

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 3, Number 309 (2015), 48 – 56

**MOLECULAR SCREENING OF WHEAT ENTRIES
FOR RESISTANCE TO TAN SPOT
*PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS***

A. M. Kokhmetova¹, M. N. Atishova¹, Z. B. Sapakhova¹, R. A. Urazaliev²

¹Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan,

²Kazakh Research Institute of Farming, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: gen_kalma@mail.ru

Key words: wheat, tan spot, resistance genes, molecular markers, selected.

Abstract. Tan spot is one of the most harmful diseases of common and durum wheat in many agricultural regions of the world. This disease is dangerous and rapidly progressing both worldwide and in Kazakhstan. Yield reduction due to the negative impact of the pathogen can reach 60%. The purpose of this study is to identify carriers of resistance to one of the most aggressive toxins of tan spot ToxA using molecular markers. The molecular and phytopathological screening of winter wheat germplasm from collection nurseries for resistance tan spot *Pyrenophora tritici-repentis* was carried out. Cultivars and wheat samples were differentiated in terms of resistance and susceptibility to tan spot. Molecular screening was conducted using SSR markers Xfcp394. As a result of study 11 wheat entries resistant to tan spot was identified. Selected entries are carriers of the recessive allele *tsn1* conferring insensitivity to tan spot toxin ToxA. Scope: genetics and plant breeding.

УДК: 632.42: 633:576.3/7.086.83:581.4

**МОЛЕКУЛЯРНЫЙ СКРИНИНГ ОБРАЗЦОВ ПШЕНИЦЫ
НА УСТОЙЧИВОСТЬ ПИРЕНОФОРОЗУ
*PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS***

А. М. Кохметова¹, М. Н. Атишова¹, З. Б. Сапахова¹, Р. А. Уразалиев²

¹Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

²Казахский НИИ земледелия и растениеводства, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: пшеница, пиренофороз, гены устойчивости, молекулярные маркеры.

Аннотация. Пиренофороз является одной из самых вредоносных заболеваний мягкой и твердой пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах мира. Это заболевание является опасным и быстро прогрессирующим как во всем мире, так и в Казахстане. Снижение урожайности из-за негативного влияния патогена может достигать 60%. Целью настоящего исследования является идентификация носителей устойчивости к одному из наиболее агрессивных токсинов пиренофороза ToxA с использованием молекулярных маркеров. Проведен молекулярный и фитопатологический скрининг гермоплазмы озимой мягкой пшеницы из коллекционных питомников на устойчивость пиренофорозу *Pyrenophora tritici-repentis*. Сорта и образцы дифференцированы по уровню устойчивости и восприимчивости к пиренофорозу. Молекулярный скрининг проведен с использованием SSR маркера Xfcp394. В результате исследований идентифицировано 11 образцов пшеницы, устойчивых к пиренофорозу. Отобранные образцы являются носителями рецессивного *tsn1* аллеля гена, контролирующего нечувствительность к токсину гриба пиренофороза ToxA. Область применения: генетика и селекция растений.

Введение. В последние годы значительное место в составе патогенного комплекса пшеницы в Казахстане занимает пиренофороз. Возбудителем болезни является фитопатогенный гриб – гомоталличный аскомицет *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.), Drechsler, несовершенная стадия *Drechslera tritici-repentis* (Died), который вызывает пиренофороз или желтую пятнистость листьев на пшенице. Пиренофороз является одной из самых вредоносных заболеваний мягкой и твердой пшеницы во многих сельскохозяйственных регионах мира [1]. Это заболевание является опасным и быстро прогрессирующим как во всем мире, так и в Казахстане. Если до 90-х годов прошлого столетия эпифитотийное или сильное развитие вредоносных грибных болезней в Казахстане происходило 2–3 раза в десятилетие, то за последние 20 лет эпифитотии наблюдались до 5–6 раз; при этом снижение урожая составляло от 15 до 25% [2]. Пиренофороз поражает пшеницу и тритикале, в меньшей степени – рис и ячмень. Развитию болезни способствуют современные индустриальные технологии земледелия: минимальная обработка почвы с сохранением стерни на её поверхности, монокультура и возделывание сортов пшеницы с недостаточным уровнем устойчивости к патогену. Источником инфекции для заражения всходов озимой пшеницы в осенний период могут служить инфицированные семена, растительные остатки посева предыдущего вегетационного сезона, пораженные растения самосева и дикорастущие злаки, восприимчивые к этому заболеванию.

По данным ряда авторов потери зерна в условиях эпифитотии достигают 65%, при этом ухудшается качество зерна пшеницы [3]. Эпифитотия этой болезни обнаружена в Бельгии [4], в Англии [5], в Румынии [6], в Польше, в Венгрии, в Латвии и Чехии [7]. На территории СНГ патоген встречается в Молдавии, Украине, Белоруссии, Средней Азии и Казахстане [1, 8, 9]. Большое внимание исследователи уделяют анализу структуры популяции патогена, изучению генетики устойчивости и улучшению сортов методами классической селекции. В настоящее время отмечается нарастающее распространение и увеличение вредоносности пиренофороза пшеницы в Казахстане. В период 2000–2005 гг. в этом регионе 2–3 раза происходило эпифитотийное развитие желтой ржавчины и совместно желтой пятнистостью листьев и септориозом (*Septoria nodorum* и *S. tritici*). В предгорной зоне южного и юго-восточного Казахстана эпифитотийное развитие грибных пятнистостей листьев на озимой пшенице за указанный период наблюдали 4 раза: в 1993, 2002, 2003 гг. М. К. Койшибаевым (2002) установлено, что среди коммерческих и перспективных казахстанских сортов озимой пшеницы отсутствуют образцы, устойчивые к пиренофорозу [10]. Считается, что распространение пиренофороза в Центральной Азии связано с минимальной обработкой почвы с сохранением стерни, монокультурой пшеницы или чрезмерной насыщенностью ею севооборотов и возделыванием неустойчивых к патогену сортов.

Возбудитель болезни продуцирует токсины, вызывающие быстрое отмирание листьев. Как любые токсины паразитов, они являются иммуносупрессорами, ибо, вызывая повреждения клеток растения, ингибируют их способность активно сопротивляться инфекции. Специфичность взаимодействия изолятов гриба с растением обусловлена наличием хозяино-специфичных токсинов (Host Selective Toxins – HST). Восприимчивая реакция растения проявляется в случае, когда патоген производит токсины, для которых у хозяина имеется соответствующий рецептор. Образование токсинов контролируется соответствующими генами и наследуется в потомстве. На сегодняшний день, четыре HST, Ptr ToxA [11], Ptr ToxB [12], Ptr ToxC [13] и Ptr ToxD [14] были охарактеризованы в различных расах *P. tritici-repentis*. Все токсины – белковой природы, за исключением токсина ToxC, который представляет собой полярное, неионное и низкомолекулярное соединение.

Селективные токсины функционируют как факторы патогенности. Поэтому специфический HST, продуцируемый конкретным изолятом, определяет его расу. Ptr ToxA вызывает некроз на Glenlea и Katerwa [15, 16], Ptr ToxB вызывает хлороз на 6B662 и Katerwa [17], а Ptr ToxC вызывает хлороз на 6B365 [13]. Сорты пшеницы Salamouni [17], и Auburn [15], являются нечувствительными ко всем охарактеризованным HST гриба. К настоящему времени идентифицированы изоляты, производящие все возможные комбинации токсинов Ptr ToxA, Ptr ToxB и Ptr ToxC, которые, соответственно, ранжированы как расы от 1 до 8 [18].

Lamari и Bernier (1989) сообщили о возникновении токсичного соединения в культуре фильтратов из изолятов расы 1 и расы 2, и предположили, что токсин *P. tritici-repentis* ответственен за развитие симптомов некроза на чувствительных генотипах пшеницы [19]. Позже, четыре

исследовательские группы независимо друг от друга выделили и очистили токсин некроза из культуры фильтратов изолятов *P. tritici-repentis*, вызывающих некроз [15, 16] и описали токсин некроза Ptr, как рибосомально синтезируемый мономерный и термолабильный белок с молекулярной массой 13,2 kDa [20]. Ptr ToxA является продуктом одного гена. Balance et al. (1996) и Ciuffetti et al. (1997) клонировали и секвенировали один и тот же ген, кодирующий токсин ToxA и обнаружили, что в результате различных пост-трансляционных процессов ген может производить токсины с различными биохимическими свойствами, но с одинаковой вирулентностью [21, 22]. Доминантный ген, Tsn1 был идентифицирован на хромосоме 5BL [23]. Дальнейшее исследование показало, что нечувствительность хозяина к токсину проявляется в связи с отсутствием у него гена чувствительности к токсину. В восприимчивом хозяине токсин гена чувствительности, вероятно, производит хозяин-специфический рецептор или сайт связывания для токсинов, что вызывает симптомы желтой пятнистости. В устойчивом хозяине хозяин-специфический рецептор не может генерироваться в связи с отсутствием гена чувствительности к токсину, и это приводит к нарушению сигнального каскада, необходимого для активизации токсина в хозяине. Путем мечения Ptr ToxA зеленым флуоресцентным белком (GFP) Manning et al., 2002 исследовали различные действия Ptr ToxA в нечувствительных и чувствительных линиях пшеницы и обнаружили, что Ptr ToxA усваивается клетками чувствительных к токсину линий, но нечувствительными линиями он не усваивается [24]. Усвоение может защитить Ptr ToxA от деградации протеиназой K в клетках чувствительной пшеницы. Таким образом, Tsn1, ген чувствительности, скорее всего, ведет себя как рецептор и отвечает за поглощение токсина клеткой растения. Исследования возбудителя *Stagonospora nodorum blotch* показали, что токсин Ptr ToxA взаимодействует не только с Tsn1. Токсин ToxA, производимый *S. nodorum*, также показал взаимодействие с Tsn1. Межвидовой перенос гена ToxA от *S. nodorum* к *P. tritici-repentis* привел к появлению симптомов болезни пиренофороза [25]. Сиквенс *P. tritici-repentis* Ptr ToxA и *S. nodorum* ToxA показал 99,7% гомологии между двумя генами.

Традиционные методы селекции не всегда эффективны, особенно для такого полигенного признака, как нерасоспецифическая устойчивость к болезни. Для того чтобы с большей эффективностью контролировать болезнестойчивость, очень важно иметь в распоряжении молекулярно-генетические маркеры, сопряженные с этим признаком. Надежные генетические маркеры, как правило, нейтральны по отношению к признакам, на которые ведется селекция, кодоминантны для распознавания родительских форм и стабильно сохраняются в потомстве. Применение молекулярных маркеров значительно расширило возможности оценки генов устойчивости к неблагоприятным факторам окружающей среды. Использование молекулярных маркеров позволяет решить задачи, недоступные для традиционной селекции: разграничить специфическую и неспецифическую устойчивость и исследовать взаимодействие соответствующих локусов, определить расовую специфичность отдельных генов и оценить взаимодействие между генами устойчивости к патогенам, развитием растений и окружающей средой. В практическом отношении выявление молекулярных маркеров устойчивости к пиренофорозу существенно ускоряет и облегчает перенос генов и делает этот процесс более эффективным [26]. Маркерная селекция (Marker Assisted Selection) на устойчивость к пиренофорозу является более эффективной, по сравнению с другими болезнями, поскольку наследование устойчивости к токсинам носит рецессивный характер. Селекция с помощью маркеров против локусов чувствительности к токсину в беккроссных схемах является особенно полезной, потому что чувствительность является доминирующим признаком, и беккроссы с использованием чувствительных рекуррентных родителей дают только чувствительные растения. К настоящему времени разработан широкий набор молекулярных маркеров, предназначенных для маркирования главных генов и локусов количественных признаков, ассоциированных с устойчивостью к пиренофорозу пшеницы, в т.ч. RAPD [27], RFLP [23], AFLP [28], SSR [29], EST-SSR [30] и DART-маркеры (ДНК чип технология для изучения разнообразия) [31]. Налажена маркерная селекция для гена Tsn1, контролирующего устойчивость к некрозу, индуцируемому расами 1, 2, 7, и 8 токсина Ptr ToxA в тетраплоидных и гексаплоидных пшеницах. Молекулярные исследования генов хозяин-специфических токсинов *P. tritici-repentis* позволили разработать молекулярные диагностики отдельных токсинов с помощью ПЦР [32]. Первые праймеры для генов устойчивости к токсинам ToxB и toxB были предложены в работе Martinez et al. (2004) [33]. Работа

по позиционному клонированию *Tsn1* с использованием маркирующей популяции тетраплоидной пшеницы привела к созданию SSR маркеров Xfcp1 и Xfcp2, расположенных в интервале 0,8 сМ от гена *Tsn1* [30]. В последующем были разработаны два дополнительных SSR маркера, Xfcp620 и Xfcp394, локализованные в интервале 0,07 сМ от гена *Tsn1*. Таким образом, наличие четырех эффективных SSR маркеров (Xfcp1, Xfcp2, Xfcp394 и Xfcp620), тесно сцепленных с *Tsn1* обеспечивает различными вариантами молекулярных маркеров. В 2007 г. была разработана мультиплексная ПЦР, которая позволяет одновременно выявлять гены ToxA, ToxB и toxV при наличии внутреннего контроля на ген «домашнего хозяйства» хитин-синтазу CHS-1 [34].

Целью настоящего исследования является идентификации носителей устойчивости к одному из наиболее агрессивных токсинов пиренофороза ToxA с использованием молекулярных маркеров.

Материалы и методы

В качестве объектов исследований были использовано 18 образцов мягкой пшеницы *Triticum aestivum*, включающие линии и сорта казахстанской и зарубежной селекции: 6В 662, 6В 365, Glenlea, Катерва, Ласка, Анюта, Opata 85, Madsen, Finch, Novoeeste, Арай, Память Калиненко, Лавина, Зерноградка 10, Лютесценс 70, Зерноградка 11, Саратовская 42 и Саратовская 70.

Полевую оценку устойчивости к пиренофорозу оценивали по типу реакции на патоген (балл) в соответствии с методикой Rees et al., 1987 [35].

Выделение геномной ДНК из растительного материала осуществлено из 5-дневных проростков пшеницы с помощью СТАВ-метода [36]. Для идентификации носителей генов устойчивости использован метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). В качестве положительного контроля при идентификации генов использованы образцы пшеницы, в которых гены устойчивости идентифицированы, а в качестве отрицательного контроля – образцы, в которых гены устойчивости не выявлены. Объем реакционной смеси для ПЦР составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы, 2,5 мкл dNTP (2,5 мМ каждого нуклеотида), 0,5 мкл каждого праймера, 0,5 мкл Taq-полимеразы, 18 мкл MQ-H₂O. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 %-м агарозном или 8 % полиакриламидном геле (ПААГ) в TBE-буфере (45 мМ трис-борат, 1мМ EDTA, pH 8) [37]. Амплификацию проводили в амплификаторе Mastercycler (Eppendorf, Германия) при следующих параметрах: начальная денатурация – 94 °С в течение 5 мин; 45 циклов – 1 мин при 94 °С; 1 мин –45 °С; 2 мин –72 °С; финальная элонгация проводилась в течение 7 мин при 72 °С. Для разделения фрагментов амплифицированной ДНК электрофорез осуществляли в 2 %-м агарозном геле. В качестве положительного контроля при идентификации носителей генов использован сорт Opata 85, в котором идентифицирован ген устойчивости *tsn1* к токсину Ptr ToxA пиренофороза пшеницы, в качестве отрицательного контроля – восприимчивый контроль – Морокко [38]. Для идентификации генов *Tsn1* и *tsn1* в изучаемом экспериментальном материале пшеницы использовали молекулярный маркер Xfcp394, локализованный на длинном плече хромосомы 5В. Генетическое расстояние между этим маркером и геном *Tsn1* составляет 0.07 сМ [39]. Нуклеотидные последовательности праймеров для молекулярного маркера Xfcp394 имеют вид:

F-5'- GTA GCC TGC AGG TAC AAA CTG GA-3'

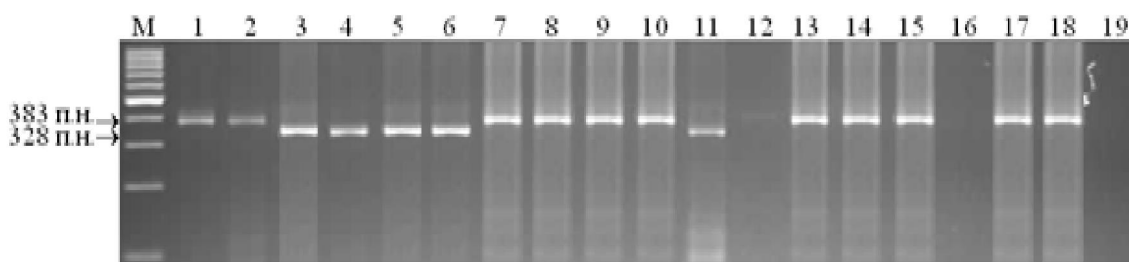
R- 5'- CAG TGT TAA GAA GTG TGT TCT GGT C-3'

Визуализацию гелей осуществляли в гелъдокументирующей системе Mega Bio-Print 1100/26M, Vilber Lourmat, предназначенной для документирования размеров аллелей образцов ДНК.

Результаты исследований и их обсуждение

Для выявления ценных доноров и источников устойчивости к *Drechslera tritici-repentis* оценивали коммерческие сорта и перспективные линии пшеницы из казахстанских и зарубежных питомников. Оценка на устойчивость к пиренофорозу проводили по показателю степени поражения листовой пластинки пшеницы пиренофорозом (%) на стадии полного колошения. Поиск носителей генов устойчивости к токсину Ptr ToxA пиренофороза был основан на молекулярном скрининге образцов пшеницы с использованием специфичных для гена *Tsn1* праймеров.

На рисунке представлен электрофорез продуктов ПЦР, отражающий наличие или отсутствие в исследуемых образцах гена устойчивости к токсину Ptg ToxA пиренофороза. SSR маркер Xfcp394 формировал фрагмент размером 328 п.н., который ассоциируется с наличием доминантного аллеля *Tsn1*, чувствительного к ToxA. Другой аллель, обнаруженный с помощью маркера Xfcp394 содержал фрагмент ДНК размером 383 п.н., характерный для нечувствительных к ToxA генотипов, и указывающий на рецессивное состояние аллеля *tsn1*. ПЦР-анализ с использованием маркера Xfcp394 показал, что фрагмент ДНК в 383 п.н. амплифицировался у 11 генотипов (6В 662, 6В 365, Opata 85, Madsen, Finch, Novoest, Лавина, Зерноградка 10, Лютесценс 70, Саратовская 42 и Саратовская 70), которые являлись носителями рецессивного *tsn1* аллеля, характеризующимися нечувствительностью к токсину гриба ToxA. Пять чувствительных к токсину образцов формировали ПЦР-продукт размером 328 п.н., ассоциированный с присутствием доминантного *Tsn1* аллеля (рисунок).



М – Маркер молекулярного веса (Gene- Ruler 100bp DNA Ladder); 1 – 6В 662, 2 – 6В 365; 3 – Glenlea; 4 – Катерва; 5 – Ласка; 6 – Анюта; 7 – Opata 85; 8 – Madsen; 9 – Finch; 10 – Novoeste; 11 – Арай; 12 – Память Калининко; 13 – Лавина; 14 – Зерноградка 10; 15 – Лютесценс 70; 16 – Зерноградка 11; 17 – Саратовская 42; 18 – Саратовская 70; 19 – ddH₂O. Гель 2%-й агарозный.

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

Проведен фитопатологический скрининг к пиренофорозу образцов коллекции пшеницы (таблица). Из изученных 18 генотипов пшеницы выделено 11 генотипов, демонстрировавших высокий уровень устойчивости к болезни генотипов (до 5%). В таблице представлены результаты молекулярного скрининга образцов пшеницы, которые были оценены по реакции на токсин ToxA и генотипированы с использованием молекулярного маркера Xfcp394.

Установлено, что из 18 сортов фрагмент ДНК размером 383 п.н., характерный для нечувствительных к ToxA генотипов (рецессивный аллель *tsn1*) амплифицировался у 11 сортов пшеницы (таблица). В соответствии с литературными данными у сортов дифференциаторов при инфильтрации токсином ToxA, проявляется различная реакция (Lamari et al., 1995). Так, у линии 6В662 – устойчивая реакция на токсин, у линии 6В365 – признаки хлороза, а у сортов Glenlea и Катерва – признаки некроза. Генотипирование сортов-дифференциаторов с использованием молекулярного маркера Xfcp394, подтверждает ожидаемую реакцию нечувствительности (I) или чувствительности (S) токсину ToxA. Это позволило сделать заключение об адекватности и надежности маркера для идентификации носителей устойчивости к токсину ToxA пиренофороза в изученном наборе сортов.

Таким образом, в связи с минимизацией обработки почвы, восприимчивостью сортов пшеницы и широким применением пестицидов пиренофороз в последние десятилетия становится широко распространенным, экономически значимым во всем мире, в том числе и в Казахстане. Наличие и активизация напряженных очагов инфекции пиренофороза, требует скорейшего создания новых сортов на основе выявления генетически устойчивой гермоплазмы, маркирования носителей устойчивости к пиренофорозу и внедрения их в производство. Настоящее исследование было обусловлено необходимостью создания генетически разнородных источников устойчивости, доноров и перспективных линий пшеницы, которые могут быть использованы в селекции устойчивых к болезни сортов. Эту задачу удалось решить на основе использования современных ДНК-технологий. В результате фитопатологического анализа и молекулярного скрининга с использованием SSR маркера Xfcp394 идентифицировано 11 образцов пшеницы, устойчивых к

Идентификация носителей устойчивости к токсину ToxA пиренофороза

Название сорта, линии	Происхождение	Поражаемость пиренофорозом, %	Генотип	
			Реакция на инфильтрацию токсином ToxA*	Генотипирование носителей нечувствительности к токсину ToxA **
6B662	Canada	1-5	R	I
6B365	Canada	1-5	C	I
Glenlea	Canada	5-10	N	S
Катерва	Canada	10-15	N	S
Ласка	Belorussia	5-10	–	S
Анюта	Belorussia	5-10	–	S
Opata 85	Mexico	0-1	–	I
Madsen	USA	1-5	–	I
Finch	USA	1-5	–	I
Novoeste	Brazil	1-5	–	I
Арай	KZ	5-10	–	S
Память Калиненко	RU	10-15	–	S
Лавина	RU	0-1	–	I
Зерноградка 10	RU	1-5	–	I
Лютесценс 70	RU	1-5	–	I
Зерноградка 11	RU	5-10	–	S
Саратовская 42	RU	1-5	–	I
Саратовская 70	RU	0-1	–	I

*На основе литературных источников (Lamari et al., 1995; Lamari et al., 2003; Strelkov et al., 2002). N – некроз, C – хлороз, R – устойчивость, ToxA – присутствие гена ToxA, производимого токсином Ptr ToxA; « – » – литературные данные отсутствуют.
** “I” указывает на формирование аллеля 383 п.н. и нечувствительность к токсину Ptr ToxA, “S” указывает на формирование аллеля 328 п.н. и на чувствительность к токсину Ptr ToxA при использовании маркера Xfcp394.

пиренофорозу. В эту группу сортов и линий, входят образцы пшеницы 6B662, 6B365, Opata 85, Madsen, Finch, Novoeste, Лавина, Зерноградка 10, Лютесценс 70, Саратовская 42 и Саратовская 70. Отобранные образцы являются носителями рецессивного *tsn1* аллеля гена, контролирующего нечувствительность к токсину гриба пиренофороза ToxA. Носители идентифицированных генов устойчивости к токсину Ptr ToxA пиренофороза вовлекаются в селекционные программы по устойчивости к болезням пшеницы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта грантового финансирования № 2174.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории генетики и селекции Института биологии и биотехнологии растений, отдела генофонда полевых культур Казахского НИИ земледелия и растениеводства за содействие в проведении исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Коваленко Н.М. Устойчивость видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* К возбудителю желтой пятнистости листьев пшеницы (*Pyrrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.: Автореф. канд. биол. наук: 06.01.11. – СПб., 2005. – С. 9-12.
- [2] Койшибаев М.К. Особенности развития желтой ржавчины на озимой пшенице в южном и юго-восточном Казахстане // Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур: тез. докл. Междунар. науч. конф. – Алматы: Асыл кітап, 2010. – С. 145-147.
- [3] Кремнева О.Ю. Структура популяции возбудителя желтой пятнистости листьев пшеницы на Северном Кавказе и элементы биологизированной защиты от патогена: Автореф. канд. биол. наук: 06.01.11. – Краснодар: Наука, 2007. – 21 с.
- [4] Maraite H., Bery J.F., Goffi A. Epidemiology of tan spot in Belgium // Proc. of the 2nd Internat. Tan spot workshop. Fargo: North Dakota State University. – 1992. – P. 73-79.

- [5] Cook D.J., Yarham // Plant Pathol. – 1989. – Vol. 38(1). – P. 101-102.
- [6] Dumitras L., Bontea V. Data noi privind parasitul foliar al grului *Helminthosporium repentis* Diederich // Studii si Cercetari de Biologie Vegetala. – 1981. – Vol. 33. – P. 169-172.
- [7] Sarova J. Wheat leaf spot disease *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs // Research institute of crop production, Prague, 2004. – 18 p.
- [8] Поспехов Г.В. Особенности роста и плодоношения гриба *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. в культуре // Миколог. и фитопатол. – 1989. – Т. 23, вып. 2. – С. 117-121.
- [9] Султанова Н.Ж. Биологические особенности возбудителя желтой пятнистости листьев озимой пшеницы на юго-востоке Казахстана // Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана. – Алматы, 2007. – № 3. – С. 4-6.
- [10] Койшибаев М.К. Болезни растений. – Алматы: Бастау, 2002. – 367 с.
- [11] Thomas A., Feng G.H., Vockus W.W., Leach J.E. Purification of a cultivar – specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot wheat // Mol. Plant Microbe Interact. – 1990. – Vol. 3. – P. 221-224.
- [12] Strelkov S. E., Lamari L., Ballance G. M. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1999. – Vol. 12. – P. 728-732.
- [13] Effertz R.J., Meinhardt S.W., Anderson J.A., Jordahl J.G., Franc L.J. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – P. 527-533.
- [14] Ali S., Ling, H., Meinhardt S., Franc L. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host-selective toxin // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – 3 p.
- [15] Tuori R.P., Wolpert T.J., Ciuffetti L.M. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 1995. – Vol. 8. – P. 41-48.
- [16] Zhang H., Franc L.J., Jordahl J.G., Meinhardt S. W. Structural and physical properties of a necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathology. – 1997. – Vol. 87. – P. 154-160.
- [17] Strelkov S.E., Lamari, L. Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat // Can J Plant Pathol. – 2003. – Vol. 25. – P. 339-349.
- [18] Lamari L., Strelkov S., Yahyaoui A., Orabi J., Smith R.B. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat // Phytopathology. – 2003. – Vol. 93. – P. 391-396.
- [19] Lamari L., Bernier C.C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction // Phytopathology. – 1989a. – Vol. 79. – P. 740-744.
- [20] 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. – Vol. 35. – P. 203-213.
- [21] Ballance G.M., Lamari L., Kowatsch R., Bernier C.C. Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant Pathol. Online publication [www.bspp.org.uk/mppl/] 1996/1209ballance.
- [22] 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 // Plant Cell. – 1997. – Vol. 9. – P. 135-144.
- [23] Faris J.D., Anderson J.A., Franc L.J., Jordahl J.G. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis* // Phytopathology. – 1996. – Vol. 86. – P. 459-463.
- [24] Manning V.A., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A race for a novel host-selective toxin // Phytopathology. – 2002. – Vol. 92. – 51 p.
- [25] Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer // Nature Genetics. – 2006. – Vol. 38. – P. 953-956.
- [26] Justin D.F., Zhaohui L., Steven S.X., Genetics of tan spot resistance in wheat // Theor. Appl Genet. – 2013. – Vol. 126(9). – P. 2197-2217.
- [27] Stock W.S. Chromosomal location and RAPD marker development for tan spot resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*, *Pyrenophora tritici-repentis*) // M. Sc. Thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Canada, 1996. – 109 p.
- [28] Lu H.J., Friesen T.L., Faris J.D. Genomic targeting and high-resolution mapping of the Tsn1 gene in wheat // Crop Sci. – 2004. – Vol. 44. – P. 951-962.
- [29] Singh P.K., Gonzalez-Hernandez J.L., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M., Hughes G.R. Identification and molecular mapping of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3 in tetraploid wheat // Phytopathology. – 2006a. – Vol. 96. – P. 885-889.
- [30] Lu H.J., Faris J.D. Macro- and microcolinearity between the genomic region of wheat chromosome 5B containing the Tsn1 gene and the rice genome // Functional and Integrative Genomics. – 2006. – Vol. 6. – P. 90-103.
- [31] Singh P.K., Mergoum M., Gonzalez-Hernandez J.L., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M., Hughes G.R. Genetics and molecular mapping of resistance to necrosis inducing race 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* in tetraploid wheat // Mol Breed. – 2008c. – Vol. 21. – P. 293-304.
- [32] Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Коваленко Н.М. Желтая пятнистость пшеницы. Методическое указания по изучению популяций возбудителя желтой пятнистости *Pyrenophora tritici-repentis* и устойчивости сортов. – СПб., 2012. – 56 с.
- [33] Martinez J.P., Oesch N. W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, ToxB, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis* // Mol. Plant-Microbe Interact. – 2004. – Vol. 17. – P. 467-474.
- [34] Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti I.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification // Phytopathology. – 2007. – Vol. 97. – P. 694-701.

- [35] Rees R.G. Susceptibility of Australian wheats to *P. tritici-repentis* // Aust. J. Agric. Res. – 1987. – Vol. 39. – P.141-151.
- [36] Riede C.R., Anderson, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat // Crop Sci. – 1996. – Vol. 36(4). – P. 905–909.
- [37] 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. – Vol. 97. – P. 345-355.
- [38] <http://maswheat.ucdavis.edu>.
- [39] Zhang Z., Timothy L.F., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification and validation of markers for marker-assisted selection against the Stagonosporam nodorumtoxin sensitivity genes Tsn1 and Snn2 in wheat // Mol. Breed. – 2009. – Vol. 23. – P. 35-49.

REFERENCES

- [1] Kovalenko N.M. Stability species Triticum L. and Aegilops L. To the causal organism yellow leaf spot of wheat (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. : Author. Cand. Biol. Sciences: 06.01.11. - St. Petersburg., 2005. - p. 9- 12. (in Russ.).
- [2] Koishybayev M.K. Features of development of stripe rust on winter wheat in the southern and south-eastern Kazakhstan. Achievements and prospects of agriculture, breeding and biology of crops: mes. rep. Inter. scientific. conf. - Almalaybak: Asyl Kitap, 2010. - p.145-147. (in Russ.).
- [3] Kremneva O.Yu. Population structure yellow leaf spot pathogen of wheat in the North Caucasus and the elements of protection against pathogen biologizing: Author. cand. biol. Sciences: 06.01.11. - Krasnodar: Science, 2007. - 21 (in Russ.).
- [4] Maraite H., Berny J.F., Goffi A. Epidemiology of tan spot in Belgium. Proc. of the 2nd Internat. Tan spot workshop. Fargo: North Dakota State University. 1992. P.73-79.
- [5] Cook D.J., Yarham. Plant Pathol. 1989. Vol. 38(1). P. 101-102.
- [6] Dumitras L., Bontea V. Data noi privinol parazitul foliar al griulu *Helminthosporium repentis* Diedicke. Studii si Cercetari de Biologie Vegetala. 1981. Vol. 33. P. 169-172.
- [7] Sarova J. Wheat leaf spot disease *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Research institute of crop production, Prague. 2004. 18 p.
- [8] Pospekhov G.V. Features of growth and fruiting of the fungus *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs. Mycology culture. and fitopatol. - 1989. - V. 23, no. 2. - P. 117-121. (in Russ.).
- [9] Sultanov N.Z. Biological characteristics of the pathogen yellow leaf spot of winter wheat in the southeast of Kazakhstan. Bulletin of Agricultural Science of Kazakhstan. - Almaty, 2007. - № 3. - p. 4-6. (in Russ.).
- [10] Koishybayev M.K. Plant diseases. - Almaty Bastau, 2002. - 367 p. (in Russ.).
- [11] Thomas A., Feng G.H., Bockus W.W., Leach J.E. Purification of a cultivar – specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot wheat. Mol. Plant Microbe Interact. 1990. Vol. 3. P. 221-224.
- [12] Strelkov S. E., Lamari L., Ballance G. M. Characterization of a host-specific protein toxin (Ptr ToxB) from *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 1999. Vol. 12. P. 728-732.
- [13] Effertz R.J., Meinhardt S.W., Anderson J.A., Jordahl J.G., Franc L.J. Identification of a chlorosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* and the chromosomal location of an insensitivity locus in wheat. Phytopathology. 2002. Vol. 92. R. 527-533.
- [14] Ali S., Ling, H., Meinhardt S., Franc L. A new race of *Pyrenophora tritici-repentis* that produces a putative host-selective toxin. Phytopathology. 2002. Vol. 92. 3 p.
- [15] Tuori R.P., Wolpert T.J., Ciuffetti L.M. Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. Mol. Plant-Microbe Interact. 1995. Vol. 8. P. 41-48.
- [16] Zhang H., Franc L.J., Jordahl J.G., Meinhardt S. W. Structural and physical properties of a necrosis-inducing toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. Phytopathology. 1997. Vol. 87. P. 154-160.
- [17] Strelkov S.E., Lamari, L. Host-parasite interactions in tan spot [*Pyrenophora tritici-repentis*] of wheat. Can J Plant Pathol. 2003. Vol. 25. P. 339-349.
- [18] Lamari L., Strelkov S., Yahyaoui A., Orabi J., Smith R.B. The identification of two new races of *Pyrenophora tritici-repentis* from the host center of diversity confirms a one-to-one relationship in tan spot of wheat. Phytopathology. 2003. Vol. 93. P. 391-396.
- [19] Lamari L., Bernier C.C. Toxin of *Pyrenophora tritici-repentis*: host-specificity, significance in disease, and inheritance of host reaction. Phytopathology. 1989a. Vol. 79. R. 740-744.
- [20] 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. Vol. 35. P. 203-213.
- [21] Ballance G.M., Lamari L., Kowatsch R., Bernier C.C. Cloning, expression and occurrence of the gene encoding the Ptr necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis* //Mol. Plant Pathol. Online publication [www.bspp.org.uk/mppl/] 1996/1209ballance.
- [22] 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. Plant Cell. 1997. Vol. 9. P. 135-144.
- [23] Faris J.D., Anderson J.A., Franc L.J., Jordahl J.G. Chromosomal location of a gene conditioning insensitivity in wheat to a necrosis-inducing culture filtrate from *Pyrenophora tritici-repentis*. Phytopathology. 1996. Vol. 86. P. 459-463.
- [24] Manning V.A., Pandelova I., Ciuffetti L.M. A race for a novel host-selective toxin. Phytopathology. 2002. Vol. 92. 51 p.
- [25] Friesen T.L., Stukenbrock E.H., Liu Z.H., Meinhardt S., Ling H., Faris J.D., Rasmussen J.B., Solomon P.S., McDonald B.A., Oliver R.P. Emergence of a new disease as a result of interspecific virulence gene transfer. Nature Genetics. 2006. Vol. 38. P. 953-956.

- [26] Justin D.F., Zhaohui L., Steven S.X., Genetics of tan spot resistance in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 2013. Vol. 126(9). R. 2197-2217.
- [27] Stock W.S. Chromosomal location and RAPD marker development for tan spot resistance in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*, *Pyrenophora tritici-repentis*). M.Sc. Thesis. University of Manitoba, Winnipeg, Canada. 1996. 109 p.
- [28] Lu H.J., Friesen T.L., Faris J.D. Genomic targeting and high-resolution mapping of the *Tsn1* gene in wheat. *Crop Sci.* 2004. Vol. 44. P. 951-962.
- [29] Singh P.K., Gonzalez-Hernandez J.L., Mergoum M., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M., Hughes G.R. Identification and molecular mapping of a gene conferring resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* race 3 in tetraploid wheat. *Phytopathology.* 2006a. Vol. 96. P. 885-889.
- [30] Lu H.J., Faris J.D. Macro- and microcolinearity between the genomic region of wheat chromosome 5B containing the *Tsn1* gene and the rice genome. *Functional and Integrative Genomics.* 2006. Vol. 6. P. 90-103.
- [31] Singh P.K., Mergoum M., Gonzalez-Hernandez J.L., Ali S., Adhikari T.B., Kianian S.F., Elias E.M., Hughes G.R. Genetics and molecular mapping of resistance to necrosis inducing race 5 of *Pyrenophora tritici-repentis* in tetraploid wheat. *Mol. Breed.* 2008c. Vol. 21. P. 293-304.
- [32] Mikhailova L.A., Mironenko N.V., Kovalenko N.M. Yellow pyatnistogst wheat. Methodical instructions for study of the populations of the pathogen yellow blotch *Pyrenophora tritici-repentis* and stability of varieties. - SPb., 2012. - 56 p. (in Russ.).
- [33] Martinez J.P., Oesch N. W., Ciuffetti L.M. Characterization of the multiple-copy host-selective toxin gene, *ToxB*, in pathogenic and nonpathogenic isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol. PlantMicrobe Interact.* 2004. Vol. 17. P. 467-474.
- [34] Andrie R.M., Pandelova I., Ciuffetti I.M. A combination of phenotypic and genotypic characterization strengthens *Pyrenophora tritici-repentis* race identification. *Phytopathology.* 2007. Vol. 97. P. 694-701.
- [35] Rees R.G. Susceptibility of Australian wheats to *P. tritici-repentis*. *Aust. J. Agric. Res.* 1987. Vol. 39. P. 141-151.
- [36] Riede C.R., Anderson, J.A. Linkage of RFLP markers to an aluminum tolerance gene in wheat. *Crop Sci.* 1996. Vol. 36(4). P. 905-909.
- [37] 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. Vol. 97. P. 345-355.
- [38] <http://maswheat.ucdavis.edu>
- [39] Zhang Z., Timothy L.F., Simons K.J., Xu S.S., Faris J.D. Development, identification and validation of markers for marker-assisted selection against the *Stagonosporam nodorum* toxin sensitivity genes *Tsn1* and *Snn2in* in wheat. *Mol. Breed.* 2009. Vol. 23. P. 35-49.

ПИРЕНОФОРОЗГА *PYRENOPHORA TRITICI-REPENTIS* ТӨЗІМДІ БИДАЙ ҮЛГІЛЕРІНІҢ МОЛЕКУЛАЛЫҚ СКРИНИНГІ

А. М. Кохметова¹, М. Н. Атишова¹, З. Б. Сапахова¹, Р. А. Уразалшев²

¹Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан,

²Қазақ егіншілік және өсімдік шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: бидай, пиренофороз, төзімділік гендері, молекулалық маркерлер.

Аннотация. Пиренофороз дүниежүзінің көптеген ауылшаруашылық аймақтарындағы қатты және жұмсақ бидайдың ең қауіпті ауруларының бірі болып табылады. бұл ауру өте қауіпті болып табылады және дүниежүзімен қоса Қазақстанда да үдемелі даму мүмкіндігіне ие. Патогеннің кері әсерінен өнім шығыны 60 % жетуі мүмкін. Зерттеу жұмысының мақсаты молекулалық маркерлерді қолданып, пиренофороздың тоха бір немесе бірнеше токсиндеріне төзімді тасымалдаушыларды идентификациялау. Пиренофорозға *Pyrenophora tritici-repentis* төзімді коллекциялық питомниктегі жұмсақ күздік бидай гермоплазмасына фитопатологиялық және молекулалық скрининг жүргізілді. Сорттар мен үлгілер пиренофорозға төзімділік және төзімсіздік деңгейімен сараланды. *ssg xfcpr394* маркері қолданылып молекулалық скрининг жүргізілді. Зерттеу нәтижесінде пиренофорозға төзімді 11 үлгі идентификацияланды. Алынған үлгілер пиренофороз саңырауқұлағының тоха токсиніне төзімділікті бақылайтын геннің рецессивті *tsn1* аллелінің тасымалдаушысы болып табылады. Қолдану аймағы: өсімдік генетикасы мен селекциясы.

Поступила 20.05.2015 г.