-repentis*, который относится к классу Ascomycetes, подклассу плодосумчатых, порядку Dothidiales, семейству Pleorosporaceae. Кроме пшеницы, *P. tritici-repentis* поражает более 60 видов кормовых и дикорастущих злаковых трав (Койшибаев, 2010; Мироненко, Коваленко, 2018). Заболевание проявляется на листьях и листовых влагалищах злаков в виде мелких одиночных или многочисленных пятен овальной или округлой формы, желтой или светло-коричневой окраски, вокруг пятна формируется хлоротичная зона. Источником первичной инфекции служат сумкоспоры гриба, вторичной инфекции – конидии, которые переносятся ветром (Поспехов, 1989).

Вредоносность болезней заключается в уменьшении ассимиляционной поверхности, возрастании транспирации, снижении накопления органического вещества, поражении всех надземных органов растений, потере качества зерна из-за формирования невыполненного зерна. В условиях, благоприятных для развития заболевания, отмечены потери более 50 % (Shabeer, Bockus, 1988) *P. tritici-repentis* (PTR) (Died.), возбудитель пиренофороза, индуцирует два различных симптома на восприимчивых сортах – некроз и хлороз. Генетически оба симптома находятся под независимым контролем хозяина. В настоящее время в мире идентифицированы восемь рас PTR, основанных на способности индуцировать симптомы некроза и хлороза на наборе сортов-дифференциаторов пшеницы. Комплексные стратегии борьбы с болезнями, такие как возделывание устойчивых сортов, в сочетании с желаемыми севооборотами и практикой управления – наиболее эффективные, экологически чистые и экономичные средства для борьбы с пиренофорозом пшеницы (Singh et al., 2010).

Гриб *P. tritici-repentis* распространен во всех основных регионах, возделывающих пшеницу. Возбудитель пиренофороза зарегистрирован в Австралии, Канаде, Соединенных Штатах Америки, Южной Америке, Румынии, Молдавии, Англии, Казахстане, Украине, Белоруси, Средней Азии (Михайлова и др., 2012). Первые сведения о распространении *P. tritici-repentis* в Средней Азии представлены Б.А. Хасановым в начале 1980-х гг. (Postnikova, Khasanov, 1997). Мониторинг пшеничных полей в Центральной Азии и Казахстане в 2003 г. показал, что в наибольшей степени пиренофороз распространен на озимой пшенице, при этом интенсивность поражения могла достигать от 50 до 100 % (Койшибаев, 2002; Lamari et al., 2005).

Реакция совместимости между расой *P. tritici-repentis* и соответствующим дифференциатором реализуется через посредника – хозяин-специфичный токсин (Host Selective Toxins, HST). К настоящему времени охарактеризованы четыре HST: один токсин, индуцирующий некроз, Ptr ToxA, два токсина, индуцирующих хлороз, Ptr ToxB и Ptr ToxC, и один токсин, вызывающий и некроз, и хлороз, Ptr ToxD (Balance et al., 1989; Orolaza et al., 1995; Ali et al., 2010).

Исследования структуры популяции *P. tritici-repentis* в Казахстане ведутся с начала 2000-х гг. и продолжаются в настоящее время (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006; Kokhmetova et al., 2016, 2017). Наибольшее разнообразие расового состава в популяции патогенов отмечено в Азербайджане, где были идентифицированы расы 1, 2, 3, 5, 7 и 8, и в Сирии, где наблюдались расы 1, 3, 5, 7 и 8 (Lamari et al., 2005). Раса 1 наиболее распространена в Центральной Азии и Казахстане (87 %), а расы 2, 3 и 4 отмечаются реже (Zhanarbekova et al., 2005; Maraite et al., 2006). Ранее нами проводилось сравнительное изучение сходства и различия популяций *P. tritici-repentis* по вирулентности и расовому составу в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России, где показано, что в последние годы раса 8 часто встречалась в Казахстане (Кохметова и др., 2016; Kokhmetova et al., 2017).

Наследование устойчивости к пиренофорозу носит как количественный, так и качественный характер, а гены устойчивости к токсинам и локусы количественных признаков (QTL) являются расоспецифическими и контролируют процесс, снижающий чувствительность к токсинам (Михайлова и др., 2012). Были идентифицированы шесть главных генов устойчивости к пиренофорозу *Tsr1–Tsr6*, локализованных на хромосомах 2BS, 3AS, 3BL, 3DS и 5BL (McIntosh et al., 2013). В обзоре P.K. Singh с коллегами (2016) указывается, что многочисленные генетические исследования с анализом QTL продемонстрировали, что устойчивость к пиренофорозу наследуется как полигенный признак, при этом главные расоспецифичные гены, от *Tsr1* до *Tsr6*, часто объясняют эффекты этих локусов

(Singh S. et al., 2008; Singh P.K. et al., 2016). Дополнительные QTL были идентифицированы и локализованы на хромосомах 1AL, 2AS, 3AS (Singh S. et al., 2008), 4AL, 5AL, 1BS, 2BL, 3BS, 3BL, 5BL, 2DS, 2DL и 7DS (Singh P. et al., 2016).

Для повышения эффективности селекции на устойчивость к пиренофорозу необходимо выявлять перспективные линии пшеницы, характеризующиеся разнообразием по генам устойчивости к болезни, а затем размещать их на территории распространения болезни. Поскольку под влиянием абиотических и биотических факторов в природе происходят постоянные изменения расового состава возбудителей болезней, необходим регулярный анализ структуры популяций патогена. Это позволяет оценить динамику изменчивости расового состава в популяции и определить изоляты с новым спектром вирулентности.

Целью наших исследований было изучение расового состава популяции *P. tritici-repentis* из юго-восточного региона Республики Казахстан, а также поиск источников устойчивости к пиренофорозу в коллекции образцов пшеницы.

Материалы и методы

Для определения ареала распространения и вредоносности *Pyrenophora tritici-repentis* пораженные образцы листьев пшеницы рандомизированно собирали в юго-восточных регионах возделывания озимой мягкой пшеницы в 2018 г. в Алматинской области Республики Казахстан. Анализ фитосанитарного состояния посевов пшеницы проводили в период колошения и молочно-восковой спелости зерна (июнь).

Объектом исследования была коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, включающая перспективные линии и сорта казахстанской и зарубежной селекции, в том числе 17 казахстанских и 13 образцов из CIMMYT–ICARDA (см. табл. 2). Изучение коллекции пшеницы направлено на поиск источников устойчивости к PTR на основе оценки ювенильной устойчивости к доминирующим расам гриба, изучения полевой (возрастной) устойчивости и молекулярного скрининга к токсинам *P. tritici-repentis*. Сорт Salamouni (Lebanon) использован в качестве невосприимчивого контроля для расы 1 пиренофороза и токсина Ptr ToxA, Glenlea (Canada) – в качестве восприимчивого контроля для расы 1 и токсина Ptr ToxA.

Оценку полевой устойчивости к пиренофорозу проводили в условиях Казахского научно-исследовательского института земледелия и растениеводства (КазНИИЗиР), (Алмалыбак, 43°13′09″ N, 76°36′17″ E, Алматинская область) в 2019–2020 гг. Растения выращивали на делянках размером 1 м^2 по рандомизированному дизайну с двумя повторностями. Поражение растений оценивали в условиях искусственного инфекционного фона на флаговых листьях в фазы GS 65-69 по шкале J.C. Zadoks с коллегами (1974). Инфекционный фон создавался с помощью зараженной пиренофорозом соломы (1 кг/м^2). Уровень устойчивости оценивали по шкале 1–100 % (Saari, Prescott, 1975). В качестве контроля использованы стандартные сорта-дифференциаторы болезни: Glenlea (чувствительный контроль) и Salamouni (устойчивый контроль).

Дифференциация рас осуществлена в соответствии с классификацией, предложенной L. Lamari и C.C. Bernier (1998), с использованием канадского набора дифференциаторов болезни (сорт пшеницы Glenlea и линии 6B662 и 6B365). Токсин Ptr ToxA индуцирует образование некрозов на сорте пшеницы Glenlea, а токсины Ptr ToxB и Ptr ToxC – образование хлорозов на линиях 6B365 и 6B662.

Моноконидиальные изоляты гриба выделяли из инфекционного материала пшеницы, собранного на производственных и селекционных полях юго-восточного региона Республики Казахстан по методу Л.А. Михайловой с коллегами (2012). Для изучения расового состава казахстанской популяции *P. tritici-repentis* использовали 20 моноконидиальных изолятов. Изучение структуры популяции по расовому составу и вирулентности проводили с помощью метода отрезков листьев, помещенных в 0.004 % раствор бензимидазола (Михайлова и др., 2012). Оценку проростковой устойчивости выполняли также с использованием бензимидазольного метода. Степень развития заболевания оценивали на 7–8-е сутки, при этом сорта с проявлением некротической реакции 1–2 балла относили к устойчивым (R), а с типом реакции некроза 3–5 баллов – к восприимчивым (S) образцам (Lamari, Bernier, 1989). На линиях 6B365 и 6B662 оценивали наличие или отсутствие хлороза.

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из 5-дневных проростков пшеницы с помощью CTAB-метода (Riede, Anderson, 1996). Для идентификации носителей генов устойчивости применен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, фланкирующими диагностические маркеры генов, и образцами ДНК коллекции из 30 образцов пшеницы мягкой (*T. aestivum* L.). Сорта-носители гена *Tsn1*, чувствительного к токсину Ptr Tox A, выявляли на основе ПЦР с использованием SSR-маркера *Xfcp623* (Zhang et al., 2009; Faris et al., 2010). Маркер имеет два аллеля: 380 п. н. (ассоциированный с чувствительностью, доминантным аллелем гена *Tsn1*) и нуль-аллель (ассоциированный с нечувствительностью, рецессивным аллелем гена *tsn1*) (Zhang et al., 2009). Состав реакционной смеси и условия ПЦР соответствовали протоколу (Roder et al., 1998). Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 % агарозном геле в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1мМ EDTA, pH 8) (Chen et al., 1998). Визуализацию гелей выполняли в гель-документирующей системе Mega Bio-Print 1100/26M, Vilber Lourmat.

Результаты

Для изучения расового состава казахстанской популяции *P. tritici-repentis* проанализировано 20 моноконидиальных изолятов. С использованием дифференциальных линий и сортов из Канады 20 изолятов гриба были охарактеризованы как относящиеся к определенным расам *P. tritici-repentis*, представленным в табл. 1. В соответствии с общепринятой классификацией рас (Lamari et al., 1998), изоляты были отнесены к расе 1 как индуцирующие токсины Ptr ToxA и Ptr ToxC, к расе 2 (Ptr ToxA), расе 3 (Ptr ToxC), расе 4 (не индуцирующей токсины), расе 5 (Ptr ToxB), расе 6 (Ptr ToxB и Ptr ToxC), расе 7 (Ptr ToxA и Ptr ToxB) и расе 8 (Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC).

Таблица 1. Определение рас изолятов *P. tritici-repentis* из юго-востока Казахстана на канадском наборе сортов-дифференциаторов

Номер изолята (номер каталога)	Реакция сортов-дифференциаторов на инокуляцию *P. tritici-repentis*			Номер расы
	Glenlea	6B662	6B365	
1-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
2-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
3-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
4-Ю-KZ	ToxA	ToxB	ToxC	8
5-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
6-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
7-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
8-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	R	7
9-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
10-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
11-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
12-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
13-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
14-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
15-Ю-KZ	R	R	Cl (ToxC)	3
16-Ю-KZ	N (ToxA)	Cl (ToxB)	Cl (ToxC)	8
17-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
18-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
19-Ю-KZ	N (ToxA)	R	Cl (ToxC)	1
20-Ю-KZ	N (ToxA)	R	R	2

Примечание. Проявление симптомов: N – некроза, Cl – хлороза; R – отсутствие реакции на заражение *P. tritici-repentis.*

В результате анализа частоты встречаемости рас возбудителя желтой пятнистости *P. tritici-repentis* установлено, что в изолятах из юго-востока Казахстана доминирующей оказалась раса 1 (50 %), продуцирующая Ptr ToxA и Ptr ToxB, и раса 8 (35 %), продуцирующая Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC. Расы 4, 5 и 6 не встречались в изученных выборках популяции *P. tritici-repentis*. Таким образом, в юго-восточном регионе Казахстана идентифицировано пять рас *P. tritici-repentis*: 1, 2, 3, 7 и 8.

В лабораторных условиях были проведены инокуляция и оценка 30 перспективных линий и сортов озимой мягкой пшеницы (табл. 2). Поскольку большая часть собранного на юго-востоке Казахстана инфекционного материала *P. tritici-repentis* была отнесена к изолятам расы 1, продуцирующей токсин ToxA (см. табл. 1), то для скрининга материала пшеницы нами использован изолят расы 1. С этой целью проведен анализ образцов пшеницы к изоляту казахстанской популяции гриба из южного региона (1-Ю-KZ), продуцирующему токсин Ptr ToxA (см. табл. 2).

Реакции генотипов пшеницы на изолят Ptr 1-Ю-KZ, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что наибольшей устойчивостью характеризуются пять перспективных линий, что составляет 16.6 %. В эту группу входят три казахстанских (GF_13_CP, GF_16_CP, 10204_3_KSI) и две зарубежные линии пшеницы из ICARDA–CIMMYT (KR11-9025 и GN-158/2004). Шестнадцать образцов (53.3 %) показали умеренно-устойчивую реакцию (moderate-resistant, MR). Умеренно-восприимчивый тип реакции (moderate-susceptible, MS) выявлен у трех образцов. Восприимчивый тип реакции (susceptible, S) отмечен у шести образцов, что составляет 20 % от общего числа изученного материала.

Результаты оценки полевой устойчивости к пиренофорозу показали, что развитие болезни наблюдалось в основном на нижнем и среднем ярусах растений, максимальное поражение составило 40 %. Устойчивый тип реакции (10–15 %) к болезни демонстрировали 14 линий, что составило 46.6 % от общего числа изученного материала. Высокой полевой устойчивостью к болезни характеризовались четыре линии пшеницы: GF24_CP, 10204_2_KSI, KR11-20 и 11KR-13.

Поиск генотипов-носителей аллелей генов чувствительности, *Tsn1*, и нечувствительности, *tsn1*, к токсину Ptr ToxA *P. tritici-repentis* у перспективных линий пшеницы осуществлен в результате молекулярного анализа коллекции образцов пшеницы и сравнения этих результатов со скринингом, основанным на реакции к изоляту 1-Ю-KZ, продуцирующему токсин Ptr ToxA.

Генотипирование образцов пшеницы с использованием молекулярного маркера было направлено на идентификацию носителей генов, контролирующих чувствительность и устойчивость к токсину Ptr ToxA. Маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент 380 п. н., ассоциированный с геном *Tsn1*, чувствительным к токсину Ptr ToxA у 13 образцов (43.3 %) (см. табл. 2, рисунок). Нуль-аллель маркера *Xfcp623* оказался сцепленным с нечувствительностью к токсину в 17 образцах пшеницы. Большинство образцов (76.4 %) не чувствительны к изоляту расы 1 (1-Ю-KZ), продуцирующему токсин Ptr ToxA (см. табл. 2). Степень сцепления маркера *Xfcp623* с нечувствительностью к расе 1 составила 76.4 %. Пример электрофореграммы с результатами ПЦР, отражающей наличие/отсутствие в исследуемых образцах локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA, представлен на рисунке.

Частота встречаемости аллеля маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *tsn1*, контролирующего нечувствительность к токсину Ptr ToxA, составила 56.6 % (17 образцов). Встречаемость аллелей маркера, сцепленного с доминантным аллелем гена *Tsn1*, сцепленного с чувствительностью к Ptr ToxA токсину, составила 43.3 % (13 образцов).

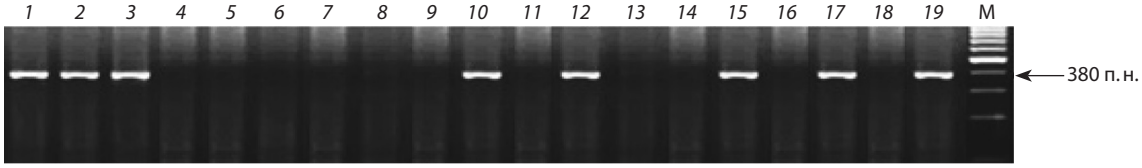
SSR-маркер *Xfcp623* амплифицировал фрагмент ДНК размером 380 п. н., ассоциированный с доминантным аллелем *Tsn1*, чувствительным к ToxA, у 13 образцов и у контроля Glenlea. Другой аллель, обнаруженный с помощью маркера *Xfcp623* у остальных образцов пшеницы (17), представлял собой нуль-аллель, характерный для не чувствительных к ToxA генотипов и указывающий на рецессивное состояние аллеля *tsn1*.

С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили невосприим-

Таблица 2. Скрининг перспективных линий озимой мягкой пшеницы из Казахстана и ICARDA-CIMMYT на проростковую и полевую устойчивость к *P. tritici-repentis*

Название	Происхождение	Устойчивость к изоляту Ptr 1-Ю-KZ, балл*	Полевая устойчивость к Ptr, %**	*Xfcp623*, *Tsn1*	
GF_13_CP	Казахстан	1/0	25	S	380
GF_16_CP		1/1	25	S	380
GF_19_CP		3/3	30	S	380
GF24_CP		3/3	5	R	null
4_PSI		2/2	10	R	null
10204_2_KSI		2/1	5	R	null
10204_3_KSI		1/1	10	R	null
10205_2_KSI		1/2	10	R	null
10205_3_KSI		3/2	10	R	null
602_SP2		2/2	25	S	380
605_SP2		2/2	10	R	null
618_SP2		2/3	30	S	380
632_SP2		2/1	10	R	null
634_SP2		3/2	10	R	null
635_SP2		2/2	30	S	380
Dana		2/2	10	R	null
Dinara		2/1	25	S	380
KR11-20	ICARDA–CIMMYT	2/1	5	R	null
KR11-03		1/2	10	R	null
KR11-9014		2/3	10	R	null
KR11-26		2/2	25	S	380
KR11-29		3/3	10	R	null
11KR-13		2/2	5	R	null
KR11-40		1/2	40	S	380
KR11-9025		1/0	15	R	null
KR12-07		1/2	30	R	null
KR12-9011		2/1	25	S	380
GN-68/2003		2/3	10	R	null
GN-143/2006		2/1	10	S	380
GN-158/2004		1/0	30	S	380
Salamouni – устойчивый контроль для расы 1 и токсина Ptr ToxA	Ливан	1/0	5	R	null
Glenlea – восприимчивый контроль для расы 1 и токсина Ptr ToxA	Канада	3/3	30	S	380

* Изолят 1-Ю-KZ, продуцирующий Ptr ToxA; над чертой – балл развития некроза; под чертой – балл развития хлороза; ** представлены средние значения процента поражения болезнью за два года (2019–2020); *Xfcp623* – SSR-маркер локуса *Tsn1*, чувствительного к Ptr ToxA, амплифицирует фрагмент ДНК 380 п. н.



Продукты амплификации ДНК образцов пшеницы с использованием диагностического маркера *Xfcp623*, сцепленного с геном *Tsn1*, определяющим чувствительность к Ptr ToxA.

1 – GF_13_CP; *2* – GF_16_CP; *3* – GF_19_CP; *4* – GF24_CP; *5* – 4_PSI; *6* – 10204_2_KSI; *7* – 10204_3_KSI; *8* – 10205_2_KSI; *9* – 10205_3_KSI; *10* – 602_SP2; *11* – 605_SP2; *12* – 618_SP2; *13* – 632_SP2; *14* – 634_SP2; *15* – 635_SP2; *16* – Dana; *17* – Dinara; *18* – Saloumoni – устойчивый контроль к Ptr Tox A; *19* – Glenlea – чувствительный контроль к PTR Tox A. M – маркер молекулярного веса (Gene-RulerTM, 100 bp DNA Ladder (Fermentas). 2 % агарозный гель.

чивость к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских линий (4_PSI, 10204_2_KSI, 10204_3_KSI, 10205_2_KSI, 10205_3_KSI, 605_SP2, 632_SP2, Dana) и семь зарубежных линий (KR11-20, KR11-03, KR11-9014, 11KR-13, KR11-9025, KR12-07, GN-68/2003).

Обсуждение

Представленные нами исследования позволили определить расовый состав изолятов *P. tritici-repentis*, установленных в 2018 г. на территории юго-востока Казахстана. Изучение расового состава казахстанской юго-восточной популяции *P. tritici-repentis* подтвердило ранее полученные результаты (Кохметова и др., 2016) и выявило доминирование рас 1 и 8 на этой территории. Анализ частоты встречаемости рас гриба показал, что в выборках изолятов из Казахстана в 2018 г. определено доминирование рас 1 и 8. В Северном Казахстане в начале 2000-х гг. были распространены раса 1 (Zhanarbekova et al., 2005) и расы 2, 3 и 4 (Maraite et al., 2006). Указанные различия расового состава в Казахстане могут быть обусловлены изменениями климатических условий в разные годы. Представленные различия в составе патогена указывают на необходимость ежегодного анализа структуры популяций патогена, для того чтобы понимать динамику ее изменчивости и ареалов распространения *P. tritici-repentis*.

Изучение структуры популяции пиренофороза в трех различных климатических зонах России позволило определить расовый состав популяций *P. tritici-repentis.* Установлено, что доминирующими были расы 1 и 2. Раса 8 встречалась во всех регионах. В популяции из Дагестана отсутствовали расы 5, 6, 7, тогда как в популяции из Западной Сибири отсутствовала раса 4 (Кремнева и др., 2007; Mikhailova et al., 2010, 2014).

Сравнительный анализ казахстанских и российских образцов популяций патогена, проведенный в 2016 г., показал, что наиболее вирулентными являются изоляты из Казахстана, а более фенотипически разнообразными – из Северо-Кавказского региона России (Кохметова и др., 2016). Авторы выявили разнообразие по вирулентности изолятов: в России идентифицированы четыре расы *P. tritici-repentis*, 1, 2, 4 и 8, а в Казахстане – пять рас, 1, 3, 4, 6 и 8. Изучение структуры популяции *P. tritici-repentis* Е.И. Гультяевой с коллегами (2018) в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане показало, что по признаку токсинообразования отмечена высокая степень сходства структуры популяций гриба из этих регионов, что указывает на единую эпидемиологическую зону.

Исследованиям, направленным на оценку устойчивости гермоплазмы пшеницы к пиренофорозу, уделяется большое внимание (Chu et al., 2008; Singh et al., 2016; Kokhmetova et al., 2017, 2019; Кохметова и др., 2018). Настоящая работа обусловлена необходимостью создания генетически разнородных источников устойчивости, которые могут быть использованы в селекции устойчивых к *P. tritici-repentis* сортов пшеницы. Эту задачу удалось решить путем применения ДНК-технологий и использования изолятов расы 1, продуцирующих наиболее распространенный в Казахстане токсин Ptr ToxA.

Ранее были разработаны молекулярные маркеры для диагностики нечувствительности к Ptr ToxA и Sn ToxA (*Xfcp393* и *Xfcp394*) (Zhang et al., 2009). После того как ген *Tsn1* был клонирован и секвенирован, был разработан доминантный SSR-маркер *Xfcp623* на внутреннюю область гена (Faris et al., 2010). Маркер *Xfcp623*, предложенный в качестве диагностического для гена *Tsn1*, считается более надежным по сравнению с ранее разработанными. Надежность диагностического маркера *Xfcp623* для выявления генотипов пшеницы с устойчивостью к патогену и нечувствительностью к Ptr ToxA показана в ряде исследований (Karelov et al., 2015; Мироненко и др., 2017). Принимая во внимание более высокую эффективность маркера *Xfcp623*, в нашем исследовании мы генотипировали гермоплазму пшеницы с использованием этого маркера.

В результате наших исследований коллекция из 30 образцов мягкой пшеницы охарактеризована с использованием молекулярного маркера *Xfcp623*, диагностического для гена *Tsn1*, связанного с чувствительностью к Ptr ToxA. С практической точки зрения наибольший интерес представляют 16 образцов пшеницы, которые демонстрировали устойчивость к расе 1 и подтвердили невосприимчивость к токсину Ptr ToxA при молекулярном скрининге. К ним относятся восемь казахстанских и семь зарубежных линий пшеницы. Чувствительность к Ptr ToxA не всегда коррелировала с восприимчивостью к расе 1 и зависела от генетического фона хозяина.

Результаты генотипирования и скрининга образцов пшеницы по устойчивости к наиболее распространенным в Казахстане изолятам *P. tritici-repentis* представляют интерес в целях повышения эффективности селекции на основе элиминации из селекционного материала носителей доминантных аллелей гена *Tsn1*, чувствительных к агрессивным токсину Ptr ToxA. Носители идентифицированного *tsn1* гена устойчивости к Ptr ToxA могут быть использованы в селекционных программах по пирамидированию генов устойчивости к болезням пшеницы.

Список литературы / References

Гультяева Е.И., Коваленко Н.М., Шаманин В.П., Тюнин В.А., Шрейдер Е.Р., Шайдаюк Е.Л., Моргунов А.И. Структура популяций листовых патогенов яровой пшеницы в западноазиатских регионах России и Северном Казахстане в 2017 г. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372.

[Gultyaeva E.I., Kovalenko N.M., Shamanin V.P., Tyunin V.A., Shreyder E.R., Shaydayuk E.L., Morgunov A.I. Population structure of leaf pathogens of common spring wheat in the West Asian regions of Russia and Northern Kazakhstan in 2017. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(3):363-369. DOI 10.18699/VJ18.372. (in Russian)]

Койшибаев М.К. Болезни зерновых культур. Алматы: Бастау, 2002. [Koishybaev M.K. Diseases of Crops. Almaty: Bastau Publ., 2002. (in Russian)]

Койшибаев М.К. Особенности развития желтой ржавчины на озимой пшенице в южном и юго-восточном Казахстане. В: Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур: Тез. докл. междунар. науч. конф. Алматы: Асыл кітап, 2010;145-147.

[Koishybaev M.K. Features of the development of yellow rust on winter wheat in southern and southeastern Kazakhstan. In: Abstracts from the international scientific conference “Achievements and

Prospects of the Agriculture, Breeding, and Biology of Agricultural Crops". Almaty: Asyl Kitap Publ., 2010;145-147. (in Russian)]

Кохметова А., Али С., Сапахова З., Атишова М.Н. Идентификация генотиповносителей устойчивости к токсинам пиренофороза Ptr ToxA и Ptr ToxB *Pyrenophora tritici-repentis* в коллекции мягкой пшеницы. *Вавиловский журнал генетики и селекции.* 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440.
[Kokhmetova A.M., Ali Sh., Sapakhova Z., Atishova M.N. Identification of genotypes-carriers of resistance to tan spot Ptr ToxA and Ptr ToxB of *Pyrenophora tritici-repentis* in common wheat collection. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(8):978-986. DOI 10.18699/VJ18.440. (in Russian)]

Кохметова А.М., Кремнева О.Ю., Кейшилов Ж.С., Султанова Н.Ж. Расовый состав и вирулентность изолятов *Pyrenophora tritici-repentis* в Республике Казахстан и Северо-Кавказском регионе России. *Eurasian J. Appl. Biotechnol*. 2016;3:57-66.
[Kokhmetova A.M., Kremneva O.Yu., Keyshilov Zh.S., Sultanova N.Zh. Race range and virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* isolates in the Republic of Kazakhstan and the North Caucasus region of Russia. *Eurasian J. Appl. Biotechnol.* 2016;3:57-66. (in Russian)]

Кремнева О.Ю., Волкова Г.В. Структура популяций *Pyrenophora tritici-repentis* на Северном Кавказе по морфолого-культуральным признакам и вирулентности. *Микология и фитопатология.* 2007;41(4):356-361.
[Kremneva O.Yu., Volkova G.V. The structure of *Pyrenophora tritici-repentis* population in the North Caucasus by morphological and cultural characteristics and virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2007;41(4):356-361. (in Russian)]

Мироненко Н.В., Баранова О.А., Коваленко Н.М., Афанасенко О.С., Михайлова Л.А. Селективное влияние сортов пшеницы с геном *Tsn1* на формирование популяции возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis*. *Вестн. защиты растений.* 2017;3(93):23-27.
[Mironenko N.V., Baranova O.A., Kovalenko N.M., Afanasenko O.S., Mikhailova L.A. Selective influence of wheat cultivars with *Tsn1* gene on the formation of tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* population. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News.* 2017;3(93):23-27. (in Russian)]

Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Особенности взаимодействия генов *Tsn1* и *ToxA* в патосистеме *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis. Вестн. защиты растений.* 2018;2(96):12-16.
[Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Interaction of the *Tsn1* and *ToxA* genes in the *Triticum aestivum – Pyrenophora tritici-repentis* pathosystem. *Vestnik Zashchity Rasteniy = Plant Protection News.* 2018; 2(96):12-16. (in Russian)]

Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методические указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. СПб., 2012.
[Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Tan Spot of Wheat. Guidelines for the study of populations of the tan spot causative agent *Pyrenophora tritici-repentis* and resistance of varieties. St. Petersburg, 2012. (in Russian)]

Поспехов Г.В. Особенности роста и плодоношения гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. в культуре. *Микология и фитопатология.* 1989;23(2):117-121.
[Pospekhov G.V. Growth and fruiting characteristics of the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. in culture. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 1989;23(2):117-121. (in Russian)]

Ali S., Gurung S., Adhikar T.B. Identification and characterization of novel isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* from Arkansas. *Plant Dis.* 2010;94:229-235. DOI 10.1094/PDIS-94-2-0229.

Ballance G.M., Lamari L., Bernier C.C. Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 1989;35:203-213. DOI 10.1016/0885-5765(89)90051-9.

Chen X., Line R., Leung H. Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 1998;97:345-355.

Chu C.G., Friesen T.L., Xu S.S., Faris J.D. Identification of novel tan spot resistance loci beyond the known host-selective toxin insensitivity genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2008;117:873-881.

Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010;107:13544-13549. DOI 10.1073/pnas.1004090107.

Karelov A.V., Kozub N.O., Sozinov I.O., Sozinov O.O., Blume Ya.B. Allelic state of the molecular genetic markers for genes associated with sensitivity to *Pyrenophora tritici-repentis* toxins A and B and *Stangospora nodorum* toxin A among Ukrainian common wheat cultivars. *Visn. Ukr. Tov. Genetikov i Selekcionerov.* 2015;13(1): 11-17.

Kokhmetova A.M., Atishova M.N., Kumarbayeva M.T., Leonova I.N. Phytopathological screening and molecular marker analysis of wheat germplasm from Kazakhstan and CIMMYT for resistance to tan spot. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2019;23(7):879-886. DOI 10.18699/VJ19.562.

Kokhmetova A., Kremneva O., Volkova G., Atishova M., Sapakhova Z. Evaluation of wheat cultivars growing in Kazakhstan and Russia for resistance to tan spot. *J. Plant Pathol.* 2017;99(1):161-167. DOI 10.4454/jpp.v99i1.3812.

Kokhmetova A., Madenova A., Purnhauser L., Kampitova G., Urazaliev R., Yessimbekova M. Identification of leaf rust resistance genes in wheat cultivars produced in Kazakhstan. *Cereal Res. Commun.* 2016;44(2):240-250. DOI 10.1556/0806.43.2015.056.

Kokhmetova A.M., Morgounov A., Rsaliyev Sh., Yessenbekova G., Tyupina L. Wheat germplasm screening for stem rust resistance using conventional and molecular techniques. *Czech J. Genet. Plant Breed.* 2011;47:146-154. DOI 10.17221/3270-CJGPB.

Kokhmetova A., Sharma R., Rsaliyev S., Galymbek K., Baymagambetova K., Ziyaev Z., Morgounov A. Evaluation of Central Asian wheat germplasm for stripe rust resistance. *Plant Genet. Resour.* 2018;16(2):178-184. DOI 10.1017/S1479262117000132.

Lamari L., Bernier C.C. Evalution of wheat lines and cultivars to tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* based on lesion type. *Can. J. Plant Pathol.* 1989;11:49-56.

Lamari L., Bernier C.C. Genetics of tan necrosis and extensive chlorosis in tan spot of wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Phytopathology.* 1991;81:1092-1095.

Lamari L., Gilbert J., Tekauz A. Race differentiation in *Pyrenophora tritici-repentis* and survey of physiologic variation in western Canada. *Can. J. Plant Pathol.* 1998;20(4):396-400.

Lamari L., Strelkov S.E., Yahyaoui A., Amedov M., Saidov M., Djunusova M., Koichibayev M. Virulence of *Pyrenophora tritici-repentis* in the countries of the Silk Road. *Can. J. Plant Pathol.* 2005;27: 383-388. DOI 10.1080/07060661.2012.695750.

Maraite H., Mercado-Vergnes D., Renard M.-E., Zhanarbekova A., Duveiller E. Relevance of pathogen diversity in management of leaf spot and leaf blight diseases on wheat in Central Asia. *Agromeridian.* 2006;2:105-114.

McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appel R. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. 2013. Suppl. 2014–2017. Available at: www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes

Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Populations of *Pyrenophora tritici-repentis* in the North Caucasus and North-West Russia: the racial composition and dynamics of virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2014; 48(6):393-400. (in Russian)

Mikhailova L.A., Ternyuk I.G., Mironenko N.V. Characteristic of *Pyrenophora tritici-repentis* populations by their virulence. *Mikologiya i Fitopatologiya = Mycology and Phytopathology.* 2010;44(3):263-272. (in Russian)

Orolaza N.P., Lamari L., Ballance G.M. Evidence of a hostspecific chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, the causal agent of tan spot of wheat. *Phytopathology.* 1995;85:1282-1287.

Postnikova E.N., Khasanov B.A. Tan spot in Central Asia. In: Helmintosporium Blights of Wheat: Tan Spot. Mexico: CIMMYT-UCL, 1997;107-114.

Riede C.R., Anderson J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 1996;36(4):905-909.

Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Leroy P., Ganal M.W. A microsatellite map of wheat. *Genetics.* 1998;149:2007-2023.

Rsaliyev A.S., Rsaliyev Sh.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2018;22(8):967-977. DOI 10.18699/VJ18.439. (in Russian)

Saari E.E., Prescott L.M. A scale for appraising the foliar intensity of wheat diseases. *Plant Dis. Rep.* 1975;59:377-380.

Shabeer A., Bockus W.W. Tan spot effects on yield and yield components relative to growth stage in winter wheat. *Plant Dis.* 1988;72:599-602.

Singh P.K., Crossa J., Duveiller E., Singh R.P., Djurle A. Association mapping for resistance to tan spot induced by *Pyrenophora tritici-repentis* race 1 in CIMMYTs historical bread wheat set. *Euphytica.* 2016;207(3):515-525. DOI 10.1007/s10681-015-1528-7.

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;171:1-13.

Singh S., Bockus W.W., Sharma I., Bowden R.L. A novel source of resistance in wheat to *Pyrenophora tritici-repentis* race 1. *Plant Dis.* 2008;92:91-95.

Zadoks J.C., Chang T.T., Konzak M.M. A decimal code for the growth stages of wheat. *Weed Res.* 1974;14:415-421.

Zhanarbekova A.B., Koishibayev M., Maraite H., Duveiller E., Mercado D.M., Sliamova N.D. The distribution of tan spot on wheat and race structure of *Drechslera tritici-repentis* in Kazakhstan and neighboring CIS countries. In: Proc. Int. Sci. Conf. "Modern Problems of Plant Protection and Quarantine". Almaty, 2005;371-376.

Zhang Z., Friesen T.L., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification, and validation of markers for markerassisted selection against the *Stagonospora nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2* in wheat. *Mol. Breed.* 2009;23(1):35-49. DOI 10.1007/s11032-008-9211-5.

ORCID ID

A.M. Kokhmetova orcid.org/0000-0002-0186-7832
N.M. Kovalenko orcid.org/0000-0001-9577-8816
M.T. Kumarbaeva orcid.org/0000-0002-5588-6772

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта грантового финансирования № AP05132540.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 09.10.2020. После доработки 23.10.2020. Принята к публикации 23.10.2020.