

## ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ОБРАЗЦОВ ЯЧМЕНЯ ИЗ ЭФИОПИИ ПО УСТОЙЧИВОСТИ К МУЧНИСТОЙ РОСЕ\*

Р.А. Абдуллаев<sup>1</sup>, Т.В. Лебедева<sup>1</sup>, Н.В. Алпатьева<sup>1</sup>, О.В. Яковлева<sup>1</sup>,  
О.Н. Ковалева<sup>1</sup>, кандидаты биологических наук,  
Е.Е. Радченко<sup>1</sup>, И.Н. Анисимова<sup>1</sup>, Б.А. Баташева<sup>2</sup>, доктора биологических наук,  
Ю.И. Карабицина<sup>1</sup>, Е.Б. Кузнецова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова,  
190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44  
E-mail: abdullaev.1988@list.ru

<sup>2</sup>Филиал Дагестанская опытная станция ВИР, 368612, Дербент, Дербентский район, с. Вавилово

*В лабораторных экспериментах исследовали ювенильную устойчивость 925 образцов ячменя из Эфиопии к северо-западной популяции возбудителя мучнистой росы *Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Marchal. Фенотипический скрининг позволил выделить 27 устойчивых к патогену образцов, 47 форм оказались гетерогенными по изучаемому признаку. Устойчивые и восприимчивые растения опытных образцов проанализировали с помощью молекулярных маркеров, разработанных для идентификации аллеля *mlo11*. Выявили 15 образцов, несущих аллель *mlo11*, который обеспечивает длительную устойчивость к мучнистой росе большинства современных сортов ячменя. Определена различная экспрессия устойчивости этих образцов, что можно объяснить как проявлением других, нетождественных *mlo11*, генов устойчивости, так и присутствием в генотипах выделенных образцов разных аллельных вариантов гена *mlo11*. Устойчивость к *B. graminis* остальных 59 форм контролируют эффективные гены, отличающиеся от *mlo11*.*

## GENETIC DIVERSITY OF BARLEY ACCESSIONS FROM ETHIOPIA FOR THE POWDERY MILDEW RESISTANCE

Abdullaev R.A., Lebedeva T.V., Alpatieva N.V., Yakovleva O.V., Kovaleva O.N.,  
Radchenko E.E., Anisimova I.N., Batasheva B.A., Karabitsina Yu.I., Kuznetsova E.B.

<sup>1</sup>Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources,  
190000, St. Petersburg, ul. Bolshaya Morskaya, 42-44  
E-mail: abdullaev.1988@list.ru

<sup>2</sup>Dagestan Experiment Station of VIR, 368612, Derbent, Derbentskiy rayon, s. Vavilovo

*Nine hundred and twenty five Ethiopian barley accessions were studied under laboratory experiments for juvenile resistance to North West population of powdery mildew casual agent *Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Marchal. Based on phenotypic screening, the 27 accessions resistant to the pathogen were selected and 47 forms were heterogeneous for the studied character. The resistant and susceptible plants of the examined accessions were analyzed with the use of molecular markers developed for identification of the *mlo11* allele. Fifteen accessions carrying the *mlo11* allele which determines durable resistance of most modern barley varieties to powdery mildew were revealed. The accessions differed by the resistance expression that can be explained both by the manifestation of other resistance genes which are inadequate to the *mlo11* and also by the presence of different *mlo11* allelic variants in the genotypes of the selected accessions. The resistance to *B. graminis* of other 59 forms is controlled by the effective genes which are different from *mlo11*.*

**Ключевые слова:** ячмень, *Blumeria graminis*, молекулярные маркеры, гены устойчивости

**Key words:** barley, *Blumeria graminis*, molecular markers, genes for resistance

Ячмени Эфиопии характеризуются огромным разнообразием, многими ценными биологическими и агрономическими качествами, в том числе устойчивостью к ряду заболеваний [1]. Исследование коллекции ячменя США (USDA National Small Grains Collection) позволило выявить местные образцы из Эфиопии, устойчивые к вирусу желтой карликовости

ячменя, русской пшеничной тле и грибным болезням – желтой ржавчине, темно-бурой листовой пятнистости, сетчатой пятнистости. Эфиопия оказалась центром концентрации форм ячменя с комплексной устойчивостью к вредным организмам. Более того, в родословной ряда доноров комплексной устойчивости из стран Европы и Америки присутствуют ячмени

\*Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-016-00075).

Эфиопии [2]. Показано, что эффективность против популяций возбудителя ринхоспориоза на северо-западе России сохраняет лишь один ген *Rrs9*, который выявлен у местного сорта ячменя из Эфиопии [3]. Образцы из Эфиопии несут также гены устойчивости к пыльной головне [4]. Кроме того наиболее популярный в селекции ген устойчивости ячменя к мучнистой росе *mlo11* был идентифицирован у местного ячменя из Эфиопии [5].

Известно свыше 100 генов, контролирующих устойчивость ячменя к мучнистой росе (возбудитель – *Blumeria graminis* (DC.) Golovin ex Speer f. sp. *hordei* Marchal), из которых большая часть является аллелями. Так, известно 34 аллеля гена *Mla* и свыше 30 – гена *Mlo* [5, 6]. К сожалению, большинство аллелей неэффективно против возбудителя заболевания. Практически единственный ген, обуславливающий длительную устойчивость к патогену во всем мире – *mlo11*. Продукты генов восприимчивости к мучнистой росе *MLO* (*Mildew Locus O*) растений – интегральные мембранные белки. У разных видов идентифицировано от 12 до 19 гомологов *MLO*-генов [7]. В 1997 г. был клонирован и секвенирован ген *Mlo* ячменя и показано, что опосредованная аллелем *mlo* устойчивость к заболеванию связана с мутациями, ведущими к потере функции гена [8]. Охарактеризовано более 30 индуцированных мутантов, нарушение экспрессии гена в которых обусловлено заменой единичных нуклеотидов [6]. В *mlo*-мутантах, где регуляторная функция гена нарушена, защитные реакции клетки проявляются раньше и/или сильнее [9]. У мутантных растений задерживается рост, происходит преждевременное старение листьев, снижается урожай зерна, а при пониженной температуре отмечается системный некроз.

Естественный мутант, обнаруженный среди ячменной Эфиопии, несет ген *mlo11*, который обуславливает не полную, а частичную устойчивость к патогену и не столь негативно сказывается на жизнеспособности растений. Его широко используют в селекции: половина яровых европейских ячменей несет аллель *mlo11* и лишь несколько сортов – *mlo9* [10]. У генотипов с аллелем *mlo11* в локусе *Mlo*, наряду с последовательностью дикого типа, присутствуют 11–12 повторов редуцированной последовательности [11]. Известен еще один аллельный вариант *cnv2* гена *mlo11*, который также обнаружен у местного образца из Эфиопии. Умеренная устойчивость форм с аллелем *mlo11* (*cnv2*) обусловлена присутствием двух копий повторяющихся единиц [12].

Сведения об устойчивости ячменей Эфиопии из обширной коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н. И. Вавилова (ВИР) к российским популяциям возбудителя мучнистой росы фрагментарны. Мы изучили небольшой фрагмент коллекции (27 образцов) и выявили устойчивый к патогену образец к-5448; три формы оказались гетерогенными. С помощью молекулярных маркеров показали, что устойчивые растения этих образцов защищены геном *mlo11* [13]. Поскольку изученная

выборка составляет менее 3% от хранящихся в коллекции ВИР 1065 образцов ячменя из Эфиопии, а частота носителей *mlo11* в ней довольно высока (14,8%), предположили, что более детальное исследование позволит выявить значительный потенциал доноров устойчивости к опасной болезни. Вероятно, среди ячменей Эфиопии обнаружатся носители и других, нетождественных *mlo11*, эффективных аллелей устойчивости к патогену.

Цель настоящей работы – оценить генетический потенциал изменчивости местных форм ячменя из Эфиопии по устойчивости к *B. graminis* f. sp. *hordei*.

**Методика.** В лаборатории при искусственном заражении интактных растений в течение двух лет оценили устойчивость к северо-западной популяции возбудителя мучнистой росы 925 форм ячменя из Эфиопии, а также 47 линий с известными генами устойчивости. В качестве контролей использовали почти изогенную линию сорта Ingrid *mlo11* и восприимчивый сорт Темп (к-22055, Краснодарский край). Выращивание растений и инкубирование на них гриба проводили в климатической камере «Barnstead 845-2» при 12-часовом фотопериоде и температуре 16°C (день), 13°C (ночь). Испытываемые и контрольные образцы (по 15-20 зерен) высевали в пластиковые кюветы на смоченную водой вату, помещали в климатическую камеру и через 1 нед проростки заражали путем стряхивания на них конидий с сильно пораженных мучнистой росой растений. Устойчивость оценивали с помощью шкалы от 0 (высокоустойчивый) до 4 [14]. Инокулюмом была популяция гриба, собранная в восприимчивых растениях ячменя на экспериментальном поле научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» (Санкт-Петербург).

Параллельно с фенотипическим скринингом выделяли тотальную ДНК из проростков (10–15 растений каждого опытного образца) по методике Д.Б. Дорохова, Э. Клоке [15] с модификациями [16]. Ген *mlo11* идентифицировали с помощью диагностических маркеров, разработанных Р. Piffanelli с соавт. [11]. Амплификацию проводили в реакционной смеси объемом 15–25 мкл, которая содержала геномную ДНК (50–100 нг), однократный реакционный буфер, 1,5–3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM каждого из нуклеотидов, 0,25 мкМ каждого праймера, 1 е. а. Taq ДНК полимеразы (Диалат). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в амплификаторе MyCycler (Bio-Rad, США). Последовательности использованных праймеров представлены в табл. 1. Амплифицированные фрагменты разделяли с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в

Табл. 1. Последовательность использованных в работе праймеров [16]

Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')
ADUP7	CTCAAGCTTGCCACCATGTCGGACAAAAAAGGG
Mlo6	CATCTACTACTAGCATGTACC
Mlo10	GTCCTGCCACCTAAGTAGCAG

**Табл. 2. Устойчивость к мучнистой росе линий ячменя с известными генами устойчивости**

№ по каталогу ВИР	Образец	Происхождение	Устойчивость, балл	
			2016 г.	2017 г.
30218	ИЛ* сорта Ingrid <i>mlo1</i>	Германия	1	1
30219	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo3</i>	«	0	0
30220	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo4</i>	«	0	0
30221	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo5</i>	«	1	0
30222	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo8</i>	«	0	0
30223	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo9</i>	«	1	1
30224	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo10</i>	«	0	0
30225	ИЛ сорта Ingrid <i>mlo11</i>	«	1	0
30237	Diamant×IB-54B <i>Mla16</i>	«	1	0
30238	Diamant×IB-86B <i>Mla19</i>	«	0	1
31005	<i>Mla16</i>	Израиль	0	0
31007	<i>Mla18</i>	«	0	1
31011	<i>Mlai</i>	«	1	1
22055	Темп (неустойчивый контроль)	Краснодарский край	4	4

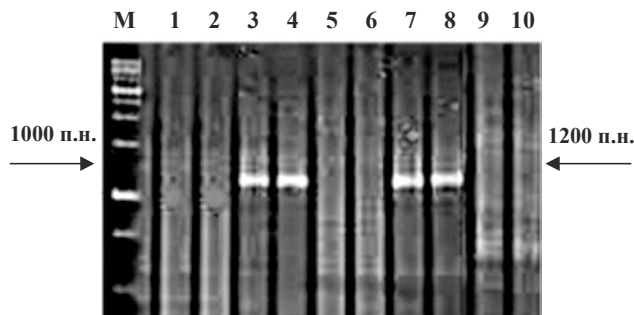
ИЛ\* – изогенная линия.

**Табл. 3. Образцы ячменя с геном устойчивости *mlo11***

№ по каталогу ВИР	Образец	Разновидность	Устойчивость, балл
20029	Л. ANOR 2543/63	<i>nudideficiens</i>	1
20041	Л. ANOR 4256/63	<i>nigrinudum</i>	1,2,4
20048	Л. ANOR 3537/63	<i>dupliatrum</i>	0,4
20081	Линия ANOR 4259/63	<i>nigrinudum, duplinigrum, nudimelanocrithum</i>	1
20097	Линия ANOR 1506/66	<i>dupliatrum, duplinigrum</i>	1
21267	DZ02-602	<i>deficiens</i>	0,1
22308	H.2198 Ubamer Vaco	<i>griseinudunerme</i>	1,2
22752	Местный	<i>nudimelanocrithum</i>	0
22986	Dz02-557	<i>deficiens</i>	1,2,3
23450	H.2866 Coll.Halle EP80	<i>griseinudunerme</i>	1
24821	H3048 Coll.Halle	<i>virideinerme</i>	0,1
25008	Местный	<i>dupliatrum</i>	2
25009	Местный	<i>nigrinudum</i>	2
29720	Ethiopia AB.2193	<i>nudimelanocrithum</i>	0
30313	Ethiopia Ab9	<i>duplialbum</i>	0,1

1хTBE буфере. Гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Для оценки размера фрагментов использовали ДНК-маркер FastRuler™ SM1113 (Fermentas).

**Результаты и обсуждение.** Используемая в экспериментах северо-западная популяция гриба сильно поражала 34 линии с идентифицированными генами устойчивости к мучнистой росе и была авирулентна к линиям, несущим гены *mlo1*, *mlo3*, *mlo4*, *mlo5*, *mlo8*, *mlo9*, *mlo10*, *mlo11*, *Mla16*, *Mla18*, *Mla19*, *Mlai* (табл. 2). Вирулентность популяции к тестерным линиям ячменя в течение двух лет не менялась.



**ПЦР-анализ ДНК образцов ячменя при использовании праймеров ADUP7 и Mlo6, фрагмент длиной ~1200 п. н. специфичен для аллеля *mlo11*:**  
 1, 2 – образец к-20060, восприимчивый к *B. graminis*;  
 3, 4 – устойчивый образец к-21267 с аллелем *mlo11*;  
 5, 6 – устойчивый образец к-20864;  
 7, 8 – изогенная линия к-30225 с аллелем *mlo11*;  
 9, 10 – восприимчивый сорт Белогорский (к-22089);  
 М – маркер молекулярной массы.

Устойчивостью к патогену (поражение растений 0–2 балла) характеризовались 27 образцов, 47 форм оказались гетерогенными по изученному признаку, то есть 8,2% изученных нами образцов из Эфиопии несут эффективные гены устойчивости к *B. graminis* f. sp. *hordei*.

Устойчивые и восприимчивые растения опытных образцов проанализировали с помощью молекулярных маркеров, разработанных для идентификации аллеля *mlo11*. Наличие ампликонов длиной 1200 пар нуклеотидов (п.н.) при использовании праймеров ADUP7 и Mlo6 (рисунок) и 440 п.н. – при использовании праймеров Mlo6 и Mlo10 было характерно для устойчивых растений 15 образцов, то есть можно утверждать, что они защищены геном *mlo11*. Поражение всех растений 12 носителей аллеля *mlo11* не превышало более 2 баллов, 3 образца были гетерогенны по устойчивости к патогену (табл. 3).

Ранее [13] мы изучили 27 коллекционных образцов из Эфиопии и выявили устойчивый к мучнистой росе образец к-5448; три образца (к-8555, к-8682, к-17554) оказались гетерогенными по изученному признаку. С помощью молекулярных маркеров выявлено, что устойчивые компоненты выделенных форм защищены геном *mlo11*. Таким образом, в результате исследования 952 (925 + 27 ранее изученных) образцов коллекции ВИР мы определили 19 носителей аллеля *mlo11*. Экспрессия устойчивости у них различна: 0-2 балла (табл. 3), что можно объяснить как проявлением других, нетождественных *mlo11*, генов устойчивости, так и присутствием в генотипах выделенных образцов разных аллельных вариантов гена *mlo11*.

Отобранные в ходе работы генотипы могут служить донорами гена *mlo11* при создании устойчивых к мучнистой росе сортов. Однако наиболее важный результат исследований – обнаружение среди ячменей Эфиопии значительного числа носителей и других, нетождественных *mlo11*, эффективных аллелей устойчивости к мучнистой росе.

**Литература.**

1. Вавилов Н.И. Происхождение и география культурных растений. – Л.: Наука, 1987. – 440 с.
2. Bonman J.M., Bockelman H.E., Jackson L.F., Steffenson B.J. Disease and insect resistance in cultivated barley accessions from the USDA National Small Grains Collection // *Crop Sci.* – 2005. – V. 45. – № 4. – P. 1271-1280.
3. Коновалова Г.С., Соболева О.Н. Источники устойчивости ячменя из Юго-Восточной Азии к возбудителю ринхоспориоза (*Rhynchosporium secalis*) // *Микология и фитопатология.* – 2010. – Т. 44. – Вып. 3. – С. 248-254.
4. Хохлова А.П. Устойчивость ячменя к пыльной головне и состав генов, контролирующих этот признак. Дис. ... канд. с.-х. наук. – Л.: ВИР. – 1990. – 151 с.
5. Weibull J., Walther U., Sato K., Habekuß A., Kopahnke D., Proeseler G. Diversity in resistance to biotic stresses // *Diversity in barley (Hordeum vulgare).* Elsevier, 2003. – P. 143-178.
6. Reinstädler A., Müller J., Jerzy H., Czembor J.H., Piffanelli P., Panstruga R. Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionally important domains in the heptahelical barley Mlo protein // *BMC Plant Biology.* – 2010. – V. 10. – Article 31. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-31>.
7. Iovieno P., Andolfo G., Schiavulli A., Catalano D., Ricciardi L., Frusciantè L., Raffaella M., Pavan S. Structure, evolution and functional inference on the Mildew Locus O (MLO) gene family in three cultivated Cucurbitaceae spp. // *BMC Genomics.* – 2015. – V. 16. – Article 1112. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2325-3>.
8. Büschges R., Hollricher K., Panstruga R., Simons G., Wolter M., Frijters A., Van Daelen R., Van der Lee T., Diergaarde P., Groenendijk J., Töpsch S., Vos P., Salamini F., Schulze-Lefert P. The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance // *Cell.* – 1997. – V. 88. – № 5. – P. 695-705.
9. Wolter M., Hollricher K., Salamini F., Schulze-Lefert P. The mlo resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype // *Mol. Gen. Genet.* – 1993. – V. 239. – № 1-2. – P. 122-128. <https://doi.org/10.1007/BF00281610>.
10. Dreiseitl A. Frequency of powdery mildew resistances in spring barley cultivars in Czech variety trials // *Plant Prot. Sci.* – 2012. – V. 48. – № 1. – P. 17-20. <https://doi.org/10.17221/11/2011-PPS>.
11. Piffanelli P., Ramsay L., Waugh R., Benabdelmouna A., D'Hont A., Hollricher K., Jørgensen J.H., Schulze-Lefert P., Panstruga R. A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew // *Nature.* – 2004. – V. 430. – № 7002. – P. 887-891.
12. Ge X., Deng W., Lee Z.Z., Lopez-Ruiz F.J., Schweizer P., Ellwood S.R. Tempered mlo broad-spectrum resistance to barley powdery mildew in an Ethiopian landrace // *Scientific Reports.* – 2016. – V.6. – Article 29558. [doi: org/10.1038/srep29558](https://doi.org/10.1038/srep29558).
13. Алпатьева Н.В., Абдуллаев Р.А., Анисимова И.Н., Губарева Н.К., Ковалева О.Н., Радченко Е.Е. Устойчивые к мучнистой росе образцы местного ячменя из Эфиопии // *Труды по прикл. бот., ген. и сел.* – 2016. – Т. 177. – Вып. 4. – С. 70-78.
14. Mains E.B., Dietz S.M. Physiologic forms of barley mildew *Erysiphe graminis* DC. // *Phytopath.* – 1930. – V. 20. – № 3. – P. 229-239.
15. Дорохов Д.Б., Клоке Э. Быстрая и экономичная технология RAPD анализа растительных геномов // *Генетика.* – 1997. – Т. 33. – № 4. – С. 443-450.
16. Анисимова И.Н., Алпатьева Н.В., Тимофеева Г.И. Скрининг генетических ресурсов растений с использованием ДНК-маркеров: основные принципы, выделение ДНК, постановка ПЦР, электрофорез в агарозном геле. Методические указания. – СПб.: ВИР, 2010. – 30 с.

Поступила в редакцию 20.08.18

После доработки 25.09.18

Принята к публикации 25.10.18