

УДК 632.938 : 582.284.21

© Л. Г. Тырышкин, П. М. Курбанова

**ИНДУКЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ
ВЗРОСЛЫХ РАСТЕНИЙ К ЛИСТОВОЙ РЖАВЧИНЕ
У ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ**TYRYSHKIN L. G., KURBANOVA P. M. INDUCTION OF EXPRESSION OF GENES
FOR ADULT RESISTANCE TO LEAF RUST IN WHEAT SEEDLINGS

Запас генов ювенильной устойчивости мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. к листовой ржавчине (возбудитель *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* Roberge ex Desm.), эффективных против современных популяций возбудителя из России, крайне мал (Тырышкин, 2006; Тырышкин и др., 2006), в связи с чем особое внимание необходимо уделить генам возрастной устойчивости. В настоящее время известно не менее 10 локализованных в хромосомах генов возрастной устойчивости пшеницы к листовой ржавчине (McIntosh et al., 2003).

Идентификация известных генов, экспрессирующихся только у взрослых растений, у вновь выделенных устойчивых форм с помощью классического гибридологического анализа требует длительного времени (не менее двух лет при проведении только полевых опытов), больших площадей посевов (около 40 м² гибридов F₂ одного изучаемого образца) и большого количества инокулюма *P. recondita*. Значительно облегчить задачу идентификации генов возрастной устойчивости могло бы применение молекулярных маркеров, однако такие маркеры созданы не для всех известных генов. Кроме того разработанные ДНК-маркеры часто не тесно сцеплены с генами устойчивости (Chelkovski et al., 2003; Stepien et al., 2003; Blaszczyk et al., 2004; Гайнуллин и др., 2007; Nocente, Gazza, 2007), что может приводить к ошибочному определению наличия конкретного гена у изучаемого образца.

В предыдущей работе (Тырышкин и др., 2005) была показана генотипспецифическая индукция устойчивости мягкой пшеницы к листовой ржавчине под действием бензимидазола, причем, скорее всего, индуцировалась экспрессия конкретных «главных» генов устойчивости, а не других генетических факторов (Tyryshkin, 2001).

Цель настоящей работы — проверить гипотезу о возможности индукции экспрессии генов возрастной устойчивости пшеницы *P. recondita* у ювенильных растений хозяина.

Материал и методы

В 2005—2007 гг. оценивали возрастную устойчивость к листовой ржавчине почти изогенных линий серии Thatcher с Lr-генами: 1, 2a, 2b, 2c, 3, 3ka, 3bg, 10, 11, 12, 13, 14a, 14b, 16, 20, 34, 52, а также сортов Gatcher (Lr27 + Lr31) и Pavon F76 (Lr46 + Lr1 + Lr10 + Lr13). Образцы получали с поля Пушкинского филиала Всероссийского института растениеводства им. Н. И. Вавилова. Растения в фазе трубкова-

ния опрыскивали суспензией уредопор сборной популяции *P. recondita* и на сутки закрывали пленкой «Спанбонд». Развитие болезни на флаг-листьях учитывали через 15 суток после инокуляции.

В лабораторных опытах семена перечисленных линий и сортов раскладывали в металлические кюветы на вату, смоченную водой. После прорастания семян кюветы переносили в климатическую камеру с постоянным освещением 2500 лк и температурой 22 °С. Проростки в стадии 1—2 листьев опрыскивали водной суспензией спор патогена той же популяции, кюветы заворачивали в полиэтилен, который через сутки снимали. Тип реакции определяли на 12-е сутки после заражения по шкале Майнса и Джексона (Mains, Jackson, 1926).

Для изучения эффективности генов у ювенильных растений семена образцов высевали на ватные валики, которые вместе с растениями в стадии 1—2 листьев помещали на вату, смоченную водой, таким образом, чтобы первые листья приняли горизонтальное положение. Единичные растения каждой линии заражали 13 монопустульными изолятами возбудителя ржавчины, кюветы оборачивали полиэтиленом. Через сутки пленку снимали, растения возвращали в вертикальное положение. Тип реакции учитывали на 12-е сутки после заражения.

Сегменты листьев каждой линии раскладывали в чашки Петри на вату, смоченную водным раствором бензимидазола (концентрации — 40, 80 и 100 ppm), в строку, в конце каждой строки помещали листья восприимчивого сорта Ленинградка. Каждую строку инокулировали одним монопустульным изолятом патогена. Чашки с идентичным расположением линий инкубировали в климатических камерах при температуре 15, 22, 25 °С. Учет типов реакций проводили в момент формирования крупных пустул патогена на отрезках листьев восприимчивого сорта. Аналогично проводили эксперимент с инокуляцией сегментов листьев сортов — носителей конкретных генов устойчивости.

Все лабораторные опыты были проведены не менее чем в трех независимых повторностях.

Результаты и обсуждение

На линиях с генами устойчивости Lr10, Lr11, Lr12, Lr13, Lr34, Lr52, а также сортах Gatcher (Lr27 + Lr31) и Pavon F76 (Lr46 + Lr1 + Lr10 + Lr13) развитие болезни в полевых условиях в течение трех лет изучения было слабее, чем на сорте Thatcher (L.) флаг-листья этих образцов были поражены на 20—80 %, остальные формы — на 100 %. При этом на листьях всех образцов наблюдали восприимчивый тип реакции. В лабораторных условиях при инокуляции проростков этих линий популяцией *P. recondita* наблюдали типичную реакцию восприимчивости (типы реакции 3).

Все монопустульные изоляты патогена были вирулентны к проросткам этих линий при инокуляции интактных растений. Полученные данные позволяют утверждать, что перечисленные гены являются возрастными по отношению к популяции *P. recondita* из Северо-Западного региона России.

При инкубации зараженных листьев в бензимидазоле с концентрацией 100 ppm и температуре 15 °С в двух экспериментах из трех развитие ржавчины не наблюдали даже на восприимчивом сорте, поэтому данный вариант опыта в дальнейшем не рассматривался.

Девятнадцать изолятов гриба были вирулентны к шести линиям и двум сортам, сегменты листьев которых инкубировали в бензимидазоле при трех температурных режимах.

Для 11 изолятов в разных комбинациях концентраций бензимидазола и температуры наблюдали индукцию устойчивости. При концентрации бензимидазола 40 ppm и всех температурных режимах (15, 22 и 25 °С) на изучаемых образцах пшеницы наблюдали реакцию восприимчивости. При температурном режиме 22 °С независимо от концентрации химиката сегменты листьев всех образцов были восприимчивы.

**Типы реакции отрезков листьев линий серии Thatcher и сортов с Lr-генами
на инокуляцию изолятами *P. recondita* f. sp. *tritici* при различных концентрациях
бензимидазола и температурах**

Номер изолята	Температура, °C	Концентрация ppm	Тип реакции							
			Lr10	Lr11	Lr12	Lr13	Lr27 +Lr31	Lr34	Lr46 + Lr10 + Lr13	Lr52
1	15	80	3	3	3	3	0	3	3	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	3	0
		100	3	0	3	3	0	3	3	0
2	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	3	0
		100	3	3	3	3	3	3	3	0
3	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	0	3
		100	3	3	3	3	3	3	0	3
4	15	80	3	3	3	3	0	3	3	3
	25	80	3	3	3	0	3	3	0	3
		100	3	3	0	0	3	3	0	3
5	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	3	0
		100	3	3	3	3	0	3	3	0
6	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	0	3
		100	3	3	3	3	3	3	0	3
7	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	80	3	3	3	3	3	3	0	3
		100	3	3	3	3	3	3	0	3
8	25	80	3	3	3	3	3	3	0	3
		100	0	0	3	3	3	3	0	3
9	15	80	3	3	3	3	0	3	3	3
	25	100	3	3	3	3	0	3	3	3
10	15	80	3	3	3	3	3	3	0	3
	25	100	3	3	3	3	3	0	3	3
11	25	80	3	3	3	3	3	3	0	3
		100	0	3	3	3	3	0	0	3

Индукция устойчивости к отдельным клонам патогена у линии ThLr10, ThLr11, ThLr12, ThLr13, ThLr34 наблюдалась при инкубации инокулированных сегментов листьев в бензимидазоле с концентрацией 100 ppm и температуре 25 °C (табл. 1).

У сорта Gatcher индукция устойчивости к трем изолятам гриба выявлена также и при концентрации бензимидазола 80 ppm и температуре 15 °C.

У сорта Ravon F76 и линии ThLr52 устойчивость индуцируется при концентрации бензимидазола 80 и 100 ppm и повышенной температуре, а у первого образца также при пониженной температуре (табл. 1).

Поскольку шесть из восьми изучаемых образцов пшеницы являются почти изо-генными линиями одного сорта, можно предположить, что конкретные комбинации абиготических факторов индуцируют экспрессию именно «главных» генов возрастной

устойчивости пшеницы к болезни, а не других генетических факторов, присутствующих в геномах изучаемых форм.

Для проверки данного предположения несколько выделенных клонов *P. recondita*, авирулентных в конкретных условиях, были использованы для инокуляции отрезков листьев сортов яровой пшеницы, имеющих «индуцибельные» гены устойчивости (McIntosh et al., 2003). Наблюдали строго специфическую индукцию устойчивости у сортов именно к тем клонам, которые были выделены как авирулентные к линии серии Thatcher (табл. 2). Таким образом, индукция устойчивости под действием абиотических факторов не зависит от целостного генотипа растения-хозяина, а обусловлена присутствием определенного «главного» гена возрастной устойчивости.

Таблица 2

Типы реакции образцов пшеницы с Lr-генами на заражение клонами *P. recondita* f. sp. *tritici*

Образец	Тип реакции на заражение клонами										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Образцы с геном Lr10*											
ThLr10	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0
Mayo 52	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0
Mayo 54	3	3	3	3	3	3	3	0	3	3	0
Образцы с геном Lr12*											
ThLr12	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3
Opal	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3
Образцы с геном Lr13*											
ThLr13	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3
Chris (+34)	3	3	3	0	3	3	3	3	3	0	0
Neepawa	3	3	3	0	3	3	3	3	3	3	3
Образцы с геном Lr27 + Lr31*											
Gatcher	0	3	3	3	0	3	3	3	0	3	3
Ocoroni F86	0	3	3	3	0	3	3	3	0	3	3
Образцы с геном Lr27 + Lr31**											
Gatcher	0	3	3	0	3	3	3	3	0	3	3
Ocoroni F86	0	3	3	0	3	3	3	3	0	3	3
Образцы с геном Lr34*											
ThLr34	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0
Glenlea	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	0
Образцы с геном Lr46*											
Pavon F76 (+10 + 13)	3	3	0	0	3	0	0	0	3	3	0
Lalbahadur	3	3	0	3	3	0	0	3	3	3	3

Примечание. Номера клонов (1—11) соответствуют номерам изолятов в табл. 1. Одна звездочка — заражение отрезков листьев в бензимидазоле (100 ppm) при температуре 25 °С, две — в бензимидазоле (80 ppm) при температуре 15 °С.

Разработанный метод инокуляции отрезков листьев при повышенных концентрациях бензимидазола и пониженных/повышенных температурах может быть рекомендован для быстрого предварительного постулирования генов устойчивости взрослых растений у восприимчивых образцов мягкой пшеницы в стадии проростков.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 02-04-48948 и 06-04-49039).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Гайнуллин Н. Р., Лапочкина И. Ф., Жемчужина А. И., Киселева М. И., Коломиец Т. М., Коваленко Е. Д. Использование фитопатологического и молекулярно-генетических методов для идентификации генов устойчивости к бурой ржавчине у образцов мягкой пшеницы с чужеродным генетическим материалом // Генетика. 2007. Т. 43. С. 1058—1064.

Тырышкин Л. Г. Генетический контроль эффективной ювенильной устойчивости коллекционных образцов пшеницы *Triticum aestivum* L. к бурой ржавчине // Генетика. 2006. Т. 42. С. 377—384.

Тырышкин Л. Г., Гульятеева Е. И., Алпатеева Н. В., Крамер И. Идентификация эффективных генов устойчивости пшеницы *Triticum aestivum* L. к бурой ржавчине с помощью STS-маркеров // Генетика. 2006. Т. 42. С. 812—817.

Тырышкин Л. Г., Ершова М. А., Тырышкина Н. А. Влияние бензимидазола на поражаемость пшеницы болезнями // Микология и фитопатология. 2005. Т. 39. С. 93—98.

Blaszczyk L., Chelkovski J., Korzun V., Kraič J., Ordon F., Ovesna J., Purnhauser L., Tar M., Vida G. Verification of STS markers for leaf rust resistance genes of wheat by seven European laboratories // Cell. Mol. Biol. Lett. 2004. Vol. 9. P. 805—817.

Chelkovski J., Golka L., Stepień L. Application of STS markers for leaf rust resistance genes in near-isogenic lines of spring wheat cv. Thatcher // J. Appl. Genet. 2003. Vol. 44. P. 323—338.

Mains E. B., Jackson H. S. Physiological specialization in leaf rust of wheat, *Puccinia triticina* Erikss. // Phytopathology. 1926. Vol. 16. P. 89—120.

McIntosh R. A., Yamazaki Y., Devos K. M., Dubcovsky J., Rogers W. J., Appels R. Catalogue of gene symbols for wheat. MACGENE2003 (CD Version). User Manual.

Nocente F., Gazza L. Evaluation of leaf rust resistance genes Lr1, Lr9, Lr24, Lr47 and their introgression into common wheat cultivars by marker-assisted selection // Euphytica. 2007. Vol. 155. P. 329—336.

Stepień L., Golka L., Chelkovski J. Leaf rust resistance genes of wheat: identification in cultivars and resistance sources // J. Appl. Genet. 2003. Vol. 44. P. 139—149.

Тырышкин Л. Г. Effect of benzimidazole to compatibility in the system wheat — leaf rust // Acta Phytopathol. Entomol. Hungarica. 2001. Vol. 36. P. 275—279.

ГНЦ Всероссийский институт растениеводства им. Н. И. Вавилова
Санкт-Петербург

Поступила 21 III 2008

Р Е З Ю М Е

Почти изогенные линии сорта Thatcher с генами устойчивости к листовой ржавчине Lr10, Lr11, Lr12, Lr13, Lr34, Lr52 и сортов Gatcher (Lr27 + Lr31) и Pavon F 76 (Lr46 + Lr1 + Lr10 + Lr13) имели определенный уровень устойчивости взрослых растений к *P. recondita*, но были восприимчивы к 30 случайно отобраным монопустульным изолятам в ювенильной стадии. Таким образом, эти гены могут рассматриваться как гены возрастной устойчивости к популяции патогена. Устойчивость к нескольким изолятам была обнаружена в сегментах листьев, помещенных в раствор бензимидазола при высокой (25 °C) и низкой (15 °C) температуре. Строгая геноспецифичная индукция устойчивости свидетельствует о том,

что под влиянием абиотических факторов она не вызвана влиянием генотипов в целом, а является результатом функционирования определенных «главных» генов возрастной устойчивости. Метод инокуляции листовых сегментов изолятами *P. recondita* может быть рекомендован для быстрого предварительного выявления генов возрастной устойчивости образцов пшеницы, восприимчивых к листовой ржавчине в ювенильной стадии.

Ключевые слова: пшеница, листовая ржавчина, гены устойчивости взрослых растений.

S U M M A R Y

Near-isogenic lines of cv. Thatcher with genes for wheat leaf rust resistance Lr10, Lr11, Lr12, Lr13, Lr34, Lr52 and varieties Gatcher (Lr27 + Lr31) and Pavon F 76 (Lr46 + Lr1 + Lr10 + Lr13) possessed some level of adult resistance to *P. recondita* but were susceptible to 30 randomly selected monopustule isolates in juvenile stage; so, these genes could be considered as adult ones against the pathogen population. Resistance to several isolates was found in leaf segments placed in benzimidazole solution at high (25 °C) and low (15 °C) temperatures. Strong gene-specific induction of the resistance indicated that this induction under abiotic factors is not affected by the whole genotypes but by certain «major» gene for adult resistance. The method of leaf segments inoculation with isolates of *P. recondita* can be recommended for rapid preliminary postulation of genes for adult resistance in wheat samples susceptible to the rust in juvenile stage.

Key words: wheat, leaf rust, adult resistance genes.