

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Розанова Ирина Вениаминовна

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И МАРКИРОВАНИЕ
ГЕНОМНЫХ ЛОКУСОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С
УСТОЙЧИВОСТЬЮ ЯЧМЕНЯ К ГРИБНЫМ
БОЛЕЗНЯМ**

Специальность 1.5.7

Генетика

Диссертация на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д-р биол. наук, профессор РАН,
Хлесткина Елена Константиновна

Новосибирск 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	9
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	16
1.1. Доместикация и традиционная селекция ячменя.....	16
1.2. Новые подходы в селекции ячменя с развитием молекулярной генетики.....	19
1.2.1. Методы анализа полиморфизма ДНК.....	19
1.2.2. Маркер-ориентированная селекция ячменя.....	22
1.3. Новые подходы к селекции ячменя в постгеномный период.....	24
1.3.1. Методы исследования генома растений.....	24
1.3.2. Секвенирование генома ячменя.....	28
1.3.3. Статистические методы поиска ассоциаций между маркером и признаком.....	30
1.4. Механизмы устойчивости.....	40
1.4.1. Общие механизмы устойчивости растений.....	41
1.4.2. Механизмы устойчивости ячменя.....	50
1.5. Лocusы устойчивости ячменя к биотическому стрессу.....	53
1.5.1. Темно-бурая пятнистость.....	54
1.5.2. Корневые гнили.....	57
1.5.3. Сетчатая пятнистость.....	58
1.6. Заключение к обзору литературы.....	60
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	63
2.1. Растительный материал.....	63
2.2. Изоляты патогенов.....	67
2.3. Оценка устойчивости в ювенильной фазе.....	68
2.3.1. Оценка устойчивости к болезням: темно-бурая пятнистость и сетчатая пятнистость.....	68
2.3.2. Определение устойчивости к корневым гнилям.....	69
2.4. Выделение ДНК растений.....	71

2.5. Генотипирование коллекции.....	71
2.6. Популяционная структура.....	72
2.7. Полногеномный анализ ассоциаций	73
2.8. Двублоковый анализ (2B-PLS анализ).....	74
2.9. Анализ кандидатных SNP для конструирования на их основе KASP маркеров и аллель-специфичного ПЦР-маркера	75
2.10. Статистическая обработка результатов.....	77
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	78
3.1. Генотипирование.....	78
3.2. Популяционная структура изучаемой выборки.....	78
3.3. Фенотипирование коллекции ячменя по признаку устойчивости к болезням	80
3.3.1. Сетчатая пятнистость	80
3.3.2. Темно-бурая пятнистость.....	81
3.3.3. Корневые гнили.....	82
3.4. Полногеномный анализ ассоциаций	83
3.4.1. Поиск локусов устойчивости ячменя к сетчатой пятнистости.....	83
3.4.2. Поиск локусов устойчивости ячменя к темно-бурой пятнистости.....	88
3.4.3. Поиск локусов устойчивости к возбудителю корневых гнилей и анализ корреляции фенотипических данных по устойчивости к <i>C. sativus</i> , как возбудителя и корневых гнилей и темно-бурой пятнистости	94
3.5. PLS анализ. Выявление расонеспецифичной устойчивости.....	95
3.5.1. Темно-бурая пятнистость.....	95
3.5.2. Сетчатая пятнистость	99
3.5.3. Корневые гнили.....	102
3.5.4. Расчет полногеномного анализа ассоциаций с использованием фенотипической бикомпоненты	104
3.6. Разработка и валидация диагностических ПЦР-маркеров.....	108
3.6.1. KASP-маркеры устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости....	108
3.6.2. Аллель-специфичный маркер к локусу JHI-Hv50k-2016-156999.....	114
3.6.3. KASP-маркеры устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости	119

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	123
4.1 Устойчивость сибирских сортов ярового ячменя к болезням, вызываемым гемибиотрофными грибами	123
4.2. Ассоциация «маркер-признак» в современных исследованиях по количественной генетике устойчивости ячменя к грибным болезням	124
4.2.1. Устойчивость к <i>C. sativus</i>	125
4.1.2. Устойчивость к <i>P. teres</i>	134
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	142
ВЫВОДЫ.....	143
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	145
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	184

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МОС – маркер-ориентированная селекция

пн – пар нуклеотидных оснований

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

сМ – сантиморган

2В-PLS – two-dimensional partial least squares, метод частичных наименьших квадратов

AFLP – amplified fragment length polymorphism, полиморфизм длины амплифицированных фрагментов

Avr – avirulence, гены авирулентности

BAC – bacterial artificial chromosome, искусственная бактериальная хромосома

BAK1 – brassinosteroid 1-associated kinase 1 – функциональная киназа

CAPS – cleaved amplified polymorphic sequences, метод расщепленной амплифицированной полиморфной последовательности

СС – coiled coil, спиральная катушка или спиральный домен

CNL – белки CC-NBS-LRR

DArT – diversity array technology, ДНК-чип технология для изучения генетического разнообразия

dbEST – expressed sequence tags database, база данных экспрессирующихся последовательностей

DH – double haploid, дигаплоид

EST – expressed sequence tag, экспрессирующаяся последовательность

ETI – effector-triggered immunity, иммунитет, запускаемый эффекторами

FDR – false discovery rate, критерий Бенжамина-Хохберга

GBS – genotyping-by-sequencing, генотипирование путем секвенирования

GLM – general linear model, обобщенная линейная модель

GWAS – genome-wide association studies, полногеномный анализ ассоциаций

Hi-C – технология для оценки пространственной близости локусов в геноме.

HR – hypersensitive response, реакция сверхчувствительности

Illumina – платформа секвенирования, коммерциализованная в 2006 году.

KASP – kompetitive allele-specific PCR, компетентная конкурентная аллель-специфическая ПЦР

LD – linkage disequilibrium, неравновесие по сцеплению

LRR – leucine-rich repeats, богатый лейцином повторяющийся домен

MAPK – mitogen-activated protein kinases, митоген-активируемые протеинкиназы

MCMC – Markov chain Monte Carlo, марковская цепь Монте-Карло

MLM – mixed linear model, смешанная линейная модель

MR – medium resistance, неполная устойчивость

MS – medium susceptibility, средняя восприимчивость

MTP – minimum tiling path - составление полногеномной последовательности по принципу минимального количества ее составных частей при максимальной плотности покрытия

NBS-LRR – nucleotide-binding site (NBS)-leucine-rich repeat (LRR) нуклеотид-связывающий сайт с богатыми лейцином повторами, рецептор

NGS – next generation sequencing, технология секвенирования нового поколения

NLR – nucleotide-binding leucine rich repeat receptor, нуклеотид-связывающий рецептор с богатыми лейцином повторами

NSGC – National small grains collection in USA, Национальная коллекция зерен в США

- PAMP – pathogen-associated molecular patterns, молекулярный паттерн, ассоциированный с патогеном
- PCA – principal component analysis, анализ главных компонент
- PRR – pattern recognition receptor, рецепторы распознавания образов
- PTI – PAMP-triggered immunity, иммунитет, запускаемый лигандами PAMP
- QQ plot – quantile-quantile plot, график вероятностей
- QTL – quantitative trait locus, локус, ассоциированный с количественным признаком
- R – resistance, устойчивость
- RAPD – random amplified polymorphic DNA, случайно модифицированная амплифицированная полиморфная ДНК
- RFLP – restriction fragment length polymorphism, полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
- R_h – high resistance, высокая устойчивость
- RILs – recombinant inbred lines, рекомбинантные инбредные линии
- RLK – receptor-like kinases, рецептороподобные киназы
- RLP – receptor-like proteins, рецептороподобные белки
- RNA-seq – метод анализа транскриптома при использовании высокопроизводительного секвенирования
- RVA – rapid visco analyzer, прибор вискозиметр
- S – susceptibility, восприимчивость
- SNP – single nucleotide polymorphism, однонуклеотидный полиморфизм
- SSR – simple sequences repeats, простые повторяющиеся последовательности
- STAND – signal transduction ATPases with Numerous Domains, сигнальная трансдукция АТФаз с многочисленными доменами
- TIR – домен, подобный рецептору Toll/интерлейкина-1;
- TNL – белки TIR-NBS-LRR

WGS – whole genome shotgun, полногеномное секвенирование методом дробовика, комплексный метод анализа целых геномов

WRKY – домен, связанный с фактором транскрипции «цинковый палец»

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. По сведениям Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, площадь посевов ячменя в мире составляет более 50 млн га, это пятое место после пшеницы, кукурузы, риса и сои (<http://www.fao.org/faostat/ru/>). *H. vulgare* характеризуется коротким периодом вегетации, холодо- и засухоустойчивостью, выдерживает защелачивание и засоление почв, что делает его подходящей культурой для возделывания в различных природно-климатических зонах от северных до экваториальных широт. Около двух третей всех объемов производимого ячменя используется для кормовых целей, почти треть приходится на нужды пивоваренной и спиртовой промышленности, до 3% урожая используется в продовольственных целях, а также для получения крахмала для пищевой или химической промышленности (Shewry, Ullrich, 2014).

Гембиотрофные патогены, такие как *Cochliobolus sativus* Drechs. Ex Dastur (возбудитель темно-бурой пятнистости и корневой гнили) и *Pyrenophora teres* f. *teres* Drechsler (возбудитель сетчатой пятнистости) распространены повсеместно в ареале возделывания ячменя. Ежегодные потери урожая от данных патогенов составляют от 10 до 20%, а в благоприятные для развития болезни годы достигают 40-45 %. Все сорта ячменя, зарегистрированные в Государственном реестре селекционных достижений, восприимчивы к сетчатой и темно-бурой пятнистостям (Afanasenko, 2015). Мировое растениеводство, в том числе и в России, ориентировано на ресурсосберегающие и экологически безопасные технологии, поэтому устойчивость к болезням становится одним из важных показателей конкурентоспособности сортов.

В конце XX века подходы традиционной селекции были дополнены методами ускоренного отбора на основе анализа полиморфизма ДНК. Один из таких подходов – маркер-ориентированная селекция (МОС) – основан на использовании ДНК-маркеров, диагностических для хозяйственно-ценных признаков. Для того чтобы разработать ДНК-маркеры, способные точно предсказать фенотип, необходимо провести предварительное картирование локусов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки. В последние годы для поиска ассоциаций между фенотипом и генотипом используется полногеномный анализ ассоциаций (GWAS, genome-wide association study), который значительно расширяет генетическое разнообразие доноров устойчивости к возбудителям заболеваний (Novakazi et al., 2019, Afanasenko et al., 2022).

До начала данного исследования локусы, определяющие устойчивость к *C. sativus* и к *P. teres*, были выявлены на всех хромосомах ячменя. В случае устойчивости к *P. teres* наибольшее количество локусов картировано в хромосомах 3Н и 6Н (Steffenson 1996; Novakazi et al., 2019a; Afanasenko et al., 2022). В прицентромерном районе хромосомы 6Н предполагаются либо три тесно сцепленных гена, либо локус, в котором встречаются не менее трех разных аллелей устойчивости (Koladia et al., 2017). В хромосоме 3Н предполагается наличие двух комплементарных генов устойчивости к *P. teres* (Dinglasan et al., 2019). В случае устойчивости к *C. sativus* было картировано три гена: *Rcs6* (Bilgic et al., 2006) и *Scs6* (Leng et al., 2018) в хромосоме 1Н, *Rcs5* (Steffenson et al., 1996) на хромосоме 7Н и *Rbs7* в хромосоме 6Н (Wang et al., 2017, 2019). До сих пор оставался открытым вопрос о создании диагностических ДНК-маркеров на основе геномных локусов, ассоциированных с устойчивостью к изучаемым болезням. На данный момент отсутствуют данные о генетическом контроле

устойчивости к темно-бурой и сетчатой пятнистостям и корневой гнили у сортов ячменя сибирской селекции.

Цели и задачи

Целью настоящей работы являлось выявление геномных локусов ячменя, ассоциированных с устойчивостью к болезням, вызываемым грибными патогенами *Pyrenofora teres f. teres* и *Cochliobolus sativus*, и разработка с последующей валидацией диагностических ДНК-маркёров для селекционных программ.

Были поставлены следующие задачи:

1. Провести оценку сортообразцов сибирской коллекции ячменя на устойчивость к сетчатой пятнистости (патоген *P. teres f. teres*), темно-бурой пятнистости и корневой гнили (патоген *C. sativus*) на стадии проростков.

2. Генотипировать сортообразцы при помощи SNP-чипа высокой плотности и определить на основе полученных результатов популяционную структуру коллекции ячменя.

3. С помощью GWAS и PLS анализа выявить геномные районы, ассоциированные с устойчивостью ячменя к индивидуальным изолятам исследуемых грибных болезней (темно-бурая пятнистость, сетчатая пятнистость, корневые гнили).

4. На основе анализа SNP в выявленных геномных районах, разработать и валидировать ПЦР-маркеры для маркер-контролируемого отбора устойчивых генотипов.

Научная новизна работы

С помощью анализа ассоциации «генотип-фенотип» (при использовании SNP-чипа «Barley 50 K Illumina Infinium iSELECT») впервые выявлены геномные

районы, значимо ассоциированные с устойчивостью сибирских сортов ячменя к темно-бурой (пять районов) и сетчатой (шесть районов) пятнистостям. Впервые геномные районы, ассоциированные с устойчивостью ячменя к темно-бурой и сетчатой пятнистостям, были маркированы диагностическими ПЦР-маркерами, подтвержденными на независимых выборках образцов ячменя.

Теоретическая и научно-практическая ценность работы

Знания о выявленных геномных локусах, ассоциированных с устойчивостью к грибным болезням, являются основой для дальнейшего установления молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости ячменя к темно-бурой и сетчатой пятнистостям, в том числе для реконструкции генетических сетей, контролирующей устойчивость к грибным патогенам.

Показана эффективность PLS анализа для выявления генетических компонент, на основе которых может проводиться предсказание высокого уровня количественной устойчивости и групповой устойчивости ячменя к грибным болезням.

Выявленные и маркированные источники устойчивости к сетчатой и темно-бурой пятнистостям являются ценным исходным материалом для улучшения ярового ячменя по признакам устойчивости.

Разработанные в данном исследовании диагностические ПЦР-маркеры, в том числе запатентованный маркер (патент RU2740404C1), могут быть использованы для ускоренного, экономичного и эффективного отбора устойчивых форм среди селекционного материала.

Полученные результаты используются в образовательных программах в Новосибирском государственном университете и Университете «Сириус».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Устойчивость ячменя к темно-бурой пятнистости, вызываемой патогеном *Cochliobolus sativus*, ассоциируется с районом 15.1-18.8 сМ на хромосоме 3Н, маркированным четырьмя SNP: JHI-Hv50k-2016-156842, -156820, -156999 и -157182.
2. Устойчивость ячменя к сетчатой пятнистости, вызываемой патогеном *Pyrenophora teres f. teres*, ассоциируется с районом хромосомы 3Н, локализованным в позиции 52.6 сМ, который маркирован SNP JHI-Hv50k-2016-183207, и с районом на хромосоме 6Н, локализованном в позиции 54.89 сМ, который маркирован SNP JHI-Hv50k-2016-398663.
3. Маркеры, разработанные на основе выявленных SNP, ассоциированные с устойчивостью к темно-бурой и сетчатой пятнистостям, целесообразны для применения в маркер-ориентированной селекции для получения форм ячменя устойчивых к грибным заболеваниям.

Апробация результатов

По материалам диссертации опубликовано 5 статей в журналах из перечня ВАК. Результаты работы были представлены на научных конференциях: «Генетические ресурсы растений для генетических технологий: к 100-летию Пушкинских лабораторий ВИР» (Санкт-Петербург, 2022), PlantGen2021 (Новосибирск, 2021), «V всероссийский молодежный научный форум, секция Сельское хозяйство и продукты питания» (Москва, 2020), V Международная конференция «Генофонд и селекция растений» (Новосибирск, 2020), XII Международная школа молодых ученых «System Biology and Bioinformatics», SBB-2020 (Ялта, 2020), 5-я Международная научная конференция «Генетика, геномика, биоинформатика и биотехнология растений», PlantGen2019 (Новосибирск, 2019), 5-я Международная конференция по биотехнологии и

селекции зерновых, CBB5, Section of EUCARPIA (Венгрия, Будапешт, 2019), «VII Съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ, и ассоциированные симпозиумы» (Санкт-Петербург, 2019), 17-я Международная конференция, EWAC-EUCARPIA (Бухарест, Румыния, 2018), IV Международная конференция «Генофонд и селекция растений» (Новосибирск, 2018), X Международная школа молодых ученых «System Biology and Bioinformatics», SBB-2018 (Новосибирск, 2018), IX Международная школа молодых ученых «System Biology and Bioinformatics», SBB-2017 (Ялта, 2017), III Международная конференция «Генофонд и селекция растений», (Новосибирск, 2017).

Структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, содержащей 287 источников, из них 263 на иностранном языке. Работа изложена на 201 странице, содержит 23 таблицы, 27 рисунков и 6 таблиц в приложении.

Личный вклад автора

Основные результаты работы были получены и проанализированы автором самостоятельно. Фитопатологические данные оценки болезней были предоставлены коллегами из Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ВИЗР, Санкт-Петербург) в рамках научного сотрудничества. Генотипирование ДНК образцов проводилось компанией Traitgenetics GmbH (Гатерслебен, Германия). Автор выделял ДНК для генотипирования и провел анализ структуры популяции сибирского генофонда

ячменя на основе данных генотипирования. Анализ ассоциаций «генотип-фенотип» при использовании методов GWAS и PLS, корреляционный анализ, интерпретация данных, визуализация результатов на хромосомных картах ячменя, подбор SNP, разработка на их основе ПЦР-маркеров и валидация этих маркеров на независимых выборках были проведены автором. SNP-локус JHI-Nv50k-2016-156999, предложенный автором диссертации к использованию в качестве диагностического, разрабатывался и апробировался в рамках магистерской работы С.А. Горобец, (НГАУ, Новосибирск) под методическим руководством к.б.н. Шоевой О.Ю. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Доместикация и традиционная селекция ячменя

Одомашненный ячмень, *Hordeum vulgare subsp vulgare* L., один из наиболее важных объектов мирового сельского хозяйства. Это однолетнее, преимущественно самоопыляемое, диплоидное ($2n = 14$ хромосом) растение. Является одной из основных злаковых культур наряду с пшеницей, но, в сравнении с последней, он рассматривается как менее полноценный источник необходимых питательных веществ (Zohary et al., 2012). При этом в отличие от пшеницы, ячмень характеризуется холодо- и засухоустойчивостью и выдерживает защелачивание и засоление почв (Willcox, 2005), благодаря чему является основной зерновой культурой на обширных территориях. Помимо продовольственного назначения, ячмень также служит сырьем для пивоваренной промышленности и является важной кормовой культурой.

В процессе доместикации растений отбирались формы, наиболее полно обеспечивающие человека надежными источниками питания. Согласно археологическим данным, первыми доместигированными видами были представители семейства злаковых, относящиеся к родам ячмень (*Hordeum* L.) и пшеница (*Triticum* L.). Они были доместигированы на территории Дуги плодородия во второй половине одиннадцатого века до нашей эры и стали основными культурами для большинства цивилизаций Старого Света (Fairbairn, 2010).

Выделяют несколько факторов, которые благоприятствовали одомашниванию злаковых растений. Во-первых, в то время как большинство видов растений в мире аллогамны (перекрестноопыляемые), большинство доместигированных зерновых культур преимущественно самоопыляемые (Zohary, 1999). Важно отметить, что самоопыляемость является также

характерной чертой их диких предков. Сброс пыльцы у пшеницы, ячменя и большей части других злаковых происходит преждевременно внутрь цветков, то есть, прежде, чем они откроются. Это стало преимуществом – позволило автоматически поддерживать репродуктивную изоляцию между одомашниваемой формой и ее диким предком, даже если они произрастали рядом. Сохранить же идентичность получаемых видов при перекрестной системе опыления на ранних этапах доместикации растений было невозможно или довольно затруднено (Harlan, 1995). Поэтому первыми доместичированными растениями (пшеницы двузернянка и однозернянка, ячмень, горох, чечевица, турецкий горох, лен) были самоопылители. Перекрестно опыляемые культуры появились в сельском хозяйстве позже и составили только небольшую часть среди традиционных зерновых культур.

Следует отметить, что у самоопылителей с небольшой частотой все же может иметь место случайное перекрестное опыление. Это обеспечивает расширение генетической изменчивости и способствует комбинированию генов из различных источников. Многочисленные циклы инбридинга, за которыми следовали редкие события перекрестного опыления, приводили к появлению новых рекомбинантных форм, из которых искусственным отбором выделялись наиболее подходящие для культивирования (Астахов, 2005; Родина, 2006).

Во-вторых, при одомашнивании злаков шел отбор против ломкоколосости. Одновременно, благодаря прочности колоса стал возможным отбор на увеличение колосков в колосе (Zohary 1999; Doebley 2006). В диких популяциях растений естественный отбор, наоборот, благоприятствует ломкоколосости, так как этот признак способствует распространению семян (Гончаров, 2015).

Третий существенный фактор доместикации – отбор на укороченный период покоя семян. Выживаемость большинства диких злаков, особенно однолетних, произрастающих в Средиземноморском (сухое лето, влажная зима)

или в полупустынных климатических зонах, зависит от регуляции длительности периода покоя. В условиях Средиземноморья период покоя у диких злаков длится от времени их созревания в начале лета до начала дождливого сезона следующей осенью. При этом семена с одного растения могут неравномерно прорасти в течение двух и более лет. Отсутствие синхронности в прорастании семян с одного растения является защитным механизмом, позволяющим диким популяциям выживать в условиях засухи. При культивировании эти свойства становились нежелательными. Шел отбор на короткий период покоя и дружное прорастание семян (Zohary and Hopf, 1973).

На первых этапах доместикации растений человек не создавал новых форм, а отбирал варианты, предоставленные ему природой, так как на ранних стадиях доместикации не был способен целенаправленно создавать исходный материал для селекции культивируемых растений (Гончаров, 2015). Только в последние столетия, отбор стал использоваться сознательно: человек, ещё не зная законов генетики, выбирал экземпляры с ярко выраженными полезными свойствами. Начался поиск рациональных и эффективных методов для создания новых форм и сортов. Самым первым селекционерам важно было оставить наиболее приспособленные растения, дающие стабильный урожай. Наиболее ценились возможности своевременно его убрать, а также устойчивость к неблагоприятным климатическим условиям и болезням. Следующей задачей селекции стал устойчивый рост урожайности. Урожай зерновых культур в 1913 году составлял: озимая пшеница 80,6 пудов с десятины (12 ц/Га), овса – 62,3 пуда с десятины (9,3 ц/Га), ячменя – 63,9 пудов (9,5 ц/Га) и рожь – 55,4 пуда (8,2 ц/Га) (Обухов, 1927). В 1883 году впервые в России был создан институт агрономических смотрителей, на территории которой в настоящее время расположен Красноуфимский селекционный центр (Максимов, Лихачева, 2019). При участии агрономических смотрителей впервые организовывались исследовательские учреждения, где с

1892 г. ставились опыты по подбору сортов и изучению новых культур, выявлялись наиболее урожайные, одновременно шло их улучшение путем массового отбора. Массовый отбор сменился индивидуальным, стали применяться целенаправленные скрещивания. Так родилась комбинационная селекция, которая до сих пор является доминирующим методом при создании сортов ячменя и пшеницы, применяемым уже более ста лет. За последние 100 лет урожайность ярового ячменя, например, на территории Европейской части России возросла в 3 раза (Обухов, 1927; Росстат, Сельское хозяйство в России, 2021). Произошло укрупнение зерновки, повышение уровня озерненности колоса. Среди исходного селекционного материала были выделены источники и доноры устойчивости к полеганию, поскольку полегание посевов благоприятствует развитию болезней, снижает урожайность, понижает качественные показатели зерна. Также важным направлением селекции является выведение сортов с оптимальным вегетационным периодом: были выведены скороспелые сорта для произрастания в северных районах и районах с летними засухами. Для повышения урожайности шла селекция на получение сортов с устойчивостью к неблагоприятным почвенно-климатическим условиям и к биотическим факторам (Богданова, 2022).

1.2. Новые подходы в селекции ячменя с развитием молекулярной генетики

1.2.1. Методы анализа полиморфизма ДНК

С развитием генетики, и разработкой широкого спектра методов анализа полиморфизма ДНК, а в дальнейшем и методов внесения целенаправленных изменений в геномы организмов, произошел технологический прорыв в том числе и в селекции растений.

При помощи широкого спектра приемов по анализу полиморфизма ДНК удалось разработать различные типы ДНК-маркеров (синоним – молекулярный маркер). Молекулярный маркер соответствует гену или некодирующему участку генома, разные варианты (аллели) которого отличаются на уровне ДНК. На основе использования ДНК-маркеров появились подходы, дополняющие методы классической селекции. Например, маркер-ориентированная селекция (МОС), которая отличается от классической дополнительными методами отбора растений в потомстве и позволяет ускорять селекцию по признакам, находящимся под моно- или олигогенным контролем (Хлесткина, 2013).

В настоящее время существует огромное разнообразие методов анализа полиморфизма ДНК. По основному методу, на котором строится тот или иной подход к анализу полиморфизма ДНК, молекулярные маркеры можно разделить на маркеры, основанные на блот-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипах.

Первые карты сцепления ячменя, содержащие ДНК-маркеры (а именно маркеры, основанные на блот-гибридизации, RFLP, restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов), появились в 1990 году (Shin et al., 1990; Graner et al., 1991). С развитием метода ПЦР ключевые позиции в исследованиях ячменя с середины 1990-х годов заняли AFLP (amplified fragment length polymorphism – полиморфизм длины амплифицированного фрагмента) (Vos P. et al., 1995.) и SSR-маркеры (simple sequences repeats – простые повторяющиеся последовательности) (Becker and Heun, 1995). Например, первые разработки SSR маркеров на ячмене были применены в 1993 году (Maroof et al., 1994), где было обнаружено 4 SSR локуса на четырех хромосомах. В следующей работе (Liu, et al. 1996) были разработаны 35 SSR маркеров, нанесенных на существующую RFLP-карту ячменя, содержащую 160 RFLP-маркеров.

С удешевлением секвенирования, развитием методов высокопроизводительного секвенирования и разработкой ДНК-чипов самыми

популярными стали SNP-маркеры (single-nucleotide polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм). Первыми технологиями выявления SNP были: *in silico* поиск SNP посредством анализа баз данных EST с последующей проверкой на основе ПЦР (Batley et al., 2003) и обнаружение SNP путем повторного секвенирования транскриптов с использованием метода Сэнгера (Morozova and Marra, 2008). Однако эти способы обладали низкой частотой обнаружения полиморфизма, с их помощью было невозможно обнаружить SNP, расположенные в некодирующих районах и межгенных пространствах. Появление подходов технологий секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS) устранило проблемы, связанные с низкой пропускной способностью и высокой стоимостью обнаружения SNP (Mardis, 2008). Использование технологий NGS позволяет быстро и экономично выявлять SNP в генах и избегать повторяющихся участков генома, что было успешно применено для получения геномов растений включая кукурузу (Barbazuk et al., 2007), ячмень (Schulte et al., 2009), пшеницу (Lai et al., 2012) и др.

Использование SNP маркеров в селекционных программах растет быстрыми темпами, как и разработка технологий и платформ для обнаружения и скрининга SNP во многих культурах. В настоящее время для некоторых культур доступны SNP-чипы.

Высокопроизводительное генотипирование ячменя было впервые апробировано в 2006 году (Rostoks et al., 2006) на основе технологии Illumina GoldenGate (Fan et al., 2003). Первые коммерчески доступные чипы для генотипирования ячменя появились в 2009 году (Close et al., 2009). Было выбрано и протестировано 4596 SNP на ДНК 576 образцов, для двух пилотных чипов ОРА: РОРА1 и РОРА2 и на ДНК 480 образцов для третьего пилотного чипа РОРА3. В итоге отобрали 3072 SNP, которые были генетически информативны. Они составили две производных платформы ОРА – ВОРА1 и ВОРА2, которые

планировалось использовать для дальнейших исследований генофонда ячменя. Из 3072 SNP, выбранных для изучения, 2279 были получены из библиотек EST, а 793 - путем секвенирования ПЦР-ампликонов. В результате, в платформу для генотипирования, содержащую 3072 маркера, вошли два чипа (BOPA1 и BOPA2), каждый из которых содержал по 1536 маркера SNP и которые имели различные дизайны генотипирования (Close et al., 2009). Следующий чип Illumina Infinium iSelect 9K Custom Genotyping BeadChip (Comadran et al., 2012) включал в себя 2832 маркера, разработанных по предыдущей технологии, и 5010 дополнительных маркеров, основанных на обнаружении SNP в данных Illumina RNA-seq из 10 элитных сортов Великобритании (Bayer et al., 2017). По мере снижения затрат на секвенирование постоянно росло число обнаруживаемых SNP. Поэтому на следующем этапе платформа 9K Infinium iSelect была расширена до 50K. Illumina 50K чип включил около 6000 SNP из предыдущего чипа на 9K и новые SNP, выявленные для ячменя на основе захвата экзома (<https://ics.hutton.ac.uk/50k>; Bayer et al., 2017).

1.2.2. Маркер-ориентированная селекция ячменя

Доступность эффективных высокопроизводительных систем и наличие референсного генома способствуют разработке широкого спектра ДНК-маркеров с последующим использованием в селекционных программах, в частности в маркер-ориентированной селекции. Отбор проводится с помощью ДНК-маркеров на основе знаний о том, какие гены наследуются в отбираемых селекционных гибридах, тем самым сокращается число растений, которые будут анализироваться в последующем поколении. Возрастает точность оценки ввиду того, что на оценку по генотипу не влияют факторы окружающей среды в отличие оценки по фенотипу (Morris et al., 2003). Кроме того, при отборе по признакам, фенотипическая оценка которых возможна лишь после стадии, на которой проводятся скрещивания, использование диагностических ДНК-

маркеров позволяет не откладывать скрещивания отобранных генотипов до следующего поколения, что также сокращает время получения сорта.

Преимущества селекции растений с использованием ДНК-маркеров были в первую очередь по достоинству оценены и распространены в программах, нацеленных на повышение устойчивости к фитопатогенам и вредителям. На сегодняшний день картировано большое количество генов, контролирующих устойчивость ячменя к различным болезням (Miedaner and Korzun, 2018). Сцепленные с ними маркеры являются эффективным инструментом для выведения устойчивых сортов с применением маркер-ориентированной селекции. В Австралии еще в 2003 году в селекционный процесс были вовлечены уже около 30 диагностических маркёров для отбора растений по 18 хозяйственно-ценным признакам (Langridge and Barr 2003; Karakousis et al., 2003), а в Германии все сорта ячменя, выведенные после 1999 г., получены с использованием ДНК-маркёров (Колчанов и др., 2016). В России в селекционных программах ячменя только начинают привлекаться подходы, основанные на применении ДНК-маркеров (Afanasenko et al., 2022), хотя есть примеры выведений сортов с использованием белковых маркеров, например, сорт Радонеж (Наумкин, 2009).

Возможность применения маркер-ориентированной селекции зависит от наличия сведений о генах, контролирующих селекционно значимые признаки и свойства. Как минимум, требуется информация о локализации данных генов и расположенных вблизи них ДНК-маркеров. Накопление таких сведений по основным сельскохозяйственным культурам активно ведется с 1990-х годов благодаря развитию работ по молекулярно-генетическому картированию (Kumar et al., 2007, Druka et al., 2010). Одновременно развивались работы по выделению и клонированию кандидатных генов, отвечающих за хозяйственно ценные признаки, изучению их структурно-функциональной организации и аллельного разнообразия (Richardson et al., 2007; Faure et al., 2007). Это позволило

разработать внутригенные маркеры по многим признакам. Работы в обоих направлениях были существенно масштабированы в постгеномный период.

1.3. Новые подходы к селекции ячменя в постгеномный период

1.3.1. Методы исследования генома растений

В настоящее время информация о геномных последовательностях является основой для решения важных задач в области геномики и генетики сельскохозяйственных растений. Новые подходы позволяют получить более полное представление о разнообразии генов у растений и их функциях. Значимым этапом развития молекулярных методов в селекции каждой сельскохозяйственной культуры становилось секвенирование ее генома. Чтобы получить полный геном организма был разработан метод дробовика (whole genome shotgun, WGS), при котором с помощью сайт-неспецифичных эндонуклеаз рестрикции проводится случайная фрагментация геномной ДНК с последующим созданием библиотек для секвенирования. Среди растений первый геном был отсеквенирован в 2000 году для *Arabidopsis thaliana* (Kaul et al., 2000). Геном *Arabidopsis* был получен с помощью предварительного клонирования фрагментов генома при помощи ВАС (bacterial artificial chromosome) с последующим секвенированием ВАС-клонов методом Сэнгера и дальнейшей сборкой.

Большинство геномов растений характеризуется повышенным содержанием повторяющейся ДНК и наличием дупликаций из-за событий полиплоидизации. Изначально геномные проекты реализовались только для растений с небольшими геномами (меньше $5 \cdot 10^9$ пн, например, риса (Goff et al., 2002; Yu et al., 2002)), так как сборка больших геномов оставалась трудоемкой и дорогостоящей. Многие области при секвенировании по Сэнгеру оставались несеквенированными, что

было связано с низким покрытием и техническими проблемами, обусловленными вторичной структурой ДНК.

Развитие NGS-технологий улучшило соотношение между получаемыми данными и стоимостью секвенирования генома. Это дало возможность реализовать проекты по секвенированию больших и сложных геномов растений (Брагина и др, 2019).

Непрерывное увеличение производительности секвенирования и снижение затрат на расходные материалы позволили исследователям после получения полногеномных референсных последовательностей проводить ресеквенирование разных генотипов изучаемого вида и обнаруживать полиморфные локусы, которые далее могут быть использованы в качестве генетических маркеров для картирования и маркирования генов, контролирующих хозяйственно ценные признаки (Cuesta-Marcos et al., 2010; Casas et al., 2018).

На основе NGS-секвенирования были разработаны несколько методов, которые делают возможным прочтение выборочного фрагмента генома изучаемых образцов: целевое (таргетное) секвенирование, метод экзомного секвенирования и метод целевого обогащения.

Целевое секвенирование позволяет сосредоточиться на конкретных областях генома или отдельных генах. Этот метод применяется тогда, когда требуется более пристальное внимание к определенным участкам генома, например, к ген-богатым районам. Основным преимуществом целевого секвенирования являются его высокая мощность обнаружения (способность идентифицировать новые варианты) и более высокое разрешение (Gustafson et al., 2006; Meyer et al., 2007)

Экзомное секвенирование – это метод секвенирования только белок-кодирующих участков генов, составляющих, как правило, 1–2 % генома. Позволяет секвенировать неэкспрессирующиеся аллели и гены, которые не могут быть найдены с помощью RNA-seq (Warr et al., 2013). Однако подходы экзомного

секвенирования основаны на существовании высококачественных референсных геномных последовательностей с точной аннотацией. Некачественная аннотация геномов может привести к потере данных (Choi et al., 2009).

Для растений, которые обладают большим размером генома, в том числе и у полиплоидных форм, существует подход «уменьшения сложности генома» при использовании стратегий обогащения. Целевое обогащение заключается в выделении специфических локусов генома в сочетании с NGS-технологиями и может проводиться с помощью ПЦР, метода молекулярной инверсии и гибридизационного обогащения (Брагина и др. 2019).

Секвенирование экзома оказалось важным инструментом для оценки естественной эволюции растений, изучения взаимодействия патогенов хозяина и улучшения ценных признаков сельскохозяйственных культур, выявления аллельных вариаций генов и их влияния на фенотип. Метод можно использовать для разработки стратегий борьбы с патогенами, что было реализовано для идентификации генов, участвующих в растительно-грибных взаимодействиях (O'Brien et al., 2011; Venu et al., 2011)

Появление, быстрое развитие и удешевление технологий секвенирования нового поколения не только позволили секвенировать один за другим геномы хозяйственно значимых видов растений и животных (Хлесткина, 2013; Брагина и др., 2019), но и сделали возможными быстрое определение полиморфизма тысяч генов и разработку SNP-чипов для анализа генетического и селекционного материала с большой пропускной способностью и экономической эффективностью.

Подход, использующий последовательности одновременно для обнаружения и оценки SNP, минуя весь этап разработки маркерного анализа, известен как GBS (генотипирование путем секвенирования, *genotyping-by-sequencing*) (рис. 1). На растениях впервые описан Elshire в 2011 году (Elshire et al., 2011), где был

успешно применен для генотипирования 276 рекомбинантных инбредных линий кукурузы и 43 дигаплоидных линий ячменя из картирующей популяции Oregon Wolfe Barley.

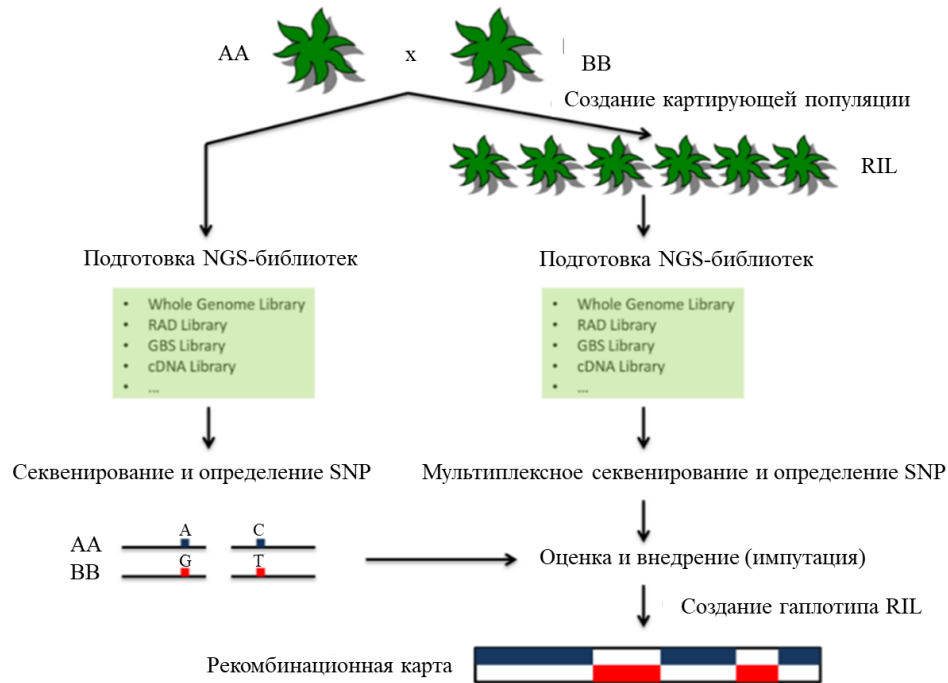


Рисунок 1. Схема стандартной процедуры GBS в применении к двуродительским картирующим популяциям. Предварительно, для создания картирующей популяции отбираются два родителя (AA и BB). С помощью технологий NGS определяются различные вариации полиморфизма в их геномах. Обнаруженные участки секвенируются в популяции рекомбинантных инбредных линий (RILs) при, соответственно, меньшем покрытии. Полученные последовательности используются для определения аллельного разнообразия для каждого образца. Полученные блоки гаплотипов можно применять непосредственно в качестве маркеров.

В настоящее время термин GBS используется уже как обобщающий для различных разрабатываемых методов высокопроизводительного генотипирования, основанного на NGS-секвенировании (Rasheed et al., 2017). Суть метода заключается в том, что геномная ДНК сначала обрабатывается

эндонуклеазами рестрикции, далее создается библиотека фрагментов, в результате секвенирования которых получают короткие прочтения (около 100 пар нуклеотидов), объединяемые в контиги, выравнивание которых позволяет обнаружить SNP (Davey et al., 2011). Метод может использоваться не только для анализа образцов видов с уже расшифрованным геномом, но и менее изученных видов, для которых еще не выполнена полногеномная сборка (Andrews et al., 2016; Chutimanitsakun et al., 2011). Методы генотипирования используются как для определения последовательности, так и для выявления ассоциаций между фенотипом и генотипом. Так как в настоящее время геном ячменя уже секвенирован, то выявление геномных районов, ассоциированных с признаком, может сразу использоваться для поиска генов-кандидатов. В исследовании ячменя GBS применяется с 2011 года (Daba et al., 2019; Darrier et al., 2019; Fan et al., 2017; Rajendran et al., 2022; Chang et al., 2022; Abed et al., 2019). Однако, значительная часть исследователей в области количественной генетики ячменя предпочитают в работах для генотипирования применять SNP-чипы (Alqudah et al. 2014; Alqudah et al., 2016; Alqudah et al., 2018; Belcher et al., 2015; Bellucci et al., 2017; Berger et al., 2013; Bykova et al., 2017; Chutimanitsakun et al. 2013; Cockram et al., 2010; Gawenda et al., 2015; Göransson et al., 2019; Haseneyer et al., 2010; Jia et al., 2019; Locatelli et al., 2013; Maurer et al., 2016; Muñoz-Amatriaín et al., 2014; Neumann et al., 2017; Novokazi et al., 2019; Pasam et al., 2012; Pauli et al., 2014; Rozanova et al., 2019; Schuy et al., 2019; Sharma et al., 2018; Tavakol et al., 2016; Templer et al., 2017; Thirulogachandar et al., 2017; Wabila et al., 2019; Xu et al., 2018; Genievskaia et al., 2018; Nyiraguirwa et al., 2022 Tsai et al., 2020).

1.3.2. Секвенирование генома ячменя

Чтобы получить информацию о геноме ячменя, в 2006 году был сформирован Международный консорциум по секвенированию генома *H. vulgare*, который изначально включал в себя исследователей из восьми

научных организаций шести различных стран (Германия, США, Австралия, Япония, Финляндия и Шотландия). Одной из главных задач консорциума было создание физической карты генома ячменя и определение последовательности генома высокого качества. В 2012 году к консорциуму присоединились исследователи из Великобритании, Израиля, Франции и Италии. В 2009 году появился первый вариант генома ячменя, сконструированный на основе сорта ячменя Morex (версия V1). Этот вариант оказался полезным для широкого круга исследователей, нацеленных на выделение отдельных генов, контролирующих хозяйственно-ценные признаки (Schulte et al., 2009). Но вместе с тем сохранилась необходимость для дальнейшего секвенирования генома и в 2012 году была получена обновленная референсная карта генома ячменя, версия Morex V2 (Consortium, 2012), построенная на основе коротких прочтений с использованием метода TRITEX (Monat et al., 2019). Для уточнения карты был использован метод MTP (minimum tiling path), то есть полногеномная последовательность составлялась по принципу минимального количества ее составных частей при максимальной плотности покрытия (Ariyadasa et al., 2014). Также была создана ультра-плотная генетическая карта, для получения которой проводилось полногеномное секвенирование и генотипирование на основе высокопроизводительного секвенирования потомства из 90 рекомбинантных инбредных линий (RIL) от скрещивания Morex*Barke (M x B) и полногеномное секвенирование 82 дигиплоидных линий (DH) из картирующей популяции Oregon Wolfe Barley (Cistué et al., 2011). Далее физическая карта, полученная в результате работы Консорциума, была соотнесена с генетическими картами высокой плотности и высокого разрешения (Mascher et al., 2013, 2017). Суммарная длина прочитанного и собранного генома ячменя составила $4,98 \cdot 10^9$ пн, это более 95% генома, учитывая, что согласно имеющимся данным размер генома ячменя $5,1 \cdot 10^9$ пн.

До конца 2021 года версия Morex V2 оставалась эталонной последовательностью для ячменя. Mascher с соавторами сравнил эффективность подходов с короткими и длинными прочтениями и оценил, что применение длинных прочтений улучшило и обогатило эталонную последовательность ячменя Morex V2, основанную на коротких прочтениях (Mascher et al., 2021). Длинные контиги версии V3, которые не содержат пробелов в прочтении, дают почти полное представление о межгенном пространстве, позволяя проводить углубленные исследования. Псевдомолекулы в конечной сборке версии Morex V3 состоят от 9 (хромосома 1Н) до 26 (хромосома 4Н) скафолдов, расположенных и ориентированных с помощью метода Hi-C. Авторы упоминают, что в работе не было обнаружено контигов, охватывающих какую-либо из центромер ячменя, что указывает на то, что размер или повторяющийся состав центромер ячменя требует дальнейшего увеличения длины прочтений, чтобы получить в итоге полностью собранную хромосому (Miga et al., 2020).

В настоящее время технологический уровень позволяет более подробно изучать геномы и объединять полученную информацию. Одна эталонная сборка не отражает внутривидовой изменчивости. Составление полного набора разнообразия последовательностей для разных видов сельскохозяйственных культур получило название «пангеном». На данный момент существует пангеном ячменя первого поколения, где были исследованы 20 генотипов ячменя, и который делает ранее скрытые генетические вариации доступными для генетических исследований и селекции (Jayakodi, et al., 2020).

1.3.3. Статистические методы поиска ассоциаций между маркером и признаком

Первым методом поиска ассоциаций маркера с признаком, получившим широкое распространение, стал QTL-анализ или метод анализа локусов количественных признаков при использовании двуродительских популяций.

Анализ основан на исследовании популяции потомства от контрастных по изучаемому признаку родителей (Jensen, 1989, Kearsey and Farquhar, 1998). QTL-анализ осуществляется с 1983 года (Rick and Tanksley, 1983) и для его проведения применялись различные типы маркеров, начиная с RFLP. До 2010 гг. преобладали исследования, в которых QTL-анализ двуродительских популяций проводился на основе данных генотипирования, полученных при помощи SSR-маркеров. С 2010 года растет применение SNP-маркеров для QTL-анализа. Последнее десятилетие начали использоваться методы прямого секвенирования (GBS) (Andrews et al., 2016; Darrier et al., 2019). Картирование значимых локусов с использованием QTL-анализа дает высокую статистическую значимость для определяемого QTL, но в то же время имеет низкое разрешение. Существенным недостатком метода является ограниченное генетическое разнообразие (Huyne and Kearsey, 1995).

В последние годы для массового поиска ассоциаций между фенотипом и генотипом используется полногеномный анализ ассоциаций или GWAS (genome-wide association study). Этот метод является мощным инструментом для определения хромосомных районов, связанных с агрономическими признаками, и его можно использовать для одновременного обнаружения многих аллельных вариаций в одном исследовании (Myles et al., 2009; Hamblin et al., 2011; Lipka et al., 2015).

Сравнительный анализ работ показывает, что на основе GWAS выявляется больше новых локусов, по сравнению с QTL-анализом двуродительских популяций (Pauli et al., 2014). Преимуществом метода является высокое разрешение.

Основная идея полногеномного анализа ассоциаций заключается в использовании феномена неравновесия по сцеплению. Неравновесие по сцеплению между двумя аллелями разных локусов обусловлено тем, что частота их совместной встречаемости отличается от ожидаемой при случайном

распределении. Аллели локусов, расположенные достаточно близко на хромосоме, являются сцепленными. Одной из основных причин существования неравновесия по сцеплению является совместная передача в ряду поколений (тесное сцепление). Например, если в момент возникновения мутации, влияющей на признак, рядом находился определенный маркерный аллель, то в течение многих поколений этот аллель будет передаваться вместе с мутацией. Чем ближе друг к другу расположены локусы, тем дольше они будут сохраняться в последующих десятках поколений. Поэтому наличие ассоциации между генотипированным маркером и исследуемым признаком позволяет предположить, что в близлежащих к маркеру геномных районах локализован функциональный аллель, влияющий на значение признака (Аксенович, 2008).

Анализ ассоциации для количественных признаков проводят с помощью метода линейной регрессии. Данным методом можно получить информацию о генетической изменчивости и генетических связях между исследуемыми сортами. Значения случайных эффектов будут стремиться к среднему арифметическому. То есть дисперсии значений будут возрастать в зависимости от количества информации, включенной в анализ (Веллер, 2018).

В уравнении регрессии исследуемый фенотип является зависимой переменной, а генотип – независимой переменной (предиктором).

Таким образом, уравнение регрессии можно выписать в виде:

$$Y = \mu + \beta g * g$$

где Y – фенотип, μ - отступ регрессии, g – генотип SNP, закодированный как 0, 1 или 2 в зависимости от дозы эффекторного аллеля, βg – коэффициент регрессии (в данном случае – размер эффекта эффекторного аллеля на признак). В случае, если исследуемый SNP не имеет эффект на фенотип, коэффициент регрессии βg будет незначимо отличен от нуля.

Как правило, тестирование отличия коэффициента регрессии проводят с помощью Вальд-теста, тестовая статистика которого имеет вид:

$$T^2 = (bg/se(bg))^2$$

где $se(bg)$ – стандартная ошибка коэффициента регрессии. При нулевой гипотезе $H_0: \beta = 0$ и статистика T^2 распределена как χ^2 с одной степенью свободы. В случае, если нулевая гипотеза отвергается, делается вывод о том, что исследуемый генетический маркер имеет эффект на исследуемый признак, либо маркер находится в неравновесии по сцеплению с вариантом, имеющим эффект на исследуемый признак. При проведении GWAS регрессионный анализ проводится для каждого SNP по отдельности. Общая схема проведения полногеномного анализа ассоциаций представлена на рис. 2.

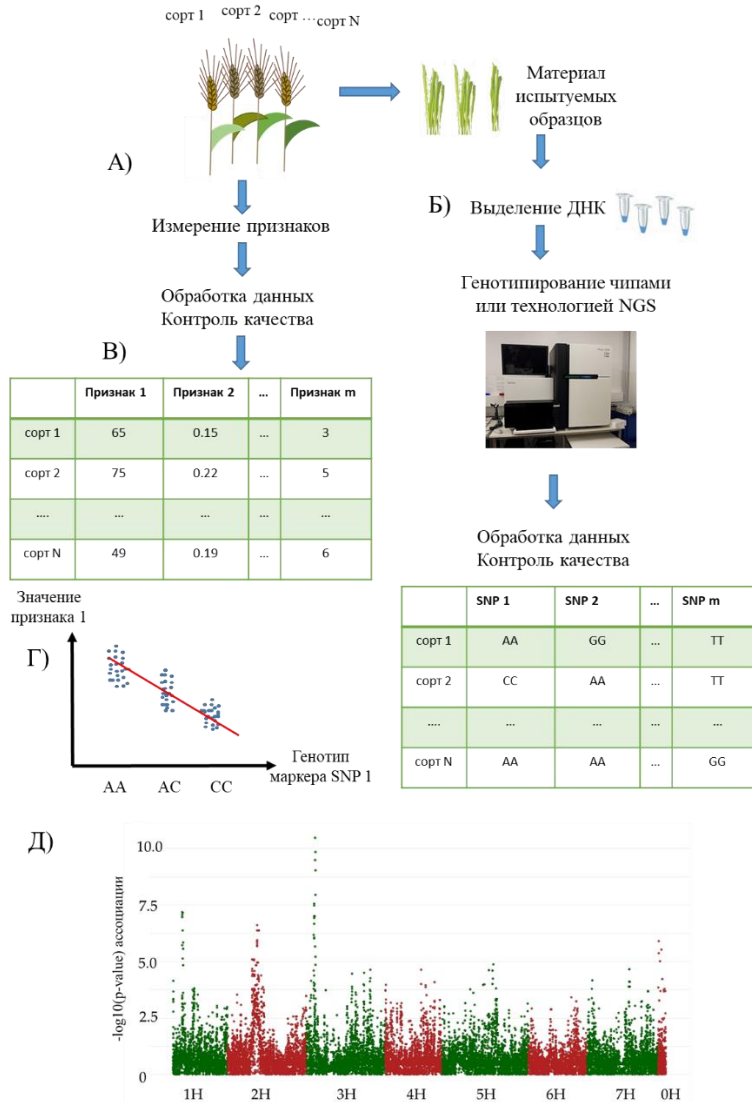


Рисунок 2. Общая схема проведения полногеномного анализа ассоциаций на примере количественного признака. А) создание исследуемой выборки и сбор материала для выделения геномной ДНК; Б) выделение ДНК и генотипирование образцов методом ДНК-чипов или таргетного секвенирования с дальнейшим проведением контроля качества геномных данных; В) фенотипирование исследуемого признака и проведение контроля качества фенотипических признаков; Г) обработка данных для каждого маркера (анализ проводится методом линейной регрессии, в ходе которого значения исследуемого признака регрессируются против всех генотипов исследования); Д) проведение анализа ассоциаций всех генетических маркеров.

Ассоциированный с признаком аллель определяется частотой его наличия в популяции. Однако, в этом случае есть вероятность упустить редкий аллель, так

как значимость определения локуса будет зависеть от той же частоты аллеля. К недостаткам метода можно отнести то, что он чувствителен к наличию большого количества родственных образцов, которыми часто обладают выборки сельскохозяйственных культур. Для определения локусов методом GWAS изучаемая популяция должна быть как можно более разнородна. На структуру выборки влияют как генетическая структура, так и миграция, дрейф генов, и способ формирования выборки. Очень важно учитывать структуру выборки и проводить коррекцию полученных результатов. Неправильно сформированная популяция приводит к выявлению ложноположительных ассоциаций. Увеличение числа исследуемых образцов в методе GWAS повышает статистическую значимость результатов. Также на достоверность будет влиять разнообразие выборки по географическому принципу и подбору сортов разных оригинаторов.

По сравнению с исследованиями на человеке и животных GWAS на растениях имеет преимущество благодаря возможности использования генотипов, не меняющихся от репродукции к репродукции (сорта самоопыляющихся растений, инбредные линии или вегетативно размножаемые растения). После того, как образцы один раз генотипированы, можно фенотипировать несколько повторностей выборки в течение нескольких лет. Это дает возможность изучать многие различные признаки в различных средовых условиях при воспроизведении фенотипических измерений и снижает случайные эффекты от воздействия окружающей среды.

GWAS – достаточно новый метод, и, как видно по данным анализа публикаций, индексируемых в Scopus (рис 3.), в течение последних лет количество работ, выполненных с помощью GWAS на растениях, неуклонно возрастает.

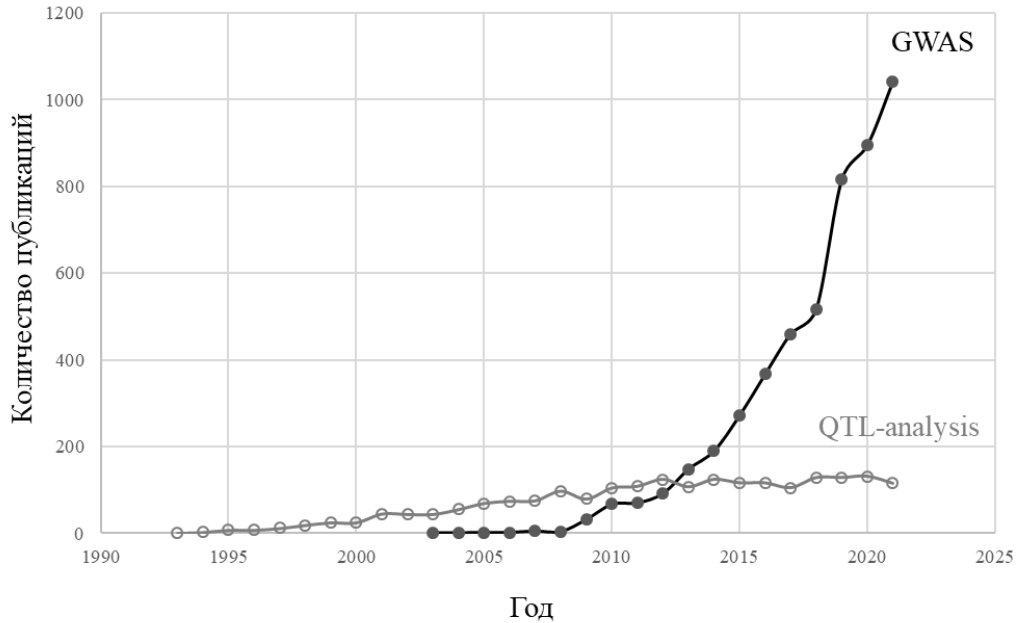


Рисунок 3. Количество публикаций, описывающих проведение QTL анализа и GWAS на растениях, выявленное на основе поиска статей по сочетаниям слов: «plant+genome-wide-association» «plant+QTL-analysis» в базе данных Scopus. Доступ 25.02.2022.

Метод GWAS предоставляет больше возможностей по выявлению SNP, которые потом можно преобразовать в KASP (kompetitive allele specific PCR) или CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) маркеры (Konieczny and Ausubel, 1993; Semagn et al., 2014), проверить их на независимых выборках и, в случае успешной валидации, рекомендовать использовать эти маркеры для отбора селекционного материала. KASP-маркеры – это маркеры, в основе использования которых лежит детекция флуоресцентно-меченных продуктов полимеразной цепной реакции. При аллель-специфической элонгации олигонуклеотида и передаче энергии флуоресцентного резонанса с генерацией сигнала, выявляется, какой аллельный вариант присутствует в конкретном SNP-локусе. CAPS маркерами называют нуклеотидные последовательности, фланкирующие выявленные SNP-маркеры, чье использование основано на амплификации фрагмента ДНК при помощи ПЦР со специфическими праймерами и дальнейшим

гидролизе эндонуклеазами рестрикции, продукты которого разделяются электрофорезом в агарозном геле. Гидролиз эндонуклеазой рестрикции не происходит при возникновении однонуклеотидной замены в сайте узнавания данным ферментом.

Маркирование отдельных SNP эффективно в случае локусов, существенно влияющих на изменение фенотипа. Информация, полученная в результате GWAS о локусах с малым эффектом или локусах, эффект которых существенно зависит от генотипа, не будет играть роли для программ по маркер-ориентированной селекции, однако она является важной для развития работ по геномной селекции.

GWAS успешно использовался для выявления районов хромосом, отвечающих за агрономические признаки ячменя (табл. 1).

Таблица 1. Примеры применения GWAS для поиска ассоциаций районов генома ячменя с хозяйственно-ценными признаками.

Признаки	Примеры работ
Высота растения, длина колоса, количество зерен в колосе, масса 1000 зерен, количество продуктивных побегов	Alqudah et al., 2014; 2016; 2018; 2021, Bai et al., 2021, Tsai et al., 2020, Genievskaya et al., 2018; Tavakol et al., 2016; Gawenda et al., 2015; Pauli et al., 2014; Berger et al., 2013b; Pasam et al., 2012; Haseneyer et al., 2010; Cockram et al., 2010; Sharma et al., 2018; Hu et al., 2018; Neumann et al., 2017; Thirulogachandar et al., 2017; Bellucci et al., 2017; Maurer et al., 2016; Houston et al., 2013; Rode et al., 2012; Varshney et al., 2012; Locatelli et al., 2013
Изменения по составу и размеру зерна (площадь зерна, длина и ширина зерна), количество зерен на колос	Sharma et al., 2018; Xu et al., 2018; Cuesta-Marcos et al., 2010; Muñoz-Amatriaín et al., 2014; Pasam et al., 2012
Устойчивость к болезням и вредителям	Gyawali et al., 2021, Adhikari et al., 2020, Czembor et al., 2021, Gyawali et al., 2018; Amezrou et al., 2018; Thabet et al., 2018, 2021; Bedawy et al., 2018; Bykova et al., 2017; Bengtsson et al., 2017; Richards et al., 2017; Bellucci et al., 2017; Turuspekov et al., 2016; Gutiérrez et al., 2015; Berger et al., 2013a; Wang et al., 2017; Burlakoti et al., 2017; Tamang et al., 2015; Massman et al., 2011; Rozanova et al., 2019; Daba et al. 2019; Aghnoum et al., 2019; Novokazi et al., 2019.
Устойчивость к факторам абиотического стресса	Thabet et al., 2018; 2021; Tavakol et al., 2016b; Wehner et al., 2016; Rapacz et al., 2019; Varshney et al., 2012b; Gawenda et al., 2015; Merchuk-Ovnat et al., 2018; Leplat et al., 2016; Hazzouri et al., 2018; Abou-Elwafa, 2016; Wehner et al., 2016; Pham et al., 2019; Jabbari et al., 2018; Templer et al., 2017; Y. Fan et al., 2017; Neumann et al., 2015; Visioni et al., 2013; Göransson et al., 2019; Schuy et al., 2019
Свойства крахмала	Li et al., 2021, Fan et al., 2017; Shu, Rasmussen, 2014
Содержание β-глюкана	Belcher et al., 2015; Houston et al., 2013
Содержание микроэлементов	Gyawali et al., 2018; Mamo et al., 2014; Nyiraguhirwa et al., 2022
Влияние повышенного содержания CO ₂ в атмосфере	Ingvordsen et al., 2015
Содержание белка в зерне	Cai et al., 2013; Wabila et al., 2019
Корневая система ячменя, влияние на качество зерна	Jia et al., 2019

Как можно судить по литературным данным (Розанова, Хлесткина, 2020), работы по GWAS в равной мере направлены на проблемы устойчивости к фитопатогенам и вредителям (биотический стресс), толерантности к неблагоприятным абиотическим факторам окружающей среды и на повышение продуктивности растений.

Эти работы указывают на потенциальное значение метода GWAS для выявления новых геномных районов, ассоциированных с фенотипическими признаками, которые имеют сельскохозяйственную значимость. Также этот метод может использоваться для уточнения данных по ранее обнаруженным QTL – например, сужать размер изучаемого локуса и способствовать обнаружению генов, контролирующих признак.

Другой метод поиска ассоциаций между фенотипом и генотипом – это двухблочный 2B-PLS анализ (two-dimensional partial least squares, метод частичных наименьших квадратов). PLS анализ первоначально разработан для эконометрики и хемометрики (Wold, 1983), представляет собой многомерный статистический метод, позволяющий проводить анализ ассоциаций между двумя наборами данных (например, между данными по генотипу и фенотипу) и предсказывать один набор данных на основе другого. С помощью данного метода можно выделить из исходных данных компоненты, между которыми существует ковариационная связь, и построить на их основе модель регрессии (Krishnan et al., 2011). В результате появляется возможность решения двух базовых задач: выявление скрытых связей между исходными данными и аппроксимация одних исходных данных по другим.

Впервые для решения биологических задач PLS анализ был использован в 1996 году для выявления общих черт между активностью мозга и поведением (McIntosh et al. 1996).

Например, в работе (Mehri et al., 2020) с его помощью был выявлен 131 белок с различным составом, что способствовало определению устойчивости или восприимчивости генотипов пшеницы к засухе при нормальных и стрессовых условиях. В работе (Jerbi et al., 2020) при помощи этого метода было показано, что изменение скорости способности ячменя к образованию микоризы в основном объясняется химическими свойствами почвы и климатическими характеристиками. В работе (Cozzolino et al., 2014) PLS анализ использовался для обработки данных о свойствах крахмала ячменя, чтобы получить дискретные значения, связанные с характеристиками. Также данный анализ позволил интерпретировать данные, полученные вискозиметрией (RVA), и классифицировать образцы ячменя в соответствии с урожайностью и местом выращивания. При исследовании морфологии гранул крахмала картофеля (Khlestkin et al., 2020) PLS анализ был выбран в качестве метода для преобразования данных по фенотипу и далее, с применением GWAS, в работе были выявлены локусы в геноме, ассоциированные со всеми изучаемыми фенотипическими признаками. Подобным образом мы использовали метод PLS в нашем исследовании – в совокупности с GWAS.

1.4. Механизмы устойчивости

Одним из важных агрономических признаков является устойчивость растений к болезням. Существует много определений понятия «болезнь растений». Профессор Whetzel (Horst, 2013) предложил следующее: «болезнь растений – это вредоносный физиологический процесс, вызванный атипической клеточной активностью вследствие длительного воздействия негативного фактора». Негативным фактором может быть как патогенный организм, так и неблагоприятные условия окружающей среды.

Сегодня актуально выведение сортов, устойчивых к биотическому стрессу. Потери от воздействия опасных организмов могут достигать 70% (Novakazi, 2019). Многие патогены независимо друг от друга могут наносить ущерб посевам, снижая урожайность. Наличие нескольких опасных патогенов почти всегда обладает угрозой потери 30-60% будущего урожая. К тому же, значительно ухудшается качество урожая (Афанасенко, 2016).

1.4.1. Общие механизмы устойчивости растений

Длительное время для развития селекции растений имела большое значение теория Ван дер Планка о вертикальной и горизонтальной устойчивости (Van der plank J.E., 1972). Если устойчивость обуславливалась одним геном (моногенная) или несколькими с сильно выраженным эффектом действия (major genes), то ее относили к вертикальной, или расоспецифичной. Если же (по Ван дер Планку) устойчивость обуславливалась большим числом генов (полигенная), каждый из которых обладает в отдельности малым эффектом (minor genes), но в целом они оказывают кумулятивное действие, то ее относили к горизонтальной, или неспецифической. В конечном счете, такое разделение стало считаться некорректным, поскольку выяснилось, что в так называемой «вертикальной» и «горизонтальной» устойчивостях задействованы одни и те же группы генов. На сегодняшний день у зерновых культур можно выделить три типа устойчивости: 1) базовая устойчивость, обеспечиваемая рецепторными белками, локализованными в плазматической мембране; 2) расоспецифическая устойчивость, обеспечиваемая внутриклеточными рецепторами иммунного ответа; 3) неспецифическая устойчивость, контролируемая локусами количественных признаков (Сколотнева, Салина, 2019). Если взаимодействие между патогеном и хозяином находится в некотором равновесии, то поражение болезнью можно считать довольно мягким, и растение способно развиваться, доходя до конечной стадии созревания, что создает благоприятную платформу

для распространения исследуемых патогенов. Поражение патогеном растений полностью не способствует его географическому распространению. Также второй вариант выхода из равновесия – когда растение полностью блокирует проникновение патогена. При распознавании патогена может запуститься также реакция сверхчувствительности (HR от англ. hypersensitive response). Это механизм, который используется растениями, чтобы предотвратить распространение инфекции, вызванной патогенами. В локальной области, вокруг места возникновения инфекции происходит быстрая гибель клеток, что служит для ограничения роста и распространения возбудителей на другие части растения (Медведев, 2004).

Растения, в отличие от животных, не имеют макрофагов и соматическую адаптивную иммунную систему. Ранее считалось, как указал в своих трудах еще Н.И. Вавилов (1935), что они выстраивают свою систему защиты от биотических факторов с помощью врожденного иммунитета. В настоящее время известно, что иммунная система растений в целом состоит из двух частей, а именно, патоген-ассоциированного иммунитета, запускаемого молекулярными паттернами (PTI, PAMP-triggered immunity) и иммунитета, запускаемого эффектором (ETI, effector-triggered immunity).

Иммунитет, запускаемый патоген-ассоциированными молекулярными паттернами (PTI)

Патогены почти всегда находятся вне клеточного пространства, а полезные вещества получают из клеток-хозяев. И клеточная мембрана, и цитоплазма являются важной зоной для молекулярных взаимодействий.

Патоген-ассоциированный иммунитет, запускаемый молекулярными паттернами (ранее называвшийся горизонтальным иммунитетом) основывается на стимуляции рецепторов распознавания образов (pattern recognition receptors, PRR), расположенных на поверхности клеточной стенки. Рецепторы реагируют

на такие молекулярные структуры, как продукты патогенных механизмов (белки, углеводы, липиды и небольшие молекулы, такие как АТФ), разрушенная клеточная стенка растений или фрагменты кутикулы, которые возникают в результате проникновения патогенных организмов. Такие молекулярные структуры называют PAMP (pathogen-associated molecular patterns, молекулярный паттерн, ассоциируемый с патогеном) (рис 4).

Семейство PRR включает рецептороподобные киназы (receptor-like kinases, RLK) и рецептороподобные белки (receptor-like proteins, RLP). RLK находится в плазматической мембране и состоит из трех доменов: внеклеточного лиганд-связывающего, трансмембранного и внутриклеточного домена серин/треонинкиназы. RLP состоит из внеклеточного и трансмембранного доменов, а вот внутриклеточный домен активации отсутствует и в случае с RLP необходимо взаимодействие с адапторными молекулами для передачи сигнала. Чтобы активировать сигнальный каскад большинству известных PRR требуются функциональные киназы BRASSINOSTEROID 1-ASSOCIATED KINASE 1 (BAK1) (Muthamilarasan, Prasad, 2013).

Активация сигнального каскада с помощью BAK1 приводит к усиленному синтезу метаболитов, которые уменьшают повреждения и повышают устойчивость к вредителям.

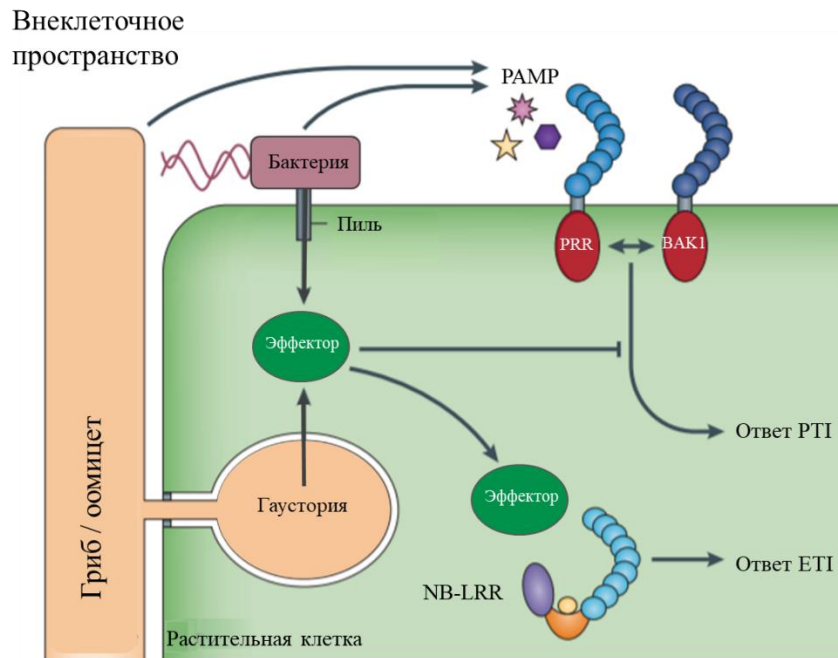


Рисунок 4. Принцип иммунитета растений (Dodds, Rathjen, 2010). Описание см. в тексте.

Иммунитет, запускаемый эффекторами (ETI).

Патогены обладают большим спектром факторов вирулентности, называемыми эффекторами и способны контролировать и преодолевать защитные барьеры вплоть до полного подавления ответной реакции (Schulze-Lefert and Panstruga, 2011). ВАК1 является центральным регулятором иммунитета РТI растений и, следовательно, мишенью эффекторных молекул вирулентности патогена (Shan et al., 2008).

При попадании эффекторов внутрь клетки включается вторая система защиты, эволюционно более поздняя. Иммунитет, запускаемый эффекторами (ETI), ранее называвшийся иммунитетом на основе R-генов или вертикальным иммунитетом, индуцируется при распознавании внутриклеточными иммунными рецепторами сигнальных молекул эффекторных белков. Сигнал в ядро переносят рецепторные белки, из семейства консервативных нуклеотид-связывающих лейцин-богатых белков (nucleotide-binding (NB)-leucine-rich repeat (LRR)) (NLR –

nucleotide-binding leucinerich repeat receptor, или R-белки) (рис. 4) (Dodds and Rathjen, 2010).

Большинство генов, идентифицированных среди супрессоров ETI, являются либо генами, специфичными для системы распознавания, либо элементами комплекса шаперона, необходимого для функций многих белков NB-LRR (Shirasu and Schulze-Lefert, 2003).

Ответы PTI- и ETI-иммунитетов рассматриваются как взаимосвязанные явления. И там, и там вовлекаются: быстрый приток ионов Ca^{2+} , выброс активных форм кислорода, активация митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK, mitogen-activated protein kinases), уплотнение клеточных стенок в местах попыток инфицирования и, часто, локальная гибель клеток, называемая реакцией сверхчувствительности (HR). PTI, как правило, эффективен в случае, если патоген не имеет специфических приспособлений для проникновения внутрь клетки, тогда как ETI активен в отношении адаптированных, специализированных патогенов, направленных на конкретного хозяина. Исследования экспрессирующихся генов позволило при некоторых количественных отличиях установить тем не менее сходство систем PTI и ETI (Dodds and Rathjen, 2010).

Один из пробелов в понимании иммунитета растений состоит в сведениях о сигнальных путях, которые начинают действовать после стимуляции сигнальных рецепторов. Была выявлена только пара настоящих сигнальных белков. Но этапы передачи сигнала неизвестны (Day et al., 2006). Несмотря на трудности в определении компонентов иммунного ответа, недавно была предложена модель для передачи сигнала в случае ETI. В этой модели NB-LRR перемещаются в ядро при активации и взаимодействуют с факторами ядра, вызывая изменения в экспрессии генов (Deslandes et al., 2003; Burch-Smith et al., 2007; Shen et al., 2007; Wirthmueller et al., 2007; Bernoux et al., 2008).

В зависимости от конкретных комбинаций генов и взаимодействия растение-патоген, возможны различные механизмы для специфического типа устойчивости. Эффективность иммунитета растений может включать в себя отсутствие коадаптации (то есть отсутствие у патогена приспособлений, необходимых для заражения и роста внутри хозяина) или эффективный набор предварительно сформированных защитных механизмов.

Система растение-патоген регулируются специфическим взаимодействием соответствующих друг другу генов. Те гены растений, которые производят характерный продукт, обуславливающий устойчивость к патогену, были названы генами R (*resistant*). Гены вирулентности, к которым есть соответствующие R-гены устойчивости у растений были названы генами *avr* (*avirulence*, авирулентность) (Robinson, 1987). Именно сходство к R-генам растений выделяет гены *avr* из общей массы генов вирулентности патогена, обеспечивающих выживание и осуществление патогенных функций внутри организма хозяина. Гены *avr* кодируют белки-эффекторы, нарушающие определенные биологические процессы в клетках растений. В ответ на воздействие эффекторов патогенов у растений активируются R-гены, кодирующие белки, запускающие сильный антипатогенный ответ. На протяжении столетий человек пытался вывести культуры, которые более устойчивы к болезням, однако, спустя время, они теряли свою устойчивость. Это связано с высокой скоростью мутирования патогенов, в том числе генов, кодирующих эффекторы, в результате чего некоторые R-гены устойчивости становятся неэффективными.

Существует четыре класса R-генов. Все они структурно разнообразны. Некоторые представители этих семейств генов продемонстрировали функции в клеточных процессах и процессах развития, не связанных с защитой (Salmeron et al., 1996; Scofield et al., 1996; He et al., 2000). В настоящее время только для белков

NBS-LRR, кодируемых R-генами, устойчивость к болезням была показана как единственная функция.

Самым большим является класс генов, кодирующих белки, включающие нуклеотид-связывающие сайты и лейцин-богатые домены, отвечающие за рецепторные функции NBS-LRR. Ни один другой класс R-генов не определяет устойчивость к такому разнообразному набору патогенов, как бактерии, грибы, оомицеты, вирусы, нематоды и тли (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995; Mindrinos et al., 1994).

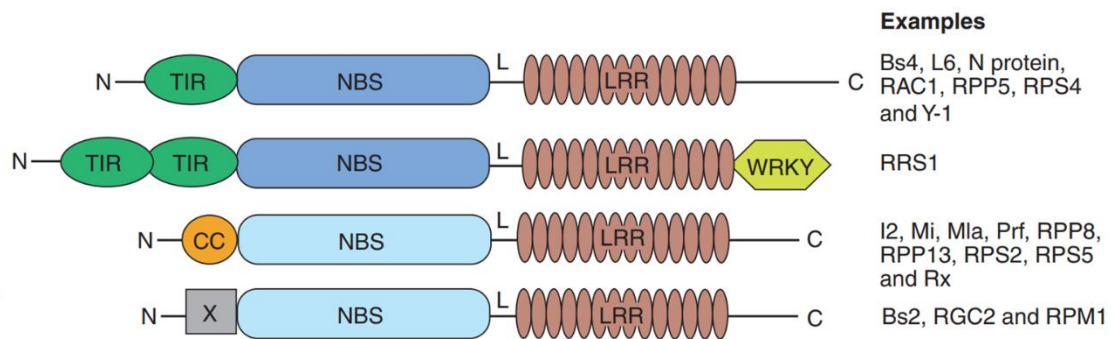


Рисунок 5. Основные домены белков NBS-LRR. Примеры белков с каждой конфигурацией показаны справа. Bs4, I2, Mi и Prf взяты из томата; L6 из льна; N из табака; RAC1, RPP5, RPS4, RRS1, RPP8, RPP13, RPS2, RPS5 и RPM1 от *Arabidopsis*; Y-1 и Rx из картофеля; Mla из ячменя; RGC2 из салата-латука; BS2 из перца. N, amino-конец; TIR, домен, подобный рецептору Toll/интерлейкина-1; CC, спиральный домен; X - домен без очевидного CC-мотива; NBS, сайт связывания нуклеотидов; L, линкер; LRR, богатый лейцином повторяющийся домен; WRKY, домен, связанный с фактором транскрипции «цинковый палец», содержащий последовательность WRKY; C, карбоксильный конец (Источник рисунка: McNale et al., 2006).

Белки класса NBS-LRR являются одними из самых крупных белков, известных в растениях, их размер колеблется в диапазоне от 860 до 1900 аминокислот. Эти белки состоят, по крайней мере, из четырех различных

доменов: переменный N-концевой домен, домен NBS, область LRR и переменные C-концевые домены (рис. 5).

Существует два основных подсемейства растительных белков класса NBS-LRR, определяемых присутствием в N-концевом домене мотивов рецептора Toll/интерлейкина-1 (Toll/interleukin-1 receptor, TIR) или спиральной катушки (coiled-coil, CC) (рис. 4). Хотя белки TIR-NBS-LRR (TNL) и белки CC-NBS-LRR (CNL) оба участвуют в распознавании патогенов, эти два подсемейства различаются как по последовательности, так и по сигнальным путям. При проведении филогенетического анализа они группируются отдельно, что показывает то, что они разошлись в ходе эволюции (Meyers et al., 1999; Pan et al., 2000). TNL полностью отсутствуют у злаков, что позволяет предположить, что у ранних предков покрытосеменных было мало TNL и что в линии злаков они были потеряны. CNL из однодольных и двудольных группируются вместе, что указывает на то, что CNL были распространены у предков покрытосеменных (Bai et al., 2002). Считается, что N-концы участвуют в белок-белковых взаимодействиях.

Больше всего известно о структуре и функциях домена NBS. Он содержит несколько мотивов, характерных семейству STAND (signal transduction ATPases with numerous domains, STAND – сигнальная трансдукция АТФаз с многочисленными доменами) (Leipe et al., 2004; Albrecht et al., 2005). Белки STAND функционируют как молекулярные переключатели в сигнальных путях болезни. Считается, что гидролиз АТФ приводит к конформационным изменениям, которые регулируют передачу сигналов.

Домен LRR является общим мотивом, наиболее переменным, обнаруженным в более чем 2000 белков, от вирусов до эукариот, и участвует в белок-белковых взаимодействиях, связывании лиганда (Jones et al., 1997), а также в регуляторных внутримолекулярных взаимодействиях (Moffett et al., 2002). В

TNL и CNL число повторов в доменах LRR у *Arabidopsis* одинаково (среднее 14, диапазон от 8 до 25, среди которых регулярно встречаются лейцин и другие гидрофобные аминокислоты), но это число может значительно отличаться у других видов. Изменение LRR последовательности показывает то, к какому гену авирулентности R-ген обеспечивает устойчивость.

CNL и TNL заметно различаются по размеру и составу их C-концевых доменов. CNL меньше по размеру и менее вариабельны, чем TNL, и обычно имеют только 40-80 C-концевых аминокислот, тогда как C-концевые домены TNL часто имеют дополнительные 200-300 аминокислот, что соответствует размеру домена LRR (Meyers et al., 2003, Jones et al., 2006).

В настоящее время существует несколько моделей, объясняющих взаимодействие между R и *avr* генами. Самая простая модель – это прямое взаимодействие продуктов R-генов с *avr*-зависимыми сигналами, что запускает цепь событий передачи сигналов и активирует защитный механизм, удерживающий рост патогенов и препятствующий распространению патогена после заражения и начала заболевания (Dangl and Jones, 2001).

Однако, прямые взаимодействия для R/*Avr* пар обнаруживаются лишь в редких случаях (van der Hoorn and Kamoun, 2008). Как альтернатива была предложена гипотеза «стражника», по которой предполагается, что продукты R-гена взаимодействуют с белком «стражником», который является мишенью для *Avr* белка.

Третья модель говорит о том, что продукты R-генов могут реагировать на компоненты патогенов или на продукты патогенных организмов, то есть определять молекулярный паттерн, ассоциированный с патогеном (PAMP) (Dodds and Rathjen, 2010).

Четвертый способ взаимодействия говорит о том, что R-гены кодируют ферменты, разрушающие токсины, вырабатываемые патогеном.

Несмотря на успехи в характеристике индивидуальных молекулярных взаимодействий между растением и патогеном, в настоящее время нет полного понимания молекулярной коэволюции хозяин-патоген. Для использования известных и обнаружения новых генов устойчивости в сельском хозяйстве крайне важно совершенствовать знания в данной области, чтобы прогнозировать изменения в параметрах отбора, как они будут влиять на эволюцию патогенных микроорганизмов и на микроуровне, и на уровне популяции.

Более того, существует много фундаментальных молекулярных вопросов, о которых мы до сих пор не знаем, например, каковы отличительные и общие сигнальные компоненты РТІ и ЕТІ и как функционируют R-белки, чтобы обеспечить распознавание авт. Еще предстоит выявить индуцированные компоненты и соединения растения, влияющие на иммунитет после распознавания патогенов. Новые технологии, такие как секвенирование генома, как хозяина, так и патогена, будут способствовать идентификации эффекторных белков, полногеномному анализу динамических паттернов экспрессии эффектора и идентификации с помощью протеомики и гомологии генов белков-мишеней хозяина.

1.4.2. Механизмы устойчивости ячменя

Наибольшую угрозу, особенно на начальной фазе развития, в осенне-зимний период, представляют грибные патогены. В последние годы площадь культур, попавших под влияние грибных инфекций, значительно увеличивалась, поскольку они широко распространены, имеют связь с почвой и обладают широкой специализацией, что и вызывает их постоянное присутствие.

Ячмень широко культивируется во многих частях света, поэтому является превосходным хозяином для патогенов. Эта культура обладает базовой или прегаусториальной устойчивостью к возбудителям, поражающим другие

зерновые, например, к бурой ржавчине пшеницы и ржи, вызываемой *Puccinia recondita*, или к стеблевой ржавчине зерновых, вызываемой *Puccinia graminis* и поражающей овес, пшеницу, рожь. В ответ на проникновение этих патогенов у растений ячменя наблюдается локальное упрочнение клеточных стенок за счет вторичного образования утолщений и выростов, что препятствует продвижению инфекционных гиф (нитевидные образования, основная функция которых поглощение воды и питательных веществ) по апопласту (Atienza et al., 2004; Niks and Marcel, 2009; Сколотнева и Салина, 2019).

Однако, специализированные патогены способны преодолевать барьер врожденного РТІ-иммунитета у ячменя. К таким относятся *Cochliobolus sativus* (вызывающий у ячменя темно-бурую пятнистость и корневые гнили) и *Pyrenophora teres* (вызывающий сетчатую пятнистость). Данные три болезни являются основными, поражающими ячмень в различных регионах Российской Федерации, в том числе в условиях Сибири. Потери урожая при поражении данными инфекциями могут достигать от 5,6% до 50% и выше при эпифитотических состояниях; в отдельных случаях потери урожая превышают 70% (Mykhalska et al., 2019).

Возбудители *P. teres* и *C. sativus* – это гембиотрофы – грибы-паразиты растений со смешанным типом питания. Сначала они ведут себя как биотрофы, т.е. растут в межклетном пространстве и образуют специализированные структуры, известные как гаустории (орган питания паразитического гриба), которые проникают в ткань хозяина, чтобы извлечь из него питательные вещества. Через гаустории с помощью эндосом эффекторы патогена попадают внутрь клетки растения, чтобы сделать ее более восприимчивой для себя (Szabo and Bushnell, 2001). После гибели зараженной ткани, грибы продолжают развиваться в ней, питаясь некротрофно (Hardham, 2007).

Основным хозяином для *P. teres* является ячмень. В экспериментах при инокуляции в полевых условиях было показано, что *P. teres* f. *teres* поражает широкий спектр злаков из родов *Agropyron*, *Brachypodium*, *Elymus*, *Cynodon*, *Deschampsia*, *Hordelymus* и *Stipa*. Однако протестированные виды проявляли слабые реакции, типа 1-2 по Шкале Текауза (Tekauz, 1985), которые можно объяснить тем, что данный патоген не является специфичным к исследуемым хозяевам (Liu et al., 2011). *C. sativus* – это широко специализированный патоген. Он патогенен для ячменя, мягкой и твердой пшеницы, тритикале, ржи, кукурузы, риса и некоторых видов трав (Gupta et al., 2018; Murray et al., 2009; Zhong et al., 2015). Механизм заражения растения обоими патогенами идентичен и происходит следующим образом: конидия прикрепляется к поверхности листа и прорастает, образуя специализированную гифу, вздутую на конце и напоминающую присоску (апрессорий), который поддерживает прямое проникновение инфекционных гиф через кутикулу растения (Kumar et al., 2001, Zhong et al., 2015).

Системы «яровой ячмень – патогены *C. sativus* и *P. teres*» являются интересными моделями для исследовательской работы, так как здесь включены перечисленные механизмы устойчивости, и исследуемые патогены используют ресурсы хозяина как основные для собственной жизнедеятельности (Zhong et al., 2015).

Накопление данных о разнообразных механизмах устойчивости ячменя к перечисленным заболеваниям создает возможность оптимально использовать генетические ресурсы при селекции на иммунитет. Задачей, стоящей перед современной селекцией, является разработка эффективных методов трансгенного переноса полигенных семейств генов устойчивости растений, которому должны предшествовать точный анализ выявленных генных групп устойчивости на молекулярном уровне. Это позволит не только сократить

влияние нежелательного генетического материала, приобретаемого в процессе обычной гибридизации, но и ввести в реципиентный сорт целевые гены из неродственных организмов, в том числе полигенные семейства мажорных и минорных генов (локусов) устойчивости.

В условиях современного интенсивного сельскохозяйственного производства фитопатогены достаточно быстро приспосабливаются к защитным механизмам растений-хозяев. В том числе, преодоление устойчивости происходит достаточно динамично в популяциях патогенных грибов, которые распространяются по воздуху и паразитируют на сельскохозяйственных культурах.

В связи с этим, учеными активно ведется поиск локусов, контролирующих устойчивость ячменя к возбудителям, как расоспецифичную, так и полигенную или неспецифичную устойчивость, и также пирамидирование генов устойчивости.

1.5. Локусы устойчивости ячменя к биотическому стрессу

Большой успех на данный момент наблюдается в идентификации генетических маркеров для признаков устойчивости к болезням, имеющих моногенный или олигогенный контроль (ржавчинные болезни, головня, мучнистая роса). Часто уровень фенотипического проявления устойчивости зависит не от одного гена, а от суммарного эффекта всех генов устойчивости. Поэтому сложнее идентифицировать генетические маркеры для устойчивости зерновых культур к фузариозу колоса, септориозам, гельминтоспориозным пятнистостям, корневым гнилям и другим болезням, устойчивость к которым является количественным признаком и определяется большим количеством генов (Афанасенко, 2016). Это ведет к постановке задачи перед исследователями

– вывести сорта с полигенной устойчивостью, которая обеспечивает средний уровень устойчивости, что проявляется в замедленном развитии болезней. Однако возникновение новых патотипов усложняет эту цель (Ghazvini and Tekauz, 2007; Leng et al., 2016).

1.5.1. Темно-бурая пятнистость

Темно-бурая пятнистость, вызываемая патогеном *Cochliobolus sativus*, является одной из наиболее опасных болезней ячменя, и считается основным биотическим стрессом, препятствующим коммерческому производству. Болезнь распространена во всех районах выращивания ячменя (Van Ginkel, 1997; Gupta, 2018), но преобладает в условиях жаркого и влажного климата. При эпифитотии, которая происходит раз в 5-10 лет, потери урожая достигают 40% (Лапина, Афанасенко, 2019). Темно-бурая пятнистость поражает около 10-30 % растений в условиях северо-запада России (Radyukevich et al., 2018), в Мордовии наносит наибольший вред по сравнению с другими заболеваниями. Распространение в фазе восковой спелости в среднем за 10 лет достигало 37% (Лапина и др., 2014).

Было обнаружено, что степень тяжести болезни зависит от времени увлажнения листьев. Канадскими учеными (Clark, 1979) в 1979 году были проведены исследования с целью определить, насколько длительная влажность листьев влияет на развитие болезни. Было выяснено, что пятнистость на листе развивается только после пролонгированного влажного периода от 16 часов и выше. Авторами было показано, что относительно сильная эпифитотия темно-бурой пятнистости в течение 1-2 недель перед созреванием может уменьшить выход зерна на 10-20%; эпидемия 3-4 недель может уменьшить выход на 30-40%, включая 10-15% от уменьшения веса зерна (Clark, 1979; Vonman et al., 2005).

В России, в Кировской области, в течение наблюдений с 2005 по 2016 год наименьшее развитие болезни наблюдалось в сухие годы (Шешегова и др., 2017).

Изучение паразитической специализации грибов началось с 1922 года (Christensen, 1922), и было установлено, что изоляты грибных патогенов значительно различаются по своей вирулентности (Shipton et al., 1966). Но исследования самой дифференциальной вирулентности были начаты лишь в 1985 году, когда Левитин с соавторами подтвердили достоверные отличия в ряде вирулентных клонов *Cochliobolus sativus* на различных сортах ячменя (Levitin et al., 1985). Определенное влияние оказали работы Valjavec-Gratian и Steffenson, которые выявили три патотипа (0, 1 и 2) (Valjavec-Gratian and Steffenson, 1997). Также три патотипа из Сирии идентифицировали Arabi и Jawhar (Arabi and Jawhar, 2002, 20004), а Meldrum с соавторами – шесть патотипов из Австралии (Meldrum et al., 2004). В Канаде Ghazvini и Tekauz (Ghazvini and Tekauz, 2007) оценили вирулентность 127 изолятов патогена и выделили восемь групп вирулентности. Далее, Leng et al. идентифицировали новый патотип, который был назван патотипом 7 (Leng et al., 2016). Подобные исследования показывают, что популяции патогена имеют высокий уровень изменчивости (Burdon, 1997; Ghazvini., 2012). Было высказано предположение, что хромосомные перестройки являются основным источником разнообразия в популяциях *C. sativus* (Zhong and Steffenson, 2001; Çelik Oğuz and Karakaya, 2021).

Первый коммерческий сорт ячменя (Dickson), резистентный к темно-бурой пятнистости, был выведен еще в 1964 году в США (Roy et al., 2010). Интересно отметить, что все последующие шестирядные пивоваренные (солодовые) сорта несли устойчивость к темно-бурой пятнистости в Среднезападной части США, тогда как устойчивость двурядных сортов была не особо эффективной. Обнаружение новых патотипов, обладающих вирулентностью к генам устойчивости шестирядных пивоваренных сортов ячменя, грозило широким распространением эпифитотии с учетом генетической однородности шестирядных солодовых культур, устойчивых к темно-бурой пятнистости.

Bonman с соавторами в 2005 году исследовал происхождение устойчивости к темно-бурой пятнистости у сортообразцов из Национальной коллекции NSGC (National Small Grains Collection, USA). Им было выяснено, что высокая устойчивость к темно-бурой пятнистости наиболее часто обнаруживается в сортах, имеющих происхождение из северной части США. Также среднеустойчивые взрослые растения имели происхождение из восточной Азии (Bonman et al., 2005).

Локусы устойчивости к патогену *C. sativus*, были выявлены на всех хромосомах ячменя (Steffenson et al., 1996; Bilgic et al., 2005, 2006; Bovill et al., 2010; Grewal et al., 2012; Afanasenko et al., 2015). Было картировано три гена, ассоциированных с устойчивостью к *C. sativus*. Ранние исследования на дигаплоидной популяции, полученной от скрещивания шестирядных сортов Steptoe и Morex, показали, что проростковая устойчивость контролируется единственным геном *Rcs5* на хромосоме 7H (Steffenson et al., 1996). На хромосоме 1H были выявлены гены *Rcs6* (Bilgic et al., 2006) и *Scs6* (Leng et al., 2018). Основываясь на своих данных, Leng с соавторами (2018) предположили, что *Rcs6* и *Scs6* расположены в одном и том же локусе, и что *Scs6* является доминантным аллелем. Устойчивость взрослых растений контролируется двумя локусами: первый имеет главный эффект на хромосоме 1H и второй, с минорным эффектом, на хромосоме 7H. Дальнейшие исследования на других дигаплоидных популяциях (Bilgic et al., 2005) обнаружили еще 3 QTL, ответственных за устойчивость к темно-бурой пятнистости: один на коротком плече хромосомы 3H, второй – на длинном плече хромосомы 3H и третий – рядом с *Rcs5* на хромосоме 7H. В работе, выполненной с помощью GWAS, Wang с соавторами идентифицировали локус на коротком плече хромосомы 6H, ассоциированный с устойчивостью к *C. sativus* (Wang et al., 2017). Позже он был обозначен как *Rbs7* (Wang et al., 2019).

Эти данные демонстрируют сложность проявления устойчивости к темно-бурой пятнистости у различных популяций. Исследования показали схожесть реакций, обуславливающих проростковую и взрослую устойчивость, то есть на один и тот же патоген была выявлена схожая реакция на разных стадиях развития растения (Arabi, Jawhar, 2007).

Разрабатывать ДНК-маркеры, ассоциированные с устойчивостью к *Cochliobolus sativus*, начали с 1996 года. Первые ДНК-маркеры принадлежали классу RAPD (Kutcher et al., 1996), однако они трудно применимы, так как обладают средним уровнем полиморфизма и нет возможности автоматизации процесса анализа. Данных по диагностическим SSR или SNP маркерам, ассоциированным с устойчивостью к темно-бурой пятнистости, до начала текущего исследования обнаружено не было.

1.5.2. Корневые гнили

Корневые гнили, вызываемые грибом *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib.) Drechl. ex Dast. (anamorph: *Bipolaris sorokiniana*) (sacc. In Sarok.) Shoem, широко распространенная болезнь ячменя и других злаковых с небольшим размером зерна (Arabi et al., 2013).

Несмотря на то обстоятельство, что темно-бурая пятнистость и корневые гнили вызываются одним патогеном *C. sativus*, не было обнаружено корреляции между устойчивостью к темно-бурой пятнистости и к корневым гнилям. Было показано, что устойчивость к этим двум заболеваниям контролируется разными генами (Kutcher et al., 1994; Almgren et al., 1999).

Корневые гнили обычно обнаруживаются на верхних междоузлиях и coleoptile, но также обнаруживаются на верхней части растения и на корнях, что влияет на снижение урожайности через уменьшение количества побегов, колосьев и семян (Arabi, Jawhar, 2002). Потери от корневых гнилей могут достигать 80% (Piening and Orr, 1988).

Увеличение вреда от корневой гнили отмечено в зоне Центрального Нечерноземья в сухую и жаркую погоду, что спровоцировано анаэробными условиями и почвенной коркой. Широкое распространение корневой гнили было зарегистрировано в условиях засухи в 2010 году. В этот период заболевание отмечалось на всех наблюдаемых участках с частотой от 57 до 76% на отдельных полях (Лапина и др, 2014). В Кировском регионе в течение наблюдений с 2005 по 2016 год сильное развитие корневых гнилей наблюдалось 9 раз (Шешегова и др., 2017). Так же корневая гниль является наиболее обычной болезнью в лесостепной зоне Западной Сибири (Горобей, 2011).

Известны ДНК-маркеры класса RAPD: UBC391, UBC428M, UBC428F и UBC335, определяющие устойчивость одновременно как к корневым гнилям, так и к темно-бурой пятнистости, однако фенотипические эффекты данных ассоциаций были небольшими (Kutcher et al., 1996).

1.5.3. Сетчатая пятнистость

Сетчатая пятнистость, вызываемая грибом *Pyrenophora teres f. teres*, также является одним из наиболее распространенных и вредоносных заболеваний ячменя. На северном Кавказе, в центральном районе Нечерноземья, на юге Урала, Дальнем Востоке России и в Беларуси эпидемии происходят раз в 4-5 лет (Afanasenko et al., 2015), наблюдается высокая степень поражения. Ежегодные потери урожая составляют от 10 до 20%, а в благоприятные для развития болезни годы достигают 40-45 %. (Afonin et al. 2008). Источником первичной инфекции оказываются зараженные семена и растительные остатки. При сильном поражении семян первые признаки могут проявляться на первом листе проростков. За счет вторичной инфекции болезнь быстро распространяется и достигает максимума к периоду молочной спелости зерна.

Помимо значительных потерь урожая, болезнь может вызвать снижение качества зерна (Burleigh, et al., 1988). В Австралии *P. teres f. teres* считается

основной болезнью ячменя и, как оценивается, вызывает в среднем ежегодные потери около 19 миллионов австралийских долларов (Murray, Brennan, 2009). Потери до 70% были зарегистрированы в 2009 на юге Австралии (Wallwork et al., 2016).

У патогена существует две формы, различающиеся симптомами, которые они вызывают: сетчатая форма сетчатой пятнистости (*P. teres f. teres*) и пятнистая форма сетчатой пятнистости (*P. teres f. maculata*). При этом сетчатая форма сетчатой пятнистости является доминирующей формой в различных регионах России; пятнистая форма сетчатой пятнистости была обнаружена только в южной части европейской части России (Tamang et al., 2015).

Геномные районы, связанные с устойчивостью к *P. teres f. teres*, были выявлены на всех хромосомах ячменя (Steffenson et al., 1996; Arru et al., 2003; Grewal et al., 2008, 2012; Afanasenko et al., 2015; Koladia et al., 2017; Wonneberger et al., 2017a; Amezrou et al., 2018). Наибольшее количество сосредоточилось на хромосомах 3Н и 6Н (Steffenson 1996; Novakazi et al., 2019a; Afanasenko et al., 2022). В прицентромерном районе хромосомы 6Н предполагаются либо три тесно сцепленных гена, либо локус, в котором встречаются не менее трех разных аллелей устойчивости (Koladia et al., 2017), чем обеспечивается устойчивость как у проростков, так и у взрослых растений в течение всего онтогенеза (Grewal et al., 2008). Другие QTL являются, по-видимому, специфичными для проростков или взрослых растений (Lehmensiek et al., 2008). Предполагается, что в ключевом геномном районе на хромосоме 3Н находятся два комплементарных гена устойчивости к *P. teres* (Dinglasan et al., 2019).

В работе Koladia высказано предположение, что основные локусы на хромосомах 3Н и 6Н вызывают первичный ответ при взаимодействии хозяина и патогена (Koladia et al., 2017). Несмотря на то, что наиболее значимые геномные районы, ассоциированные с устойчивостью к *P. teres*, известны, механизм их

взаимодействия с патогеном достаточно сложный и может включать дополнительные генетические факторы, особенно на стадии роста растений (Dinglasan et al., 2019).

Недавно, с 2017 года, появились исследования, выполненные с помощью метода GWAS с выявлением SNP, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres*. Применение GWAS значительно расширили наши знания о генетическом разнообразии доноров: выявлено более 60 основных генов и QTL в коллекциях ячменя, состоящих из нескольких тысяч сортов (всего 7139) (Afanasenko et al., 2022).

Первые маркеры, ассоциированные с устойчивостью к патогену *Pyrenophora teres* относились к классам RFLP и AFLP и были разработаны в 1998 году (Richter et al., 1998; Williams et al., 1999). По мере развития технологий шло совершенствование и в области ДНК-маркеров. Следующим шагом была разработка микросателлитных или SSR маркеров (Kuldeep et al., 2008; Yun et al., 2005). В последнее время интерес к выведению сортов, обладающих устойчивостью к данному патогену, возрастает. Dinglasan с соавторами предложили для использования в программах по маркер-ориентированной селекции пять маркеров DArT (Dinglasan et al., 2019), введение которых в селекционные программы пока на стадии разработок.

Несмотря на достижения в идентификации и картировании QTL устойчивости к гемибитрофным патогенам, реальное использование выявленных генов в практической селекции зерновых культур затруднено из-за отсутствия надежных диагностических ДНК-маркеров.

1.6. Заключение к обзору литературы

В процессе доместикации и «народной селекции» растений отбирались формы, наиболее полно обеспечивающие человека надежными источниками

питания, в том числе и устойчивые к болезням. В двадцатом столетии начался поиск рациональных и эффективных методов для создания новых форм сортов. С открытием методов анализа полиморфизма ДНК и развитием работ в области молекулярно-генетического картирования генов и геномов растений произошел технологический прорыв и в селекции растений – схемы классической селекции дополнились методами ускоренного маркер-контролируемого отбора. Следующим важным этапом стало секвенирование генома. Первые трудоемкие подходы, основанные на секвенировании по Сэнгеру, позволили получить в 2000 году первый полностью прочтенный геном модельного растения *Arabidopsis thaliana*. Геном ячменя был полностью секвенирован в 2012 году. С появлением и развитием новых NGS технологий число видов растений с секвенированным геномом постоянно растет. Одно из основных направлений применения секвенированных геномов культурных растений заключается в насыщении всех участков генома молекулярными маркерами с последующим их вовлечением в картирование и анализ генов-кандидатов. Подходы по целевому и экзомному секвенированию существенно расширили возможности идентификации локусов, ассоциированных с полигенными признаками, у которых фенотипическое проявление зависит от суммарного эффекта всех генов устойчивости. Полногеномный анализ ассоциаций (GWAS) содействует выявлению районов генома, ассоциированных с хозяйственно ценными признаками, в том числе с устойчивостью к болезням. Отдельные SNP, значимо ассоциированные с устойчивостью к той или иной болезни, могут подходить для создания на их основе ПЦР-маркеров, удобных для скрининга селекционного материала. Целесообразным является развитие исследований как с расширением анализируемых геномных локусов (за счет использования SNP-чипов высокой плотности), так и с расширением изучаемого генетического разнообразия.

Современные методы исследования генома дополнили и качественно расширили фундаментальные знания об иммунитете растений, в том числе взаимодействии растений, в частности ячменя, с патогенами. Работы, выполненные к настоящему моменту, с целью поиска локусов устойчивости ячменя к *Cochliobolus sativus* и *Pyrenophora teres* практически не охватывали яровые сорта, созданные в сибирских селекционных центрах. Создание подходящей выборки, ее генотипирование и фитопатологическая оценка позволят с помощью GWAS выявлять локусы устойчивости к нескольким болезням одновременно.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Растительный материал

В настоящем исследовании для поиска и подтверждения локусов, ассоциированных с устойчивостью, использовались четыре независимые выборки. Для генотипирования, фенотипирования и анализа ассоциаций «маркер-признак» была сформирована основная выборка из 94 яровых сортообразцов ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) из рабочей коллекции Института цитологии и генетики СО РАН – ЦКП/УНУ «GenAgro» (Новосибирск, Россия). Структуру выборки составили 43 сорта и линии, происходящих из селекционных центров Сибирского федерального округа, 31 сорт из других селекционных центров России и 20 сортов зарубежного происхождения, используемые в селекционных программах в Сибири (табл. 2). Выборка (далее сибирская коллекция ячменя/сибирский генофонд ячменя) формировалась с учетом разнообразия по происхождению и контрастности по признакам (морфологические признаки, группы спелости и т.д.).

Таблица 2. Сортообразцы из сибирской коллекции ячменя, изучаемые в работе.

Название сорта	Разновидность	Каталожный номер ИЦиГ/ВИР	Страна, субъект РФ, учреждение
Abyssinian	Nudum	ICG-8462/К-27672	Эфиопия
Brodyole	Coeleste	ICG-8071/К-24634	США
Jngve	Nutans	К-30023	Швеция
№ 259/528	Ricotense	ICG-8044/-	Россия, Новосибирск, 1
Wial	Horsfordianum	ICG-8392/-	США
Авалон	Nutans	ICG-8515/-	Франция
Агул	Ricotense	ICG-8161/К-24707	Россия, Красноярский край, 2
Алаг-Эрд-Эне	Nudum	ICG-8504/К-29415	Йеменская Республика
Алей	Nutans	ICG-8516/-	Россия, Алтайский край, 3
Алтан-Булаг	Nutans	ICG-8218/К-29268	Республика Бурятия, 4
Алын-Буя	Nutans	ICG-8434/-	Казахстан
Анна	Nutans	ICG-8413/К-30829	Россия, Оренбургская область, 5
Арна	Nutans	ICG-8517/-	Казахстан, 6
Арчекас	Nudum	ICG-8464/-	Россия, Кемерово
АС 0760258	Nutans	ICG-8518/-	
Ача	Nutans	ICG-8028/К-30243	Россия, Новосибирская область, 7
Баган	Nutans	ICG-8425/К-29040	Россия, Новосибирская область, 7
Бархатный	Ricotense	ICG-8316/К-30891	Россия, Тюменская область, 8

Продолжение таблицы 2.

Название сорта	Разновидность	Каталожный номер ИЦиГ/ВИР	Страна, субъект РФ, учреждение
Безенчукский 2	Pallidum	ICG-8267/К-30799	Россия, Самарская область, 9
Белогорский	Pallidum	ICG-8177/К-22089	Россия, Ленинградская область, 10
Биом	Nutans	К-30984	Россия, Новосибирская область, 7
1В-1	Pallidum	ICG-8436/-	Россия, Новосибирская область, 1
Виконт	Nutans	ICG-8520/К-30301	Россия, Краснодарский край, 11
Винер	Nutans	ICG-8136/К-8514	Россия, Кировская обл, Вятская губерния
Ворсинский 2	Nutans	ICG-8521/-	Россия, Алтайский край, 12
Выбор	Ricotense	ICG-8130/К-29409	Россия, 13
Г-19951	Nutans	ICG-8522/-	Россия, Новосибирская область, 7
Г-19980	Nutans	ICG-8523/-	Россия, Новосибирская область, 7
Г-21038	Nutans	ICG-8524/-	Россия, Новосибирская область, 7
Г-21219 (Дар)	Nutans	ICG-8525/-	Россия, Новосибирская область, 7
Г-21671	Nutans	ICG-8526/-	Россия, Новосибирская область, 7
Голозер. 1	Nudum	ICG-8268/К-21694	Россия, Свердловская область, 14
Гранал	Nutans	ICG-8152/К-23342	Казахстан, 15
Добрый	Pallidum	ICG-8283/К-29215	Россия, Кировская область, 16
Донецкий 8	Medicum	ICG-8053/К-23682	Украина, Северо-Донецкая СХОС, 17
Емеля	Ricotense	ICG-8527/-	Россия, Красноярский край, 2
Заларинец	Nutans	ICG-8209/К-16955	Россия, Иркутская область, 18
Зерноградский 86	Nutans	ICG-8065/К-25936	Россия, Ростовская область, 19
Золотник	Medicum	ICG-8439/К-30845	Россия, 7, 12
Ильмень	Nutans	ICG-8027/К-26968	Россия, Свердловская область, 14
Импульс	Nutans	ICG-8260/К-29435	Россия, Свердловская область, 14
Кедр	Pallidum	ICG-8271/К-28119	Россия, Красноярский край, 2
Колчан	Ricotense	ICG-8435/К-31039	Россия, Алтайский край, 20
Красноярский 1	Nutans	ICG-8259/К-19829	Россия, Красноярский край, 2
Красноярский 91	Pallidum	ICG-8528/-	Россия, Красноярский край, 2
Крымчак 55	Pallidum	ICG-8127/К-25286	Украина, Волынская с./х. опытная станция
Курьер	Nutans	ICG-8246/К-26740	Россия, Краснодарский край, 11
Л-421	Nutans	ICG-8243/К-27058	Россия, Новосибирск, 1
Линия 1	Nudum	ICG-8456	Россия, Новосибирская область, 1
Линия 1285	Nudum	ICG-8451	Россия, Новосибирская область, 1
Маныч 459	Nutans	ICG-8266/К-29345	Россия, Ростовская область, 19
Маяк	Nutans	ICG-8159/К-29622	Россия, Красноярск
Медикум	Medicum	ICG-8322/К-29002	Казахстан
Мелиус	Nutans	ICG-8529/-	Швейцария
Мерит 57	Nutans	ICG-8530/-	США
Местный (Прим. кр)	Nutans	ICG-8211/К-15117	Россия, Приморский край
Местный (Якутия)	Pallidum	ICG-8203/К-7979	Россия, Якутия
Местный Дагестан	Nigrum nudum	ICG-8459/К-15010	Россия, Дагестан
Местный Эфиопия	Nigrum nudum	ICG-8461/К-20042	Эфиопия
Московский 121	Nutans	ICG-8236/К-19417	Россия, 13
Мутант 68	Nutans	ICG-8055/К-28163	Россия, Ленинград
Мутант Винер(а)	Nudum	ICG-8293/-	Россия, Новосибирская область, 9
Нарымчанин	Ricotense	ICG-8287/К-27039	Россия, Томская область, 21
Никита	Nutans	ICG-8075/К-30900	Россия, Кемеровская область, 22
Новосибирский 80	Nutans	ICG-8437/К-26848	Россия, Новосибирская область, 7
Норд 112412	Nutans	ICG-8531/-	Россия, Новосибирская область, 7
Носовский 11	Nutans	ICG-8255/К-29465	Украина, Чернигов
Нутанс 970	Nutans	ICG-8040/К-21794	Казахстан

Продолжение таблицы 2.

Название сорта	Разновидность	Каталожный номер ИЦиГ/ВИР	Страна, субъект РФ, учреждение
Обской	Nutans	ICG-8031/К-24709	Россия, Новосибирская область, 7
Омский 13709	Nutans	ICG-8242/К-17843	Россия, Омская область, 12
Омский 85	Pallidum	ICG-8042/К-27927	Россия, Омская область, 12
Омский голозер. 1	Nudum	ICG-8457/К-30919	Россия, Омская область, 12
Омский голозер. 2	Coeleste	ICG-8458/-	Россия, Омская область, 12
Оренбургск. Кормовой	Nutans	ICG-8248/К-29496	Россия, Оренбургская область, 5
Оскар	Nutans	ICG-8463/К-31040	Россия, Красноярский край, 2
Отбор Туал	Coeleste	ICG-8226/-	Россия, Новосибирская область, 1
Паллидум 394	Pallidum	ICG-8174/К-20916	Бурятия, 4
Прикумский 14	Nutans	ICG-8286/К-25075	Россия, Ставрополь
Рейд	Nutans	ICG-8014/К-28885	Россия, Свердловская область, 14
Саша	Medicum	ICG-8532/К-31110	Россия, Омская область, 12
Светик	Parallelum	ICG-8038/К-29009	Россия, Архангельская обл.
Северный	Pallidum	ICG-8066/К-25298	Россия, Ленинградская область, 23
Сигнал	Nutans	ICG-8032/К-30846	Россия, 7, 11
Символ	Nutans	ICG-8077/К-27502	Россия, Ростовская область, 19
Славянский	Nutans	ICG-8139/К-29611	Россия, Воронежская область, Воронеж
Соболек	Ricotense	ICG-8375/К-30245	Россия, Красноярский край, 2
Сымбат	Nutans	ICG-8533/-	Казахстан, 6
Таганай	Nutans	ICG-8029/К-29001	Россия, Челябинская область
Талан	Nutans	ICG-8534/-	Россия, Новосибирская область, 7
Танай	Nutans	ICG-8535/-	Россия, Новосибирская область, 7
Тарский 1	Nutans	ICG-8214/К-30150	Россия, Омская область, 12
Татум	Nutans	ICG-8536/-	Германия
Темп	Nutans	ICG-8279/К-22055	Россия, Краснодарский край, 11
Челябинск. 70	Nutans	ICG-8158/К-29470	Россия, Челябинская область, Челябинск

ВИР - Всероссийский институт генетических ресурсов растений им Н.И. Вавилова

1 - ИЦиГ СО РАН (Институт цитологии и генетики СО РАН), 2 – КрасНИИСХ (Красноярский научно-исследовательский институт КНЦ СО РАН), 3 – ФГБНУ ФАНЦА (Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий), 4 – Бурятский НИИСХ (Бурятский научно-исследовательский институт сельского хозяйства), 5 – ФГБНУ Оренбургский НИИ сельского хозяйства, 6 – КазНИИЗиР (Казахский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства), 7 – СибНИИРС (Сибирский НИИ растениеводства и селекции), филиал ИЦиГ СО РАН, 8 – НИИСХ Северного Зауралья - СФНЦА РАН, 9 – Самарский НИИСХ, филиал СамНЦ РАН, 10 – Ленинградский НИИСХ «Белогорка», филиал ФГБНУ «ФИЦ картофеля имени А.Г. Лорха», 11 – КНИИСХ (Краснодарский научно-исследовательский институт имени П.П. Лукьяненко), 12 – ГНУ СибНИИСХоз СО РАСХН (Сибирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии), 13 – НИИСХ ЦРНЗ (Научно-исследовательский институт сельского хозяйства центральных районов Нечерноземной зоны, в настоящее время: "Немчиновка", московский научно-исследовательский институт сельского хозяйства),

14 – Красноуфимская селекционная станция Российской академии сельскохозяйственных наук, 15 – Карабалыкская сельскохозяйственная опытная станция, 16 – Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, 17 – Северо-Донецкая сельскохозяйственная опытная станция, 18 – Иркутский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, 19 – ФГБНУ «ВНИИЗК им И.Г. Калининко» (Всероссийский научно-исследовательский институт зерновых культур имени И.Г.Калининко), 20 – АНИИЗиС (Алтайский научно-исследовательский институт земледелия и растениеводства), 21 – Нарымская государственная селекционная станция, 22 – КемНИИСХ СО РАСХН (Кемеровский научно-исследовательский институт сельского хозяйства), 23 – СЗНИИСХ (Институт аграрной экономики и развития сельских территорий. Структурное подразделение ФГБУН СПб ФИЦ РАН).

Валидация выбранных SNP-маркеров для разработки на их основе диагностических ДНК-маркеров проводилась на независимых выборках, контрастных по устойчивости к одной из болезней. Первая выборка состояла из 22 сортов ярового ячменя контрастных по устойчивости к патогену *Cochliobolus sativus* (изолят Ch3). Она включала в себя 11 устойчивых сортов из Японии, Англии, Канады, Китая, США и 11 восприимчивых сортов из Австралии, Канады, Франции, Китая, Чехии, России, Мексики и Дании (см. Доп. табл. 1).

Вторая выборка включала в себя 102 сорта, несущие в себе гены устойчивости в хромосомах 3Н и 6Н к патогену *Pyrenofora teres f teres*: 51 устойчивый и 51 восприимчивый. Всего было 40 двурядных и 62 шестирядных сортов из 34 стран (Австралия, Боливия, Канада, Китай, США, Чехия, Эквадор, Великобритания, Эфиопия, Германия, Польша, Финляндия, Индия, Италия, Япония, Казахстан, Корея, Кыргызтан, Марокко, Мексика, Молдова, Монголия, Пакистан, Перу, Польша, Россия, Швеция, Таджикистан, Турция, Туркменистан, Украина, США, Узбекистан) (см. Доп. табл. 2).

Третья выборка состояла из 11 дигаплоидных линий от скрещивания сорта CI 5791, несущего устойчивость к *P. teres* по хромосоме 6Н и восприимчивого

сорта Harrington. Все три выборки были предоставлены Афанасенко О.С. (ВИЗР, Санкт-Петербург).

2.2. Изоляты патогенов

Для оценки устойчивости были выбраны изоляты *Cochliobolus sativus*, и *Pyrenophora teres* f. *teres* различного происхождения обладающие хорошей способностью к спорообразованию (табл. 3). Оценка устойчивости на ювенильной стадии в условиях искусственного заражения была проведена к.б.н. Лашиной Н.М. под руководством акад. РАН, д.б.н. Афанасенко О.С. (ВИЗР, Санкт-Петербург) согласно методикам Fetch T.G., Steffenson V.J. (1999) и Tekauz A. (1985) с модификациями. В качестве контроля во всех случаях использовали восприимчивый сорт Харрингтон.

Таблица 3. Происхождение изолятов *C. sativus* и *P. teres* f. *teres*, использованные в работе.

Название патогена	Болезнь, вызываемая патогеном	Название изолята	Происхождение
<i>Cochliobolus sativus</i>	Темно-бурая пятнистость	Ch3	Ленинградская область
		Kr2	Краснодарский Край
		O18.2	Ленинградская область
<i>Cochliobolus sativus</i>	Корневые гнили	O18.2	Ленинградская область
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	Сетчатая пятнистость	S10.2	Финляндия
		K5.1	Ленинградская область
		P3.4.0	Ленинградская область
		A2.6.0	Астрахань

2.3. Оценка устойчивости в ювенильной фазе

2.3.1. Оценка устойчивости к болезням: темно-бурая пятнистость и сетчатая пятнистость

Сохранение и размножение изолятов обоих патогенов проводили на модифицированной среде Чапека, содержащей 0,5 г/л K_2HPO_4 , 0,5 г/л MgSO_4 , 0,5 г/л KCl , 1,2 г/л мочевины, 20 г/л лактозы и 20 г/л агара. Для получения инокулюма изоляты культивировали в течение 14 суток при температуре 18-20 °С и фотопериоде 12ч/12ч под ультрафиолетом. В чашку Петри добавляли дистиллированную воду и собирали конидии с поверхности агаризованной среды шпателем. Суспензию фильтровали через два слоя марли для удаления фрагментов мицелия. Концентрацию инокулюма доводили до 10 000 и до 5000 конидий на мл для *C. sativus* и *P. teres*, соответственно. Для улучшения контакта конидий с поверхностью листа к суспензии добавляли 100 мкл/л поверхностно-активного вещества Tween 20.

Инокуляцию проводили опрыскиванием растений на 12-14 день после посева при появлении второго листа. Иннокулированные растения покрывали пластиковыми пакетами и выдерживали при 20-22 °С в течение 24 часов в темноте при относительной влажности 100%, затем выращивали при 20-22 °С и фотопериоде 16ч день/8ч ночь при относительной влажности 70%.

Реакцию на инфекцию регистрировали на втором листе через 10-12 дней после инокуляции. Устойчивость к *C. sativus* оценивали по 9-бальной шкале (Fetch, Steffenson, 1999):

Баллы 1,0–3,9 – устойчивость (R): точечные некрозы без краевого хлороза или с очень незначительным хлорозом;

4,0–5,9 – умеренная устойчивость (MR): некрозы среднего размера с отчетливым, но ограниченным хлорозом;

6,0–9,0 – восприимчивость (S): крупные некрозы с отчетливыми распространяющимися хлорозами.

Устойчивость *P. teres* оценивалась по 10-балльной шкале Текауза (Teкауz, 1985):

1 балл – высокая устойчивость (R_h): точечные некрозы, без хлороза;

2–3 – устойчивость (R): некротические мелкие штрихи с небольшим хлорозом;

3.1–5.0 – неполная устойчивость (промежуточный тип реакции) (MR): небольшие некротические пятна диаметром до 0,5 см, окружённые чётко-выраженным хлорозом;

5.1–6.9 – неполная восприимчивость (MS): некротические пятна, диаметром около 1 см и больше, окруженные хлорозом;

7–10 – восприимчивость (S): сливающиеся некротические пятна, окружённые хлорозом; при типе реакции, оцененном по баллу 10, некроз покрывает всю поверхность листа.

2.3.2. Определение устойчивости к корневым гнилям

Лабораторные эксперименты по заражению возбудителем корневых гнилей проводили в помещении с регулируемым климатом при температуре 23 °C и световом периоде 16ч день/8ч. Семена исследуемых образцов проращивали в

темноте на смоченной фильтровальной бумаге в чашках Петри в течение 2-3 суток. Пророщенные зерна помещали на стерильный песок, смоченный дистиллированной водой, в пластиковые горшки объемом 200 мл (по 100 г песка в каждой) и инокулировали по 10 мл на горшок суспензии с концентрацией 50 000 конидий/мл (5000 спор на 1 г песка) изолятом *C. sativus* O18.2. Эксперимент проводили в трех повторностях по 15 растений каждого образца (всего 45 растений для каждого образца). В качестве контроля использовали такое же число растений каждого образца без инокуляции.

Через 14 дней после инокуляции, когда растения находились в фазе 2-3 листьев, измеряли повреждение образцов ячменя корневой гнилью. Растения осторожно извлекали из песка, корни тщательно промывали водой и визуально оценивали степень поражения корней и coleoptилей по 5-балльной шкале, основанной на площади и окраске участка поражения.

Баллы от 0 до 2,5 – устойчивость (R): небольшие светло-коричневые поражения размером до 1 см на корнях и одиночные штрихи на coleoptиле;

2,5 – 2,9 – умеренная устойчивость (MR): светло-коричневые поражения на корнях длиной до 1,5 см, штрихи на coleoptиле сильно выражены;

3,0 – 5,0 – восприимчивость (S): светло-коричневые/яркие коричневые/черные поражения на корнях длиной до 2-2,5 см и полное окрашивание coleoptиля в светло-коричневый или ярко-коричневый цвет (Санин, 2002).

2.4. Выделение ДНК растений

ДНК из растений выделяли двумя способами. Первый способ (ДНК для SNP-генотипирования) – с помощью набора для выделения ДНК Qiagen (DNeasy Plant mini Kit (250), Германия), согласно инструкции производителя.

Второй способ (ДНК для ПЦР-анализа) – согласно модифицированной методике Plaschke et al., (1995). От 50 до 100 мг свежей зеленой массы (листья двух недельных проростков) помещали в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 200 мкл буфера для экстракции [100 mM Tris-HCl, pH 7.5-8.0, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA, 1.25% SDS, 0.38% Na₂S₂O₅], измельчали с помощью гомогенизатора. Добавляли 500 мкл буфера для экстракции, инкубировали на водяной бане при 60°C в течение 30 минут. Добавляли 700 мкл смеси хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), перемешивали и центрифугировали в течение 15 минут при 12000 об/мин. Для осаждения ДНК к водной фазе добавляли 1,4 мл 96% этанола, охлажденного при -20°C, центрифугировали в течение 10 минут при 12000 об/мин. Осадок высушивали на воздухе и растворяли в 50 мкл буфера TE [10mM трис-HCl, pH 8.0; 1mM EDTA]. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра «SmartSpecTMPlus» (BioRad).

2.5. Генотипирование коллекции

Образцы сибирской коллекции были генотипированы с использованием SNP-чипа «Barley 50 K Illumina Infinium iSELECT» (Bayer et al., 2017) на базе компании Traitgenetics GmbH (Гатерслебен, Германия). Изначально для 44 040 маркеров чипа были сконструированы праймеры для последовательностей, непосредственно примыкающих к целевым SNP. Этапом, называемым амплификацией, геном ДНК каждого образца был тысячекратно увеличен. Далее ДНК фрагментировали с помощью эндонуклеаз рестрикции и наносили на кристаллы матрицы путем гибридизации с SNP-специфичными праймерами с

последующим удлинением на 1 нуклеотид. При нанесении в реактивной смеси присутствовали нуклеотиды, меченные флюоресцентными метками, представляющими аллель SNP. Нанесение на чип производилось автоматически согласно рекомендациям производителя с использованием оборудования от компании Illumina, сканирование чипов производилось по технологии Illumina iScan.

Дополнительная информация о локусах данного SNP-чипа была извлечена из ресурсов BARLEYMAP (<http://floresta.eead.csic.es/barleymap>) (Cantalapiedra et al., 2015), где маркеры были сопоставлены с их физическим положением на текущей версии с геномом MorexV3 (Mascher et al., 2021) и генетической позицией на карте POPseq_2017 (Mascher et al., 2013, 2017)

Для анализа были оставлены только те маркеры, в которых данные были получены для всех исследуемых сортообразцов, и минорная частота аллеля превышала 10 %.

Данные по генотипированию выявили два высоко гетерозиготных образца – сорт Мутант 68 и Маяк, доля гетерозиготных локусов для которых составила 16.4% и 7,6%, соответственно. Эти образцы были исключены из анализа ассоциаций «генотип-фенотип».

2.6. Популяционная структура

Анализ популяционной структуры коллекции рассчитывался с помощью программного пакета STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Популяционная структура анализировалась, основываясь на данных генотипирования набора из 13 659 маркеров. Для анализа популяционной структуры, и чтобы сократить расчетное время программы, был выбран каждый второй маркер из 27 319 прошедших контроль качества. Количество субпопуляций (k) было выведено с использованием смешанной модели с коррелирующими частотами аллелей и

длиной периода burn-in из 5000 и 5000 повторов марковской цепи Монте-Карло (MCMC). При выборе k следует учитывать два показателя: 1) наименьшее на плато значение k фиксирует истинное значение субпопуляций; 2) если нет никакой реальной структуры, то значение α будет сильно меняться.

2.7. Полногеномный анализ ассоциаций

Полногеномный анализ ассоциаций был выполнен при использовании программного пакета TASSEL 5 (Bradbury et al., 2007) по следующей формуле:

$$Y = Xa + Qb + e,$$

где Y – это вектор для фенотипических значений, X – это матрица генотипических значений маркеров, a – это вектор фиксированных эффектов маркера, Q – это популяционная структура и может быть либо Q -матрицей, либо главными компонентами из анализа главных компонент, b – это вектор фиксированных эффектов популяционной структуры, e – это вектор случайных эффектов.

Графики Manhattan Plots были построены с помощью скрипта, созданного в программном пакете R (скрипт предоставлен в рамках Первой Международной Школы-конференция ВИР по количественной генетике, Санкт-Петербург, 2018).

Для выявления локусов, ассоциированных с признаком, было использовано несколько статистических моделей:

- 1) GLM – обобщенная линейная модель без учета популяционной структуры
- 2) GLM + Q – анализ с учетом популяционной структуры
- 3) GLM + PCA – анализ с учетом главных компонент
- 4) MLM + K – анализ с использованием смешанной модели с учетом матрицы родства.

Результат анализа с использованием всех статистических моделей сравнивали на графике QQ plot для выбора наиболее подходящей модели для каждого набора данных.

Для определения уровня значимости SNP были использованы две поправки: (i) коррекция по Бонферрони (Hommel, 1988), где порог значимости (0,05) был поделен на общее количество исследуемых маркеров (27319) в результате составил $1,8302 \cdot 10^{-6}$, и (ii) критерий Бенжамина-Хохберга (Benjamini, Hochberg, 1995) или false discovery rate (FDR), с пороговым значением 0,05. Чтобы определить, какие маркеры пересекли пороговое значение по критерию Бенжамина-Хохберга значения p-value, полученные в программе TASSEL 5, предварительно ранжировались по возрастанию. Далее значения умножались на общее количество тестов (в нашем случае – количество исследуемых маркеров – 27319) и делились на соответствующий маркеру ранг. Маркерами, прошедшими пороговое значение, считались те, значения p-value по критерию Бенжамина-Хохберга у которых составило менее 0,05. Цель критерия FDR состояла в том, чтобы задать порог ниже указанного значения по Бонферрони, что могло способствовать поиску маркеров достаточно значимых, но не прошедших жесткий порог по Бонферрони. Уровень «Предполагаемый» рассматривался для маркеров, имеющих достаточно низкое значение p-value до 10^{-5} , но не превысивших пороговое значение.

2.8. Двублоковый анализ (2B-PLS анализ)

Помимо того, что был проведен метод GWAS для данных по каждому изоляту в отдельности, и выявлены значимые маркеры, ассоциации также были найдены другим методом – двублоковым анализом (2B-PLS). PLS анализ был применен к совокупности фенотипических признаков по отношению к каждой болезни и генотипическим данным при помощи пакета PAST 2.17 (Hammer et al., 2006).

Сначала был проведен анализ главных компонент для всех данных оценки фенотипического заболевания отдельно для темно-бурой пятнистости, для сетчатой пятнистости и для корневых гнилей.

Главные компоненты для данных генотипирования были рассчитаны через матрицу расстояний (Gower et al., 1966). Это было сделано с использованием пакета JACOBI4 (Полунин и др., 2014). Для вычисления матрицы расстояния между сортами ячменя диплоидный геном ячменя был закодирован цифровом формате, где за 0 был принят эффекторный аллель, за 1 – не эффекторный аллель, и средняя форма была закодирована как 0,5. Для примера: AA аллель обозначается как 1, AG – как 0,5 и GG – как 0.

Далее оба набора главных компонент были взяты в качестве блоков для двублокового анализа (первый набор – фенотипический блок, второй – генотипический) и в результате были получены фенотипические и генотипические бикомпоненты, максимально соответствующие друг другу.

Чтобы вычислить отношение между фенотипическими и генотипическими бикомпонентами был проведен анализ ковариации.

Та фенотипическая бикомпонента, в которую фенотипические признаки внесли наибольший вклад, была взята как фенотипический признак при ассоциативном анализе и выявленные маркеры должны отражать определенный уровень количественной устойчивости ко всем исследуемым изолятам патогена.

2.9. Анализ кандидатных SNP для конструирования на их основе KASP маркеров и аллель-специфичного ПЦР-маркера

После того как кандидатные SNP были определены, нуклеотидные последовательности, фланкирующие SNP (по 50 пн с каждой стороны) были экспортированы из базы данных Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>) для разработки KASP-маркера. Для

проведения KASP-генотипирования последовательности, содержащие кандидатные SNP, были конвертированы в следующий формат:

ATTAACGCTGGAGTTCCGAAACAAGCAGAGAAATTGCTCAAAAAAAT
GGA[C/T]GAGCTTTCCATGAAACCCAGCAGGGAACTATACATGGATGTGA
TGCGGGC,

где аллельные варианты SNP представлены в квадратных скобках. Дальнейшее KASP генотипирование было проведено компанией LGC Genomic (Великобритания) (<http://www.lgcgroup.com>). Анализ результатов KASP проводился при использовании программ SNP-Viewer и Microsoft Excel.

Аллель-специфичный ПЦР-маркер к SNP-локусу JHI-Hv50k-2016-156999, предложенному автором диссертации к использованию в качестве диагностического, разрабатывался и апробировался в рамках магистерской работы (С.А. Горобец, НАГУ) под методическим руководством к.б.н. Шоевой О.Ю. (ИЦиГ СО РАН). Данный ПЦР-маркер основан на использовании пары олигонуклеотидных праймеров 5'-ССТТТССТГАТТССГТГСТСТТТGG-3' и 5'-ССТGТААААAGACTTATATTTAGT-3', сконструированных при помощи компьютерной программы UGENE (Okonechnikov et al., 2012).

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 20 мкл, содержащей 5 мкл ДНК, 1,8 мМ MgCl₂, по 0,2 мМ каждого дНТФ, по 1 мкМ прямого и обратного специфичных праймеров, 1 ед. ДНК-полимеразы Taq, в термоциклере БИС в режиме: предденатурация – 2 минуты при 94°C; 13 циклов: денатурация – 15 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 65°C (с понижением на 0,7°C/цикл); полимеризация – 45 секунд при 72°C; 24 цикла: денатурация – 15 секунд при 94°C; отжиг матрицы с праймерами – 30 секунд при 56°C; полимеризация – 45 секунд при 72°C; достраивание ПЦР-фрагментов: 10 минут при 72°C.

Электрофоретический анализ ПЦР-продуктов проводили, как описано ранее (Maniatis et al., 1982), с модификациями. Разделение продуктов ПЦР проводили в 2% агарозном геле, приготовленном на TAE-буфере [40мМ Трис-HCl pH 8.0, 20мМ ацетат натрия, 1мМ ЭДТА] с добавлением бромистого этидия до конечной концентрации 0,01 мкг/мл. Наносили в карманы геля по 25 мкл реакционной смеси с добавлением 5% глицерина, 0,05% бромфенолового синего и 0,05% ксиленцианола. В качестве маркера длины фрагментов ДНК использовали маркер «100 bp» (ООО Лаборатория МЕДИГЕН). Электрофорез вели при напряжении 90V в течение 1 часа в электрофорезной камере Bio-Rad, затем фотографировали в УФ-свете.

2.10. Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена, для расчетов использовали программу STATISTICA. Диагностическую эффективность и процент встречаемости аллеля, ассоциированного с устойчивостью/восприимчивостью среди устойчивых/восприимчивых образцов независимой выборки рассчитывали в Microsoft Excel. Диагностическая эффективность рассчитывалась как доля образцов, у которых наличие одного аллеля соответствовало устойчивым образцам, а другого аллеля – чувствительным в общем количестве тестируемых образцов.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Генотипирование

Используемый в исследовании чип состоит из 44040 SNP. Из них полиморфными оказались 39 140 (89%). Используя заданный пороговый уровень частоты аллелей (10%) было отобрано 27 319 (62%) маркеров. Они и были далее использованы для анализа ассоциаций «маркер-признак». При размере генома ячменя $5,1 \cdot 10^9$ пн в среднем приходится один маркер на 186 пн. В сочетании с физической картой это способствует более точному определению локусов. Для анализа популяционной структуры изучаемой выборки и кластерного анализа был взят каждый второй маркер, что соответствовало 13 659 маркерам.

3.2. Популяционная структура изучаемой выборки

С помощью программы STRUCTURE v 2.3.4 был проведен независимый анализ 13 659 маркеров для выявления структуры исследуемой выборки для каждого числа субпопуляций k от 3 до 7. Оценка значения правдоподобия $[\ln P(D)]$ сравнивалась с k на графике для определения оптимального значения k (рис. 5). Было определено, что «плато» начинается с $k=4$ и после $k=6$ реальная структура популяции отсутствует (Pritchard et al., 2000). В итоге идентифицировано четыре субпопуляции в нашей коллекции (рис. 6).

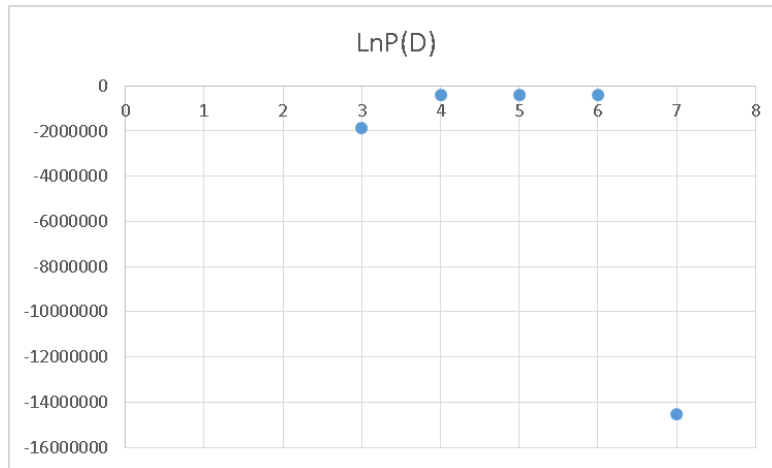


Рисунок 6. График определения оптимального количества популяций.

Генотипы ячменя разделились на четыре группы, содержащие 17, 29, 20 и 34 % генотипов (рис. 7). Группа III содержит наибольший процент сортов сибирской селекции (67%). Группы I, II и IV содержат 31%, 30% и 39% таких сортов, соответственно.

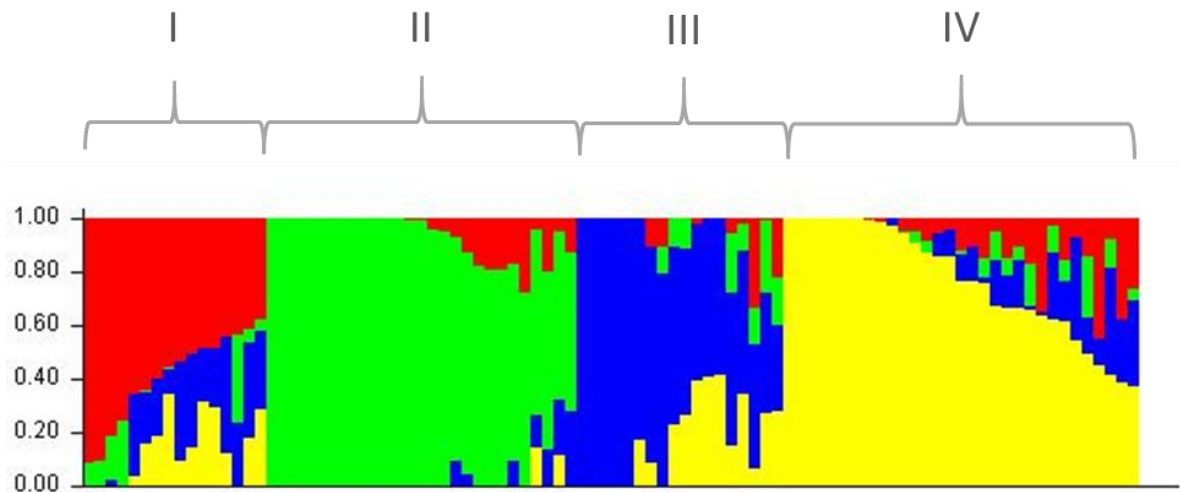


Рисунок 7. Популяционная структура изучаемой выборки.

3.3. Фенотипирование коллекции ячменя по признаку устойчивости к болезням

3.3.1. Сетчатая пятнистость

Фитопатологическая оценка выборки, состоящей из 94 сортообразцов сибирской коллекции ячменя показала, что при оценке реакции проростков на обработку четырьмя изолятами патогена *P.teres* устойчивы 25, 21, 14 и 14% генотипов и среднеустойчивы 19, 8, 9 и 16% генотипов к изолятам S10.2, K5.1, P3.4.0 и A2.6.0, соответственно (рис. 8).

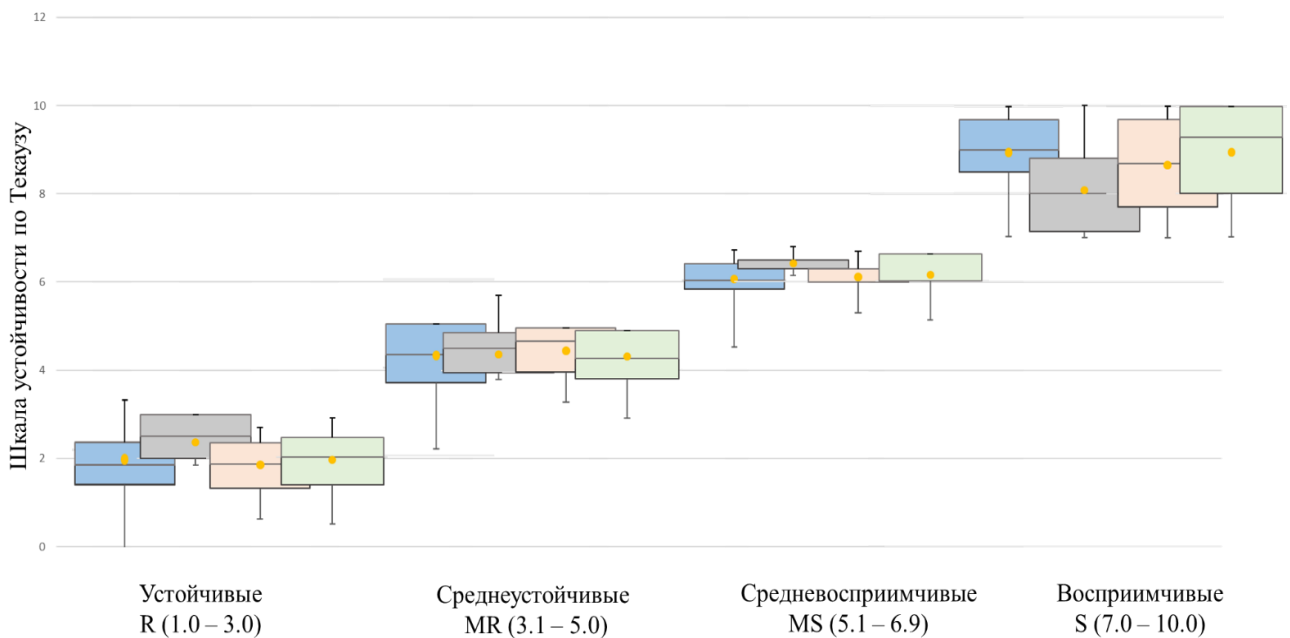


Рисунок 8. Оценка ювенильной устойчивости сибирской коллекции ячменя к сетчатой пятнистости. Показаны результаты оценки к четырем изолятам патогена *P.teres*: К 5.1 (голубой), S 10.2 (серый), P 3.4.0 (розовый), A 2.6.0 (светло-зеленый).

Всего четыре сортообразца оказались устойчивыми ко всем четырем изолятам *P.teres* (Омский голозерный 2, Алаг-Эрд-Эне, № 259/528, Омский 13709), и четыре – устойчивыми к трем из четырех изолятов (Кедр, Алей, Алтан-Булаг, Местный (Приморский край)) (см. Доп. табл. 3).

При рассмотрении устойчивых образцов в соответствии с полученными группами (рис. 7) получилось, что в первой группе 13% устойчивых, во второй группе устойчивые генотипы к возбудителю сетчатой пятнистости не присутствуют, в третьей – 11% и в четвертой – 10%.

3.3.2. Темно-бурая пятнистость

Фитопатологическая оценка выборки, состоящей из 94 сортообразцов сибирской коллекции ячменя показала, что к возбудителям темно-бурой пятнистости *C. sativus* (изоляты Kr2, Ch3 и O18.2) устойчивыми были 17, 21 и 19% генотипов, среднеустойчивыми - 23, 26 и 34%, соответственно (рис. 9).

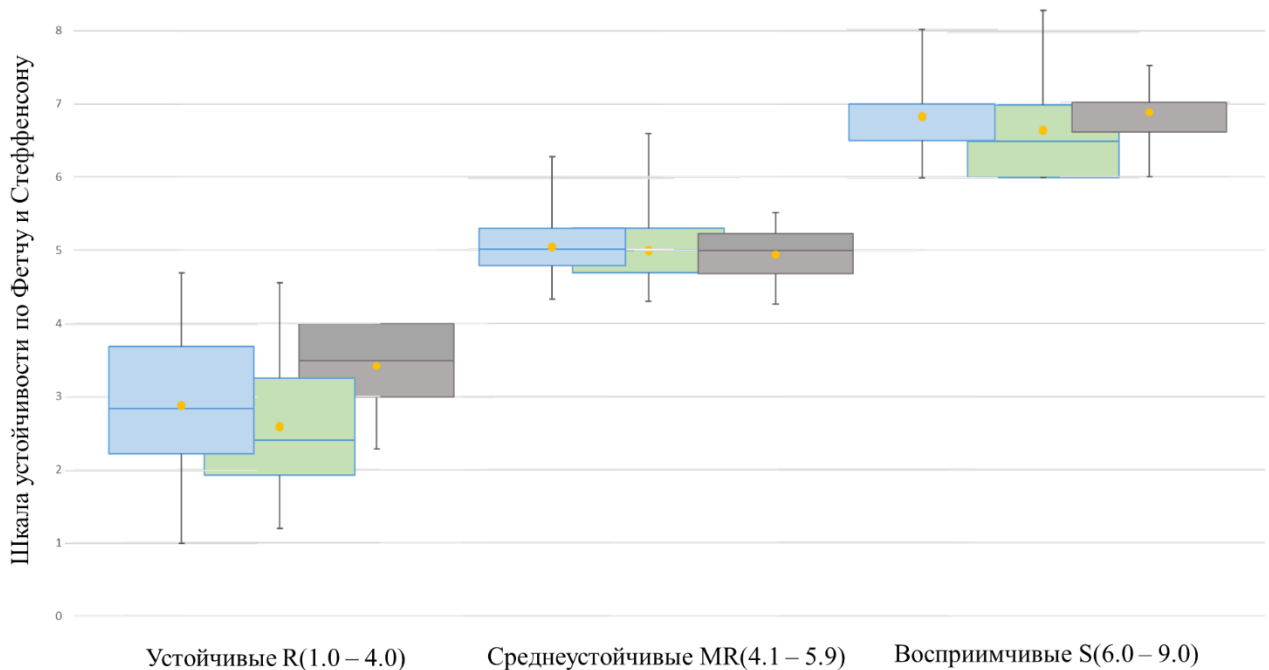


Рисунок 9. Оценка ювенильной устойчивости сибирской коллекции к возбудителю темно-бурой пятнистости. Показаны результаты оценки к трем изолятам *C. sativus*: Ch3 (голубой), Kr2 (светло-зеленый), O 18.2 (серый).

Десять генотипов (В-1, Колчан, Светик, Алей, Биом, Г-21219, Мутант 68, Омский голозерный 2, Северный и Сигнал) были устойчивы ко всем 3 изолятам (см. Доп. табл. 4).

Из генотипов, проявивших устойчивость к темно-бурой пятнистости, к первой группе относятся 7% генотипов, во второй 18%, в третьей группе 21% и в четвертой 23% сортов.

3.3.3. Корневые гнили

Фитопатологическая оценка выборки, состоящей из 94 сортообразцов сибирской коллекции ячменя показала, что к *C. sativus*, как к возбудителю, вызываемому корневые гнили, в случае обработки изолятом O18.2 патогена устойчивость проявляют 18% сортообразцов, тогда как 11,5% были среднеустойчивыми (рис. 10).

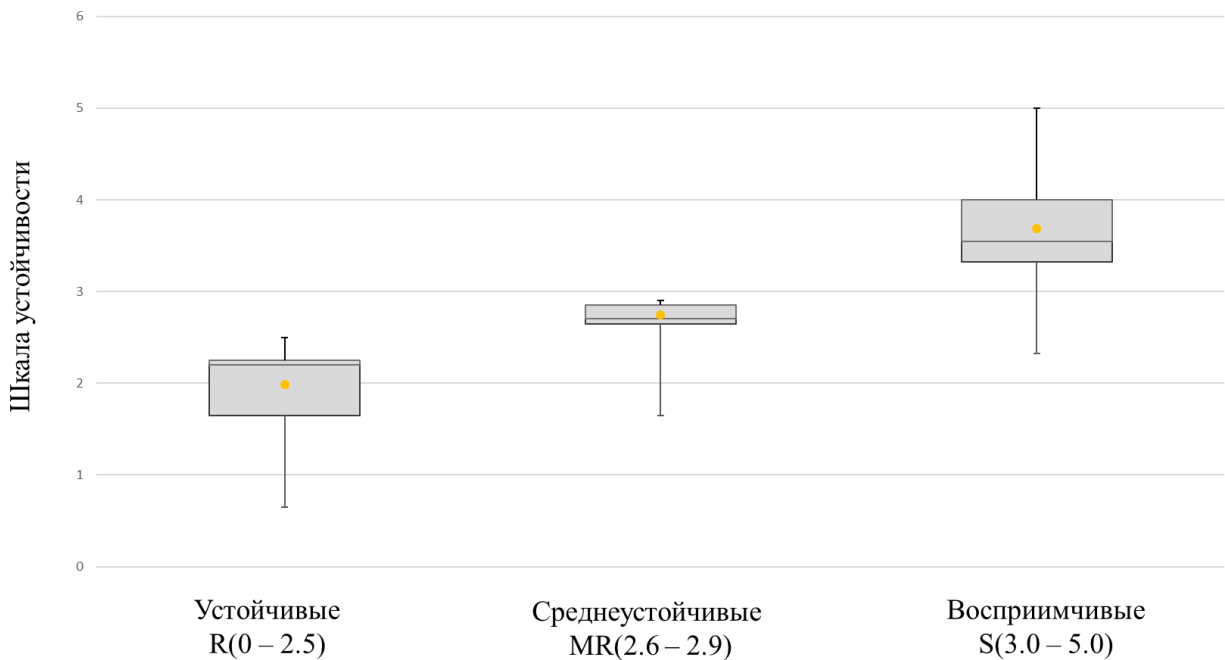


Рисунок 10. Оценка ювенильной устойчивости сибирской коллекции ячменя к корневым гнилям. Изучаемый изолят O 18.2.

Два сорта Колчан и Алей были устойчивы к *C. sativus*, как возбудителю и корневым гнилям и темно-бурой пятнистости (см. Доп. табл. 5).

Из генотипов, проявивших устойчивость к *C. sativus*, как возбудителю корневых гнилей, к первой группе относятся 20%, ко второй – 22%, к третьей – 16% и к четвертой – 16% сортов.

3.4. Полногеномный анализ ассоциаций

Полученные фено- и генотипические данные использовались для полногеномного анализа ассоциаций. Результаты всех статистических моделей предварительно анализировались на графике QQ-plot, чтобы подобрать наиболее подходящую модель для каждого набора данных.

3.4.1. Поиск локусов устойчивости ячменя к сетчатой пятнистости

Анализ с использованием обобщенной линейной модели (GLM) без учета популяционной структуры показал большое количество ложноположительных SNP на графике QQ-plot. Принимая во внимание анализ главных компонент для учета популяционной структуры GLM анализ (GLM + PCA) выявил 2 значимых SNPs на хромосоме 6H (в локусе 55.03 cM) и 2 значимых SNP на хромосоме 2H (71.0-74.1 cM), ассоциированных с устойчивостью к изоляту P.3.4.0 (рис. 10а). Также 8 SNP предполагаемого уровня: 2 SNP на хромосоме 3H в интервале 50.9-54.8 cM, ассоциированных с устойчивостью к изоляту A 2.6.0 (рис 11б), 3 SNP и 1 SNP на хромосоме 6H, близко к району, выявленному для изолята P3.4.0 (в локусе 53.33 cM) были ассоциированы с устойчивостью к изоляту S10.2 (рис. 11в) и K5.1 (рис 11г). Также 1 SNP предполагаемого уровня на хромосоме 3H был выявлен по отношению к изоляту K5.1 в интервале 135.6-137.5cM (рис. 11в).

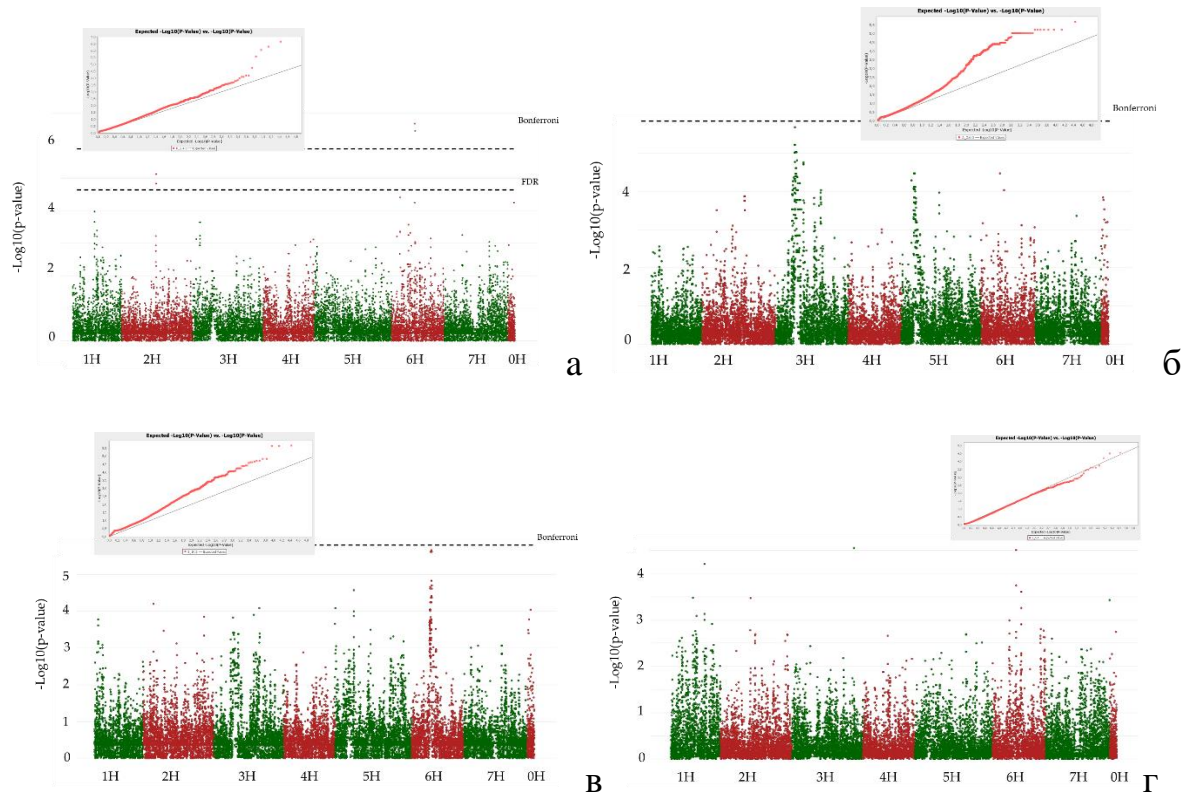


Рисунок 11. Manhattan plot для модели GLM + PCA и QQ plot (а) P 3.4.0 проростки, (б) A 2.6.0 проростки, (в) S 10.2 проростки, (г) K 5.1 проростки.

Анализ GLM с учетом популяционной структуры (GML + Q) выявил два значимых SNP на хромосоме 6H, ассоциированных с устойчивостью к изоляту P3.4.0 (55.03 cM) (рис. 12а), один значимый SNP на хромосоме 3H для изолята A2.6.0 (50.9-54.8 cM) (рис. 12б), один SNP на хромосоме 1H предполагаемого уровня для изолята K5.1 (57.29 cM) (рис. 12г).

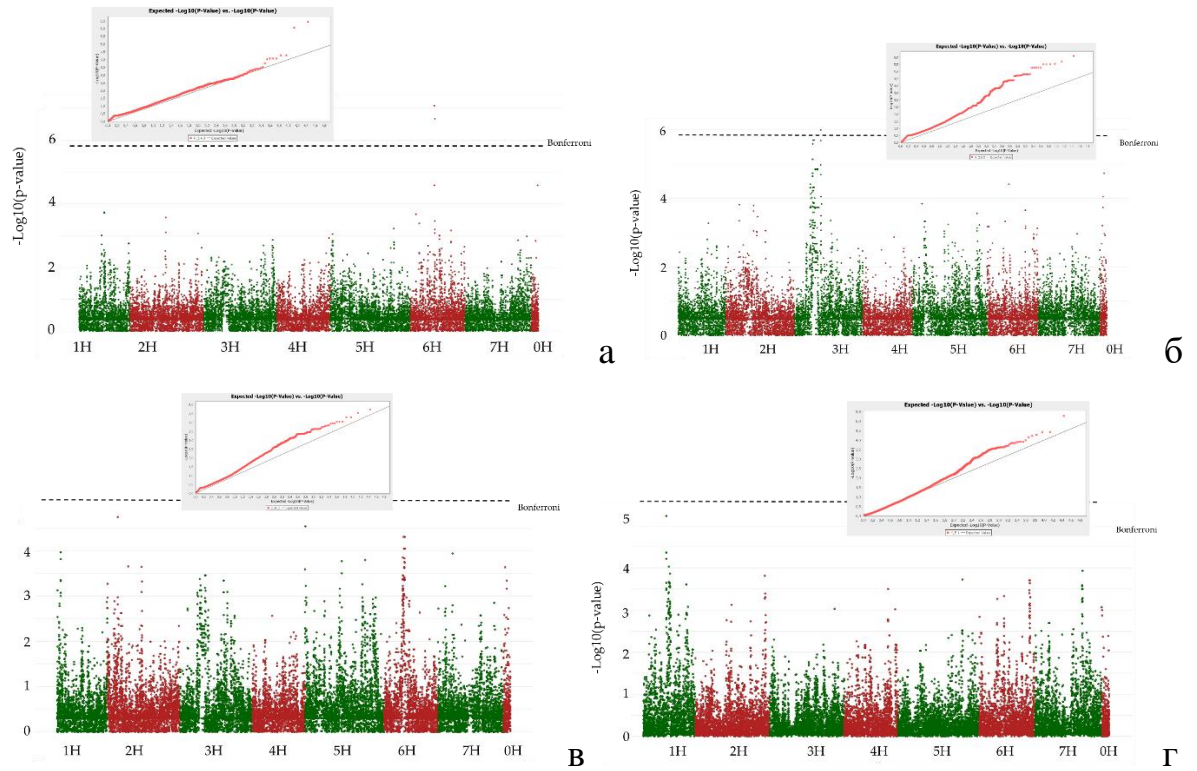


Рисунок 12. Manhattan plot для модели GLM + Q и QQ plot (а) Р 3.4.0, (б) А 2.6.0, (в) S 10.2, (г) К 5.1.

MLM анализ с использованием матрицы родства (MLM+K) не выявил значимых SNP (рис. 13). Однако было выявлено 2 SNP (в локусе 55,4 сМ) предполагаемого уровня на хромосоме 6H ассоциированных с изолятом Р3.4.0 (рис 14).

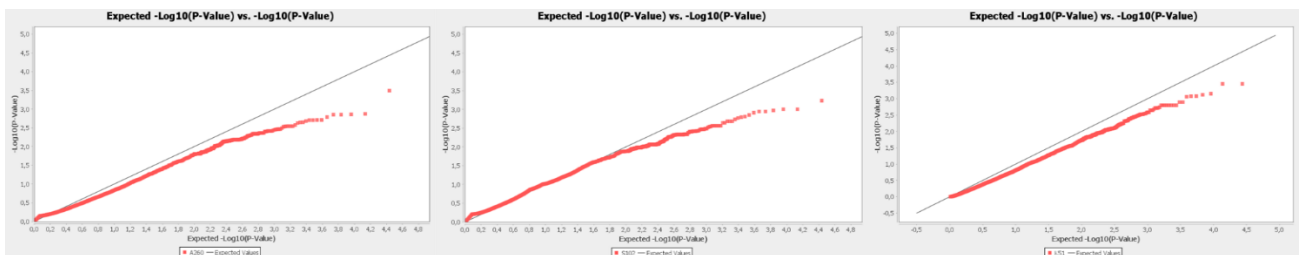


Рисунок 13. Графики QQ-plots полученные после применения MLM анализа: (а) А 2.6.0, (б) S 10.2, (в) К 5.1.

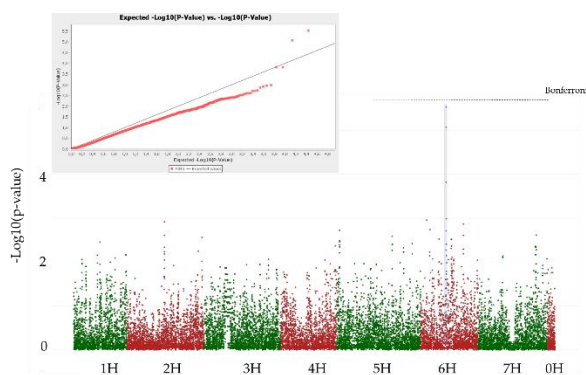


Рисунок 14. Manhattan plot и QQ plot для модели MLM + К изолята P 3.4.0.

С помощью метода GWAS было выявлено 6 геномных локусов и 14 SNP, ассоциированных с устойчивостью к патогену *P. teres*. Для изолята P3.4.0 – два локуса, 4 SNP; для изолята A2.6.0 – один локус, 3 SNP; для S10.2 – два локуса, 5 SNP; и для K5.1 – три локуса, 3 SNP.

Таблица 4. SNP-маркеры, ассоциированные с устойчивостью P3.4.0, S10.2, A2.6.0 и K5.1 изолятами выявленные исследуемыми моделями GLM+PCA, GLM+Q, MLM+K.

Изолят	p-value	Модель	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Аллель	Частота минорного аллеля	Ассоциируемость SNP с устойчивостью
K5.1	$5.89 \cdot 10^{-6}$	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-33160***	1H	441912080	57.3-58.2	G/A	A(0.21)	G(0.95)
S10.2	$1.82 \cdot 10^{-5}$	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-74407***	2H	31977763	23.2-23.8	C/T	C(0.46)	T(0.68)
P3.4.0	$1.44 \cdot 10^{-5}$	GLM+P	BOPA2_12_31445**	2H	639288665	71-74.1	A/G	G(0.20)	A(0.5)
P3.4.0	$7.42 \cdot 10^{-6}$	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-104859**	2H	639342580	71-74.1	A/G	G(0.18)	A(0.5)
A2.6.0	$5.96 \cdot 10^{-6}$	GLM+P	SCRI_RS_186341***	3H	208365969	51.2	G/A	A(0.40)	A(0.92)
A2.6.0	$2.08 \cdot 10^{-6}$	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-169338***	3H	213632124	50.9-52.6	A/G	G(0.40)	G(0.92)
A2.6.0	$7.37 \cdot 10^{-7}$	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-169338***	3H	213632124	50.9-52.6	A/G	G(0.40)	G(0.92)
A2.6.0	$1.01 \cdot 10^{-6}$	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-183207*	3H	490244247	52.6-54.8	A/T	T(0.41)	T(0.75)
K5.1	$2.84 \cdot 10^{-5}$	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-215624***	3H	668951958	135.6-137.5	A/C	C(0.11)	A(1)

Продолжение таблицы 4.

Изолят	p-value	Модель	Название маркерного локуса (SNP)	X	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Аллель	Частота минорного аллеля	Ассоцируемость SNP с устойчивостью
P3.4.0	3.24*10 ⁻⁸	GLM+P	SCRI_RS_239642*	6H	357492232	55.4	A/G	A(0.22)	A(0.83)
P3.4.0	8.11*10 ⁻⁸	GLM+Q	SCRI_RS_239642*	6H	357492232	55,4	A/G	A(0.22)	A(0.83)
K5.1	3.14*10 ⁻⁵	GLM+P	SCRI_RS_239642***	6H	357492232	55.4	A/G	A(0.22)	A(0.55)
P3.4.0	2.97*10 ⁻⁶	MLM+K	SCRI_RS_239642***	6H	357492232	55.4	A/G	A(0.22)	A(0.55)
S10.2	2.72*10 ⁻⁶	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-398663***	6H	359349968	54.89	T/C	C(0.25)	T(0.64)
P3.4.0	2.09*10 ⁻⁷	GLM+Q	SCRI_RS_224389*	6H	360336381	55.4	C/T	C(0.22)	C(0.83)
P3.4.0	4.84*10 ⁻⁸	GLM+P	SCRI_RS_224389*	6H	360336381	55.4	C/T	C(0.22)	C(0.83)
P3.4.0	8.50*10 ⁻⁶	MLM+K	SCRI_RS_224389***	6H	360336381	55.4	C/T	C(0.22)	C(0.83)
S10.2	4.95*10 ⁻⁵	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-391875***	6H	142513704	52.6-53.8	A/C	A(0.30)	C(1)
S10.2	2.38*10 ⁻⁶	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-391875***	6H	142513704	52.6-53.8	A/C	A(0.30)	C(1)
S10.2	2.20*10 ⁻⁶	GLM+P	JHI-Hv50k-2016-392656***	6H	153234073	52.6-53.8	C/T	C(0.48)	T(0.86)
S10.2	4.95*10 ⁻⁵	GLM+Q	BOPA2_12_30021***	6H	156957594	52.6-53.8	A/G	A(0.30)	G(1)
S10.2	2.38*10 ⁻⁶	GLM+P	BOPA2_12_30021***	6H	156957594	52.6-53.8	A/G	A(0.30)	G(1)

*- Бонферрони, **- FDR, ***- Предполагаемый уровень

Обнаруженные локусы были нанесены на хромосомную карту.

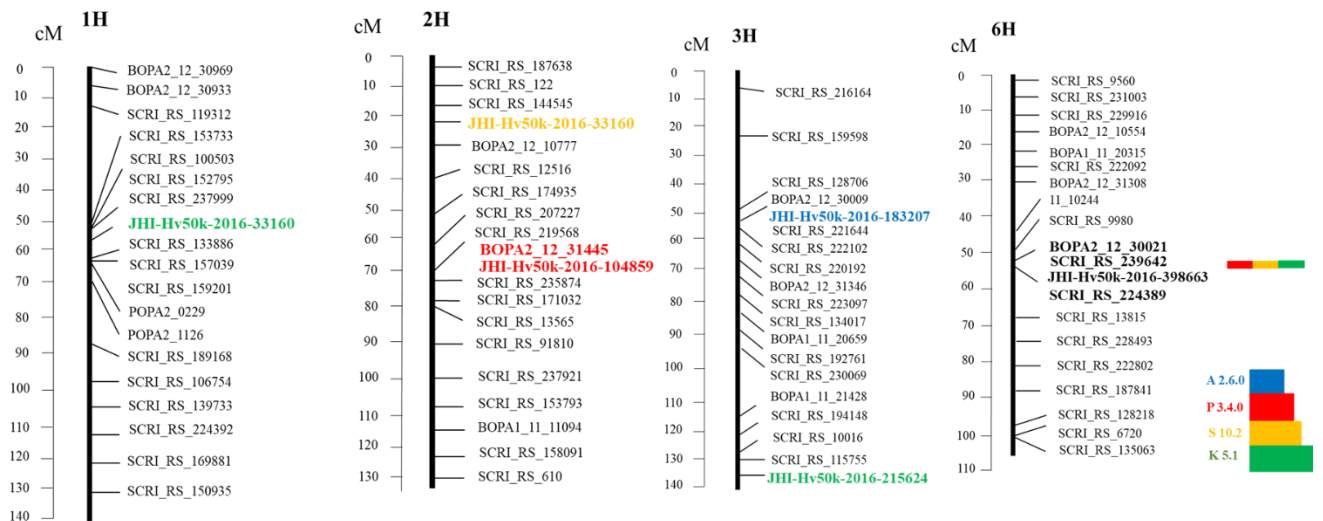


Рисунок 15. Локализация геномных районов, выявленных в настоящей работе по устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости, на карте «Morex / Barke iSelect map» (<http://bioinf.hutton.ac.uk/iselect/app/>). Цвет означает устойчивость к разным изолятам: синий – A 2.6.0, красный – P 3.4.0, оранжевый – S 10.2, зеленый – K 5.1, черный – устойчивость сразу к нескольким изолятам.

3.4.2. Поиск локусов устойчивости ячменя к темно-бурой пятнистости

Анализ устойчивости с помощью GLM модели с учетом главных компонент (GLM+PCA) позволил выявить геномный район на хромосоме 3Н, который ассоциировался с устойчивостью ко всем изолятам. Район включал в себя 18 SNP на интервале 12.11 – 18.8 сМ, из них все 18 ассоциировались с изолятом Ch3 (рис. 16а), 13 из этих 18 ассоциированы с изолятом O18.2 (рис. 16б) и один SNP (JHI-Nv50k-2016-157070) также ассоциировался с изолятом Kr2 (рис. 16в). Также, применяя критерий FDR можно рассматривать маркеры на хромосомах 1Н (район 41.5 сМ), 3Н (район 105.95 сМ), 5Н (район 97.3 сМ) и 7Н (районы 11.54 сМ и 70.54 сМ). Однако критерий FDR может давать ложно-положительные результаты, поэтому данные локусы будут взяты в расчет только при условии дополнительных подтверждений.

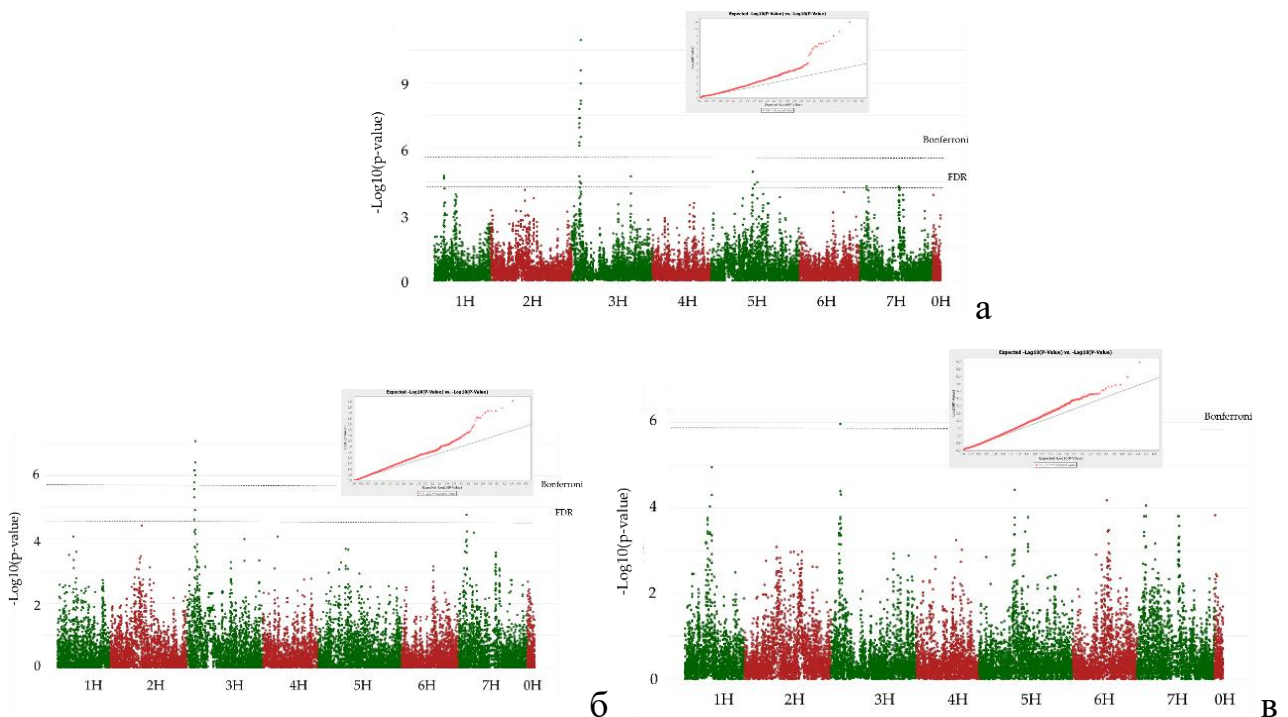


Рисунок 16. Manhattan plot для модели GLM + PCA и QQ plot (а) Ch3, (б) O18.2, (в) Kr2.

Модель с учетом популяционной структуры (GLM+Q) показала четыре геномных района ассоциированных с устойчивостью. Из них два района (6 SNP (рис. 17а) и 2 SNP (рис. 17в) расположены на хромосоме 1Н в интервалах 41.5 – 42.35 сМ и 57.3 сМ, также 17 SNP выявлены на хромосоме 3Н в интервале 12.11 – 18.83, 28 SNP, локализующихся на интервале 58.8 – 59.5 сМ, располагались на хромосоме 2Н, но область, относящаяся к этому локусу очень большая ($181.2 \cdot 10^6$ – $582.8 \cdot 10^6$ пн) и мы предполагаем, что среди SNP, выявленных на хромосоме 2, есть и ложноположительные (рис. 17а, б). Также был выявлен маркер на хромосоме 7Н в районе 13.88 сМ (рис. 17б).

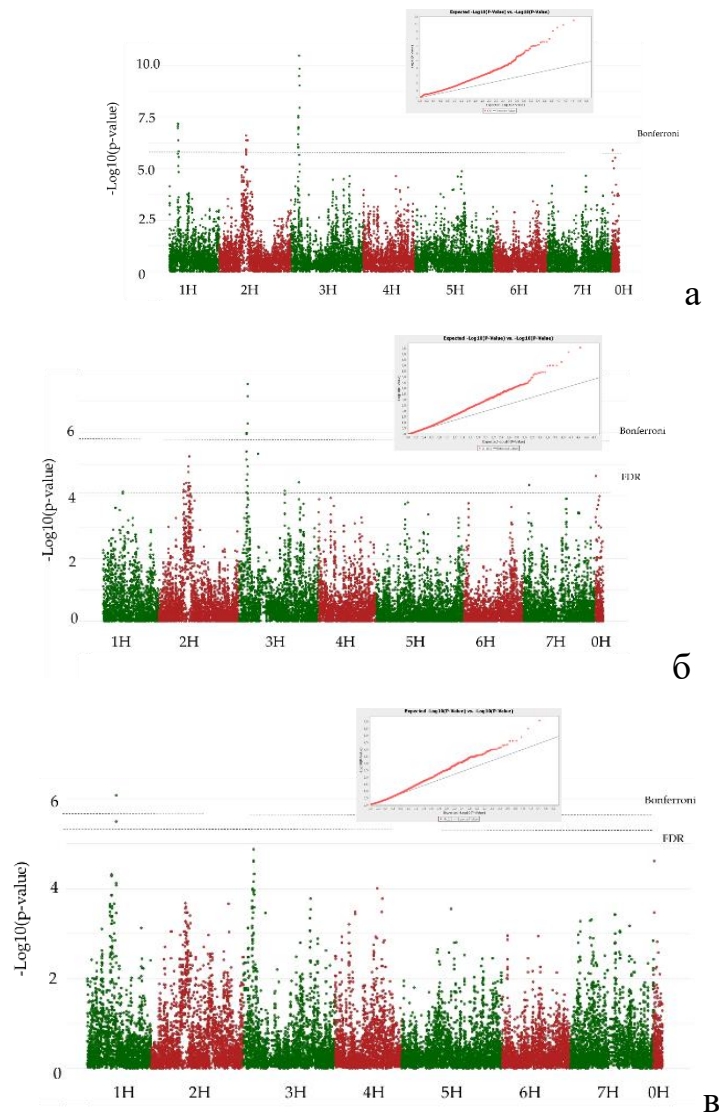


Рисунок 17. Manhattan plots и QQ plots для модели GLM + Q: (а) Ch3, (б) O18.2, (в) Kr2.

С помощью модели MLM + К было идентифицировано 7 SNP на хромосоме 3Н по отношению к изоляту Ch3 (рис. 18а).

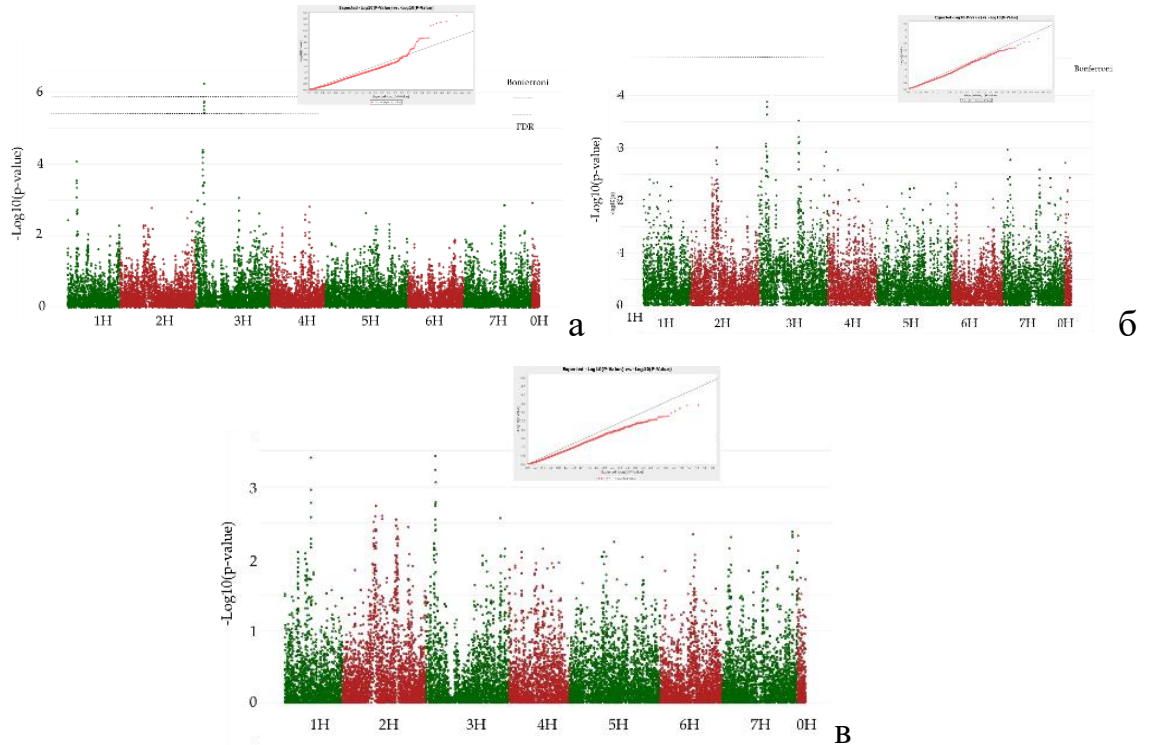


Рисунок 18. Manhattan plot и QQ plot для модели MLM + К: (а) Ch3, (б) O18.2, (в) Kr2.

Методом GWAS было выявлено 6 геномных локусов и 41 SNP, ассоциированных с устойчивостью к патогену *C. sativus*. Для изолята Ch3 – 4 локуса, 38 SNP; для изолята Kr2 – 2 локуса, 3 SNP; и для O18.2 – 2 локуса, 14 SNP.

Таблица 5. SNP-маркеры, ассоциированные с устойчивостью к изолятам Ch3, Kr2 и O18.2, выявленные исследуемыми моделями GLM+PCA, GLM+Q, MLM+K.

№	Изолят	<i>p</i> -value	Модель	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Аллель	Частота минорного аллеля	Ассоциируемость SNP с устойчивостью
1	Ch3	1.69*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-17526	1H	32858572	41.5-42.35	G/A	A(0.42)	G(0.89)
		1.05*10 ^{-07*}	GLM+Q							
2	Ch3	1.99*10 ^{-05**}	GLM+PCA	SCRI_RS_153785	1H	34712305	41.5-42.35	T/G	T(0.42)	G(0.89)
	Ch3	8.64*10 ^{-08*}	GLM+Q							
3	Ch3	2.32*10 ^{-05**}	GLM+PCA	BOPA1_5381-1950	1H	35128597	41.5-42.35	G/A	G(0.38)	A(0.89)
	Ch3	6.63*10 ^{-08*}	GLM+Q							

Продолжение таблицы 5.

№	Изолят	p-value	Модель	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Аллель	Частота минорного аллеля	Ассоциируемость SNP с устойчивостью
4	Ch3	6.74*10 ^{-08*}	GLM+Q	SCRI_RS_140837	1H	36988586		A/G	A(0.46)	A(0.74)
5	Ch3	4.21*10 ^{-07*}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-17967	1H	36987742		G/C	G(0.46)	G(0.74)
6	Ch3	1.41*10 ^{-06*}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-18133	1H	38010710		A/G	G(0.48)	A(0.74)
7	Kr2	3.19*10 ^{-06**}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-33506	1H	418776969	57.3	A/C	A(0.15)	A(0.5)
8	Kr2	8.42*10 ^{-07*}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-33568	1H	418919445		G/T	G(0.15)	T(0.5)
9	Ch3	2.40*10 ^{-07*}	GLM+Q	SCRI_RS_162917	2H	455173630	58.8-59.5	A/G	A(0.21)	G(0.52)
10	Ch3	1.32*10 ^{-06*}	GLM+Q	SCRI_RS_191136	2H	457742165		T/C	T(0.22)	C(0.53)
11	Ch3	4.22*10 ^{-07*}	GLM+Q	BOPA2_12_11504	2H	457989681		A/G	A(0.19)	G(0.53)
12	Ch3	1.15*10 ^{-06*}	GLM+Q	SCRI_RS_233449	2H	457983490		G/A	G(0.21)	A(0.53)
13	Ch3	1.58*10 ^{-06*}	GLM+Q	SCRI_RS_83731	2H			T/G	T(0.21)	G(0.53)
14	Ch3	4.22*10 ^{-07*}	GLM+Q	SCRI_RS_141789	2H	484678185		A/C	A(0.19)	C(0.53)
15	Ch3	4.22*10 ^{-07*}	GLM+Q	BOPA2_12_30108	2H	489044408		A/C	A(0.19)	C(0.53)
16	Ch3	4.22*10 ^{-07*}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-98667	2H	492079773		A/G	A(0.19)	G(0.53)
17	Ch3	4.22*10 ^{-07*}	GLM+Q	SCRI_RS_206529	2H	503351577		A/G	A(0.19)	G(0.53)
18	Ch3	7.25*10 ^{-07*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-155569	3H	12322177		A/G	A(0.14)	G(0.58)
	O18.2	1.63*10 ^{-06*}	GLM+PCA		3H					A(0.53)
	Ch3	6.50*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H		G(0.58)			
	O18.2	1.01*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H		A(0.53)			
19	Ch3	3.88*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-155785	3H	12580968	A/G	G(0.1)	A(0.63)	
	O 18.2	6.94*10 ^{-07*}	GLM+PCA		3H				A(0.59)	
	Ch3	9.71*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H				A(0.63)	
	O18.2	1.03*10 ^{-06*}	GLM+Q		3H				A(0.59)	
20	Ch3	1.56*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-155803	3H	12578996	A/T	A(0.1)	T(0.63)	
	O18.2	2.68*10 ^{-06**}	GLM+PCA		3H				T(0.59)	
	Ch3	2.78*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H				T(0.63)	
	O18.2	3.86*10 ^{-06**}	GLM+Q		3H				T(0.59)	
21	Ch3	3.88*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-155805	3H	12578789	A/G	G(0.1)	A(0.63)	
	O18.2	6.94*10 ^{-07*}	GLM+PCA		3H				A(0.59)	
	Ch3	9.71*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H				A(0.63)	
	O18.2	1.03*10 ^{-06*}	GLM+Q		3H				A(0.59)	
22	Ch3	1.56*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-155806	3H	12578778	A/G	A(0.1)	G(0.63)	
	O18.2	2.68*10 ^{-06*}	GLM+PCA		3H				G(0.59)	
	Ch3	2.78*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H				G(0.63)	
	O18.2	3.86*10 ^{-06**}	GLM+Q		3H				G(0.59)	
23	Ch3	9.45*10 ^{-07*}	GLM+Q	JHI-Hv50k-2016-155951	3H	12503956	15.01-15.16	A/T	A(0.14)	T(0.68)
24	Ch3	1.56*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156062	3H	12986518		A/G	A(0.1)	G(0.63)
	O18.2	2.68*10 ^{-06**}	GLM+PCA		3H					G(0.59)
	Ch3	2.78*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					G(0.63)
	O18.2	3.86*10 ^{-06**}	GLM+Q		3H					G(0.59)
25	Ch3	1.06*10 ^{-07*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156304	3H	13214780		T/C	C(0.1)	T(0.63)
	O18.2	4.80*10 ^{-06**}	GLM+PCA		3H					T(0.59)
	Ch3	2.12*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H					T(0.63)
26	Ch3	5.05*10 ^{-07*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156310	3H	13214125		G/C	C(0.1)	G(0.63)
	Ch3	8.58*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H					
27	Ch3	1.76*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156329	3H	13213342		G/A	G(0.25)	G(0.68)
	Ch3	3.36*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					

Продолжение таблицы 5.

№	Изолят	p-value	Модель	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Аллель	Частота минорного аллеля	Ассоциируемость SNP с устойчивостью
28	Ch3	7.10*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156336	3H	13212930		A/T	A(0.11)	T(0.63) T(0.59) T(0.63)
	O18.2	2.40*10 ^{-05**}	GLM+PCA		3H					
	Ch3	1.15*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H					
29	Ch3	3.16*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156369	3H	13199742		A/C	C(0.2)	A(0.56)
30	Ch3	3.88*10 ^{-08*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156387	3H	13168607		C/A	C(0.10)	A(0.63)
	O18.2	6.94*10 ^{-07*}	GLM+PCA		3H					A(0.59)
	Ch3	9.71*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					A(0.63)
	O18.2	1.03*10 ^{-06**}	GLM+Q		3H					A(0.59)
31	O18.2	1.21*10 ^{-05**}	GLM+PCA	SCRI_RS_8644	3H	13851550		A/G	A(0.22)	A(0.53)
32	Ch3	9.00*10 ^{-09**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156820	3H	14017928	15.16	C/T	T(0.18)	T(0.63)
	O18.2	9.90*10 ^{-07*}	GLM+PCA		3H					T(0.65)
	Ch3	3.24*10 ^{-10*}	GLM+Q		3H					T(0.63)
	O18.2	6.79*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					T(0.65)
	Ch3	3.04*10 ^{-06**}	MLM+K		3H					T(0.63)
33	Ch3	2.88*10 ^{-07*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156833	3H	14019492		T/A	T(0.29)	T(0.65)
	Ch3	3.73*10 ^{-06**}	MLM+K		3H					
34	Ch3	1.09*10 ^{-09**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156842	3H	14020389		A/G	A(0.18)	A(0.63)
	O18.2	3.88*10 ^{-07*}	GLM+PCA		3H					A(0.65)
	Ch3	3.36*10 ^{-11*}	GLM+Q		3H					A(0.63)
	O18.2	2.81*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					A(0.65)
	Ch3	5.77*10 ^{-07*}	MLM+K		3H					A(0.63)
35	Ch3	2.67*10 ^{-10*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-156999	3H	14306317		A/C	A(0.25)	A(0.74)
	Ch3	9.21*10 ^{-10*}	GLM+Q		3H					
	Ch3	1.77*10 ^{-06**}	MLM+K		3H					
36	Ch3	1.16*10 ^{-11*}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-157070	3H	14237637	17.35-18.8	C/G	C(0.19)	C(0.68)
	Kr2	1.08*10 ^{-06**}	GLM+PCA		3H					C(0.69)
	O18.2	8.52*10 ^{-08*}	GLM+PCA		3H					C(0.65)
	Ch3	1.41*10 ^{-10*}	GLM+Q		3H					C(0.68)
	O18.2	4.97*10 ^{-07*}	GLM+Q		3H					C(0.65)
	Ch3	1.94*10 ^{-06**}	MLM+K		3H					C(0.68)
37	Ch3	6.54*10 ^{-09**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-157182	3H	14349924		T/A	T(0.25)	T(0.74)
	Ch3	1.09*10 ^{-08*}	GLM+Q		3H					
	Ch3	2.38*10 ^{-06**}	MLM+K		3H					
38	Ch3	3.92*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-158003	3H	15617068		G/A	G(0.27)	G(0.68)
39	Ch3	1.80*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-204423	3H	559660284		A/C	A(0.1)	C(0.74)
40	Ch3	5.01*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-448898	7H	14372276	11.54	C/T	C(0.12)	T(0.68)
41	O18.2	1.67*10 ^{-05**}	GLM+PCA	JHI-Hv50k-2016-451269	7H	17358749	13.88	A/T	T(0.11)	A(0.65)

*- Бонферрони, **- FDR, ***- Предполагаемый уровень

Обнаруженные локусы были нанесены на хромосомную карту (рис. 19). Есть локусы, ассоциированные с устойчивостью к одному из трех исследуемых изолятов (изолят-специфичные), например, на хромосоме 1H устойчивость к разным штаммам патогена ассоциируется с разными локусами, есть локусы,

ассоциированные с устойчивостью к двум изолятам, а есть с более широкой устойчивостью.

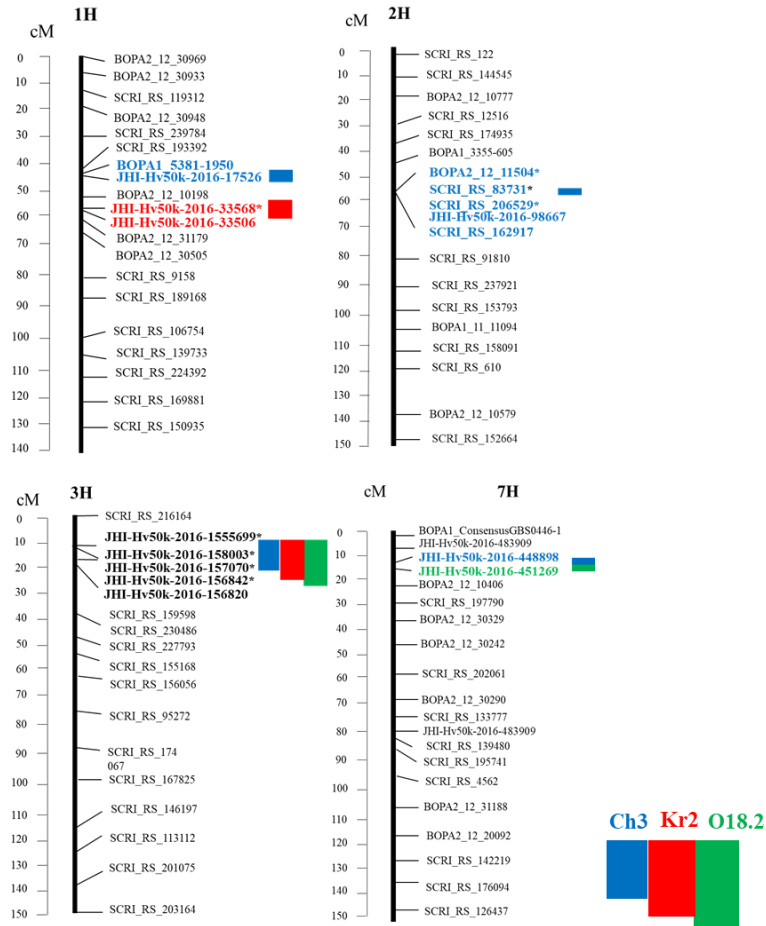


Рисунок 19. Локализация геномных районов, выявленных в настоящей работе по устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости, на карте «Morex / Varke iSelect map» (<http://bioinf.hutton.ac.uk/iselect/app/>). Цвет прямоугольников означает устойчивость к разным изолятам: синий – Ch3, красный – Kr2, зеленый – O18.2, черный – устойчивость к нескольким изолятам. * - SNP размещены на основе сопоставления физической и генетической позиций на хромосоме.

3.4.3. Поиск локусов устойчивости к возбудителю корневых гнилей и анализ корреляции фенотипических данных по устойчивости к *C. sativus*, как возбудителя и корневых гнилей и темно-бурой пятнистости

На базе ВИЗР было проведено заражение изолятом O18.2 *C. sativus*, как возбудителя корневых гнилей с целью выявления устойчивости. Согласно используемой методике (Афанасенко О.С., 1987) 20% генотипов были высоко устойчивы и 11% генотипов были среднеустойчивы. GWAS не выявил значимых SNP.

В данном исследовании провели корреляционный анализ (по Пирсону) для сравнения оценок заражения возбудителем темно-бурой пятнистости и корневых гнилей. Результаты приведены в таблице 6.

Таблица 6. Корреляционный анализ и уровень значимости корреляции по Пирсону между показателями устойчивости к разным изолятам темно-бурой пятнистости и корневых гнилей.

Корреляция \ p-value	Темно-бурая пятнистость (Kr2)	Темно-бурая пятнистость (Ch3)	Темно-бурая пятнистость (O18.2)	Корневые гнили (O18.2)
Темно-бурая пятнистость (Kr2)	-			
Темно-бурая пятнистость (Ch3)	0.61	-		
Темно-бурая пятнистость (O18.2)	0.69	0.73	-	
Корневые гнили (O18.2)	0.23	0.25	0.22	-

Уровень значимости значений корреляций во всех случаях составлял $p < 0.001$.

Как можно заметить из таблицы 6, корреляция между устойчивостью растений ячменя к различным изолятам получилась довольно высокой (от 0.61 до 0.73). Корреляция между устойчивостью к корневым гнилям и темно-бурой пятнистости варьировалась от 0.22 до 0.25. Это сильно меньше и объясняет 6% изменчивости. Изменчивость, или размер эффекта, определяется как квадрат

коэффициента корреляции, $((0,25)^2 = 0,06)$. Соответственно за 94% отвечают неизвестные факторы.

3.5. PLS анализ. Выявление расонеспецифичной устойчивости

Анализ ассоциаций так же был проведен с использованием 2B-PLS анализа. К совокупности фенотипических признаков – оценки устойчивости симптомов каждой болезни и генотипических данных был применен PLS анализ и были получены бикомпоненты.

3.5.1. Темно-бурая пятнистость

Ковариация «фенотип-генотип» была рассчитана как набор линейных бикомпонент (табл. 7). Первые три бикомпоненты составляют 94,9% от общей ковариации.

Таблица 7. Ковариация “Фенотип-генотип” двух блоков главных компонент.

Оси	Ковариация пары бикомпонент	Процент от общей ковариации
1	18.9	68.0
2	8.9	14.9
3	7.9	11.9
4	4.0	3.1
5	3.3	2.1

В дальнейшем анализе была исследована корреляция между полученными значениями фитопатологических оценок и тремя бикомпонентами (табл. 8.)

Таблица 8. Коэффициенты корреляции исследуемых признаков с тремя бикомпонентами (устойчивость к *C. sativus*).

Признак	Первая бикомпонента		Вторая бикомпонента		Третья бикомпонента	
	Фенотипическая	Генотипическая	Фенотипическая	генотипическая	Фенотипическая	Генотипическая
Изолят Kh2	0.81*	0.55*	-0.16	-0.15	0.24*	0.25*
Изолят Ch3	0.90*	0.58*	0.22*	0.08	-0.10	-0.11
Изолят O 18.2	0.90*	0.64*	-0.10	-0.12	-0.03	0.03

* корреляция значимая (p -value < 0.05)

В таблице 8 представлены коэффициенты корреляции между бикомпонентой и устойчивостью растений ячменя к изолятам патогена *C. sativus*. Видно, что устойчивость ко всем изолятам коррелирует с первой бикомпонентой (табл. 8). Поэтому она отражает общую устойчивость к возбудителю темно-бурой пятнистости.

Корреляция между векторами первой фенотипической бикомпоненты и первой генотипической показана на рисунке 20. При рассмотрении устойчивости сортов к различным изолятам патогена оказалось, что сорта, проявившие в основном устойчивость, собираются на одном конце корреляционного облака (8 сортов). А сорта, восприимчивые к патогену во всех испытаниях (30 сортов) – на другом конце корреляционного облака (рис. 20, табл. 9).

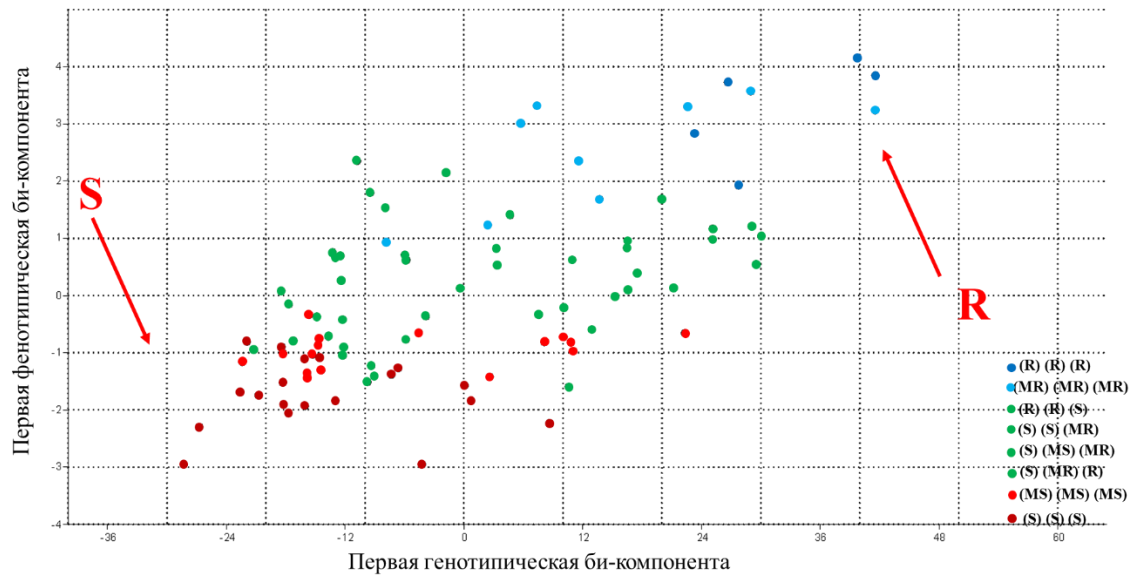


Рисунок 20. График первых бикомпонент, полученных с помощью PLS анализа по geno- и фенотипическим данным. Точками обозначены сорта. Красным цветом показаны сорта, проявившие восприимчивость ко всем исследуемым изолятам (S), синим – устойчивые (R), зеленым – сорта, проявившие разный тип восприимчивости к изолятам. Буквы в скобках обозначают тип устойчивости к одному из изолятов. (S) – восприимчивый сорт, (MS) – средневосприимчивый сорт, (MR) – среднеустойчивый сорт, (R) – устойчивый сорт.

Как результат, были выявлены две группы: устойчивых и восприимчивых сортов к возбудителю темно-бурой пятнистости. Соответственно, можно предположить, что выделившиеся группы устойчивых сортов обладают той генетической компонентой, которая определяет реакцию на заражение изолятами патогена, вызывающего темно-бурую пятнистость (табл. 9).

Таблица 9. Сорты, дифференцированные с помощью графика бикомпонент на устойчивые и восприимчивые по отношению к болезни темно-бурая пятнистость.

Восприимчивые сорта:	Устойчивые сорта:
Abyssinia	Биом
Алаг-Эрд-Эне	Г-21219
Арна	Омский голозерный 2
Авалон	Светик
Голозерный 1	Северный
Имен	Бархатный
Jngve	Колчан
Красноярский 1	В-1
Курьер	
Л-1	
Мелиус	
Мерит 57	
Местный Дагестанский	
Местный Эфиопский	
Московский 121	
Мутант 68	
Норд 112412	
Носовский 11	
Нутанс 970	
Омский голозерный 1	
Оренбургский кормовой	
Приекульский 14	
Рейд	
Саша	
Симбат	
Таганай	
Татум	
Темп	
Виконт	
Мутант Винера	

3.5.2. Сетчатая пятнистость

Рассчитывая ковариацию «фенотип-генотип» для болезни сетчатая пятнистость получили, что на первую бикомпоненту приходится 61,0% от общей ковариации, а на три первые бикомпоненты приходится 93,5% от общей ковариаты (табл. 10).

Таблица 10. Ковариация “Фенотип-генотип” двух блоков главных компонент.

Оси	Ковариация пары бикомпонент	Процент от общей ковариации
1	2.4	61.0
2	0.8	20.4
3	0.5	12.0
4	0.3	6.6

Далее рассчитали корреляцию между устойчивостью к изолятам патогена и тремя бикомпонентами (табл. 11).

Таблица 11. Коэффициенты корреляции исследуемых признаков (устойчивость к изолятам *P. teres*) с первыми тремя бикомпонентами.

Признак	Первая бикомпонента		Вторая бикомпонента		Третья бикомпонента	
	Фенотипическая	Генотипическая	фенотипическая	генотипическая	Фенотипическая	генотипическая
Изолят А2.6.0	0.87*	0.53*	-0.08	-0.05*	-0.51*	0.16
Изолят Р 3.4.0	0.84*	0.42*	0.01	-0.002*	-0.68*	0.36*
Изолят S 10.2	0.61*	0.43*	-0.74*	-0.49*	0.20	0.23*
Изолят К 5.1	0.77*	0.57*	0.51*	0.42*	0.038	0.25*

* корреляция значимая (p -value < 0.05)

В таблице 11 представлены коэффициенты корреляции для исследуемых изолятов патогена *P. teres* на стадии проростков. Видно, что проростковая устойчивость ко всем изолятам коррелирует с первой бикомпонентой. Так же,

устойчивость к изолятам S 10.2 и K 5.1 значимо коррелирует со второй фенотипической и генотипической бикомпонентой с разными знаками. Получается, что только первая фенотипическая компонента отражает совокупную устойчивость ко всем взятым в анализ фенотипическим признакам (табл. 11).

В результате PLS анализа на основе гено- и фенотипических данных по первой бикомпоненте в экспериментах по анализу устойчивости к *P. teres* сформировались две группы сортов: устойчивых (11 сортов) и восприимчивых (31 сорт) к сетчатой пятнистости (рис. 21, табл. 12).

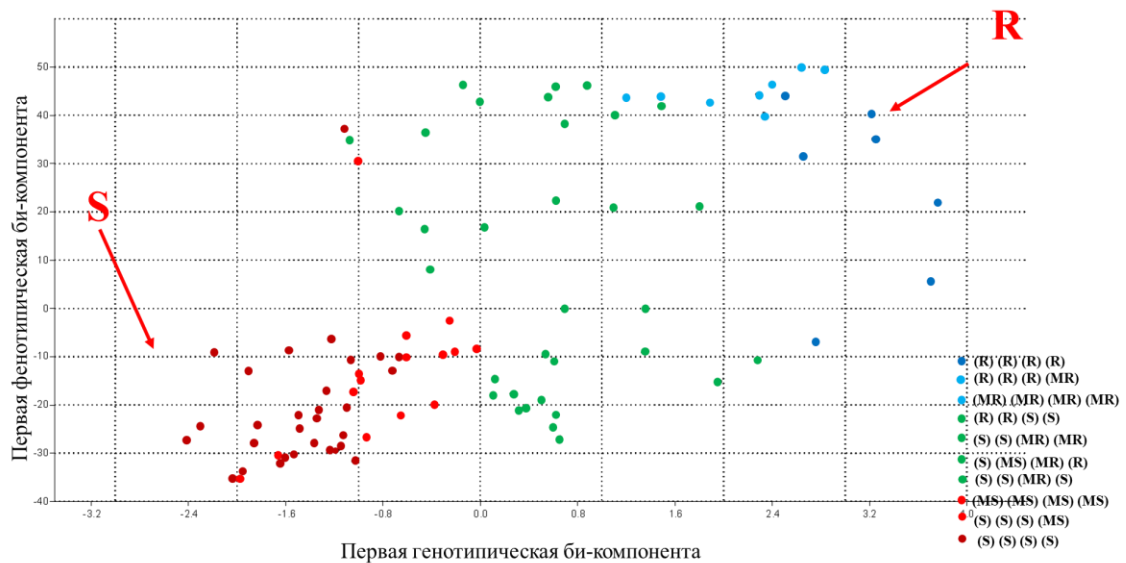


Рисунок 21. График распределения сортов методом PLS анализа по генотипическим и фенотипическим данным (устойчивость к *P. teres*). Точками являются исследованные сорта, буквы в скобках обозначают тип устойчивости к одному из изолятов. Красным цветом показаны сорта, проявившие восприимчивость ко всем исследуемым изолятам. (S) – восприимчивый сорт, (MS) – средневосприимчивый сорт, (MR) – среднеустойчивый сорт, (R) – устойчивый сорт.

Таблица 12. Сорты, дифференцированные с помощью графика бикомпонент на устойчивые и восприимчивые по отношению к болезни сетчатая пятнистость.

Восприимчивые сорта:	Устойчивые сорта:
Г-19951 Авалон Норд 112412 Татум Г-21038 Г-21671 Биом Танай Талан Г-21219 Jugve Ворсинский 2 Омский голозерный 1 Оскар Арчекас Ача Таганай Сигнал Зерноградский 86 Никита Маяк Курьер Оренбургский кормовой Носовский 11 Импульс Маныч Темп Добрый Анна Новосибирский 80 Нутанс 970	Омский голозерный 2 Алаг-Эрд-Эне Северный №599/528 Паллидум 394 Белогорский Местный (Приморский) Алтан-Булаг Омский 13709 Кедр Нарымчанин

3.5.3. Корневые гнили.

Исследование болезни корневые гнили проводилось с помощью одного изолята (O18.2). Была рассчитана ковариация «фенотип-генотип» и проведен PLS анализ оценки устойчивости к корневой гнили. Поскольку признак исследовался один, то, естественно, что вклад признака в первую фенотипическую бикомпоненту составляет 1. Корреляция фитопатологической оценки болезни с генотипической бикомпонентой составляет 0,54 (табл. 13)

Таблица 13. Коэффициенты корреляции признака устойчивость к возбудителю корневых гнилей.

Признак	Первая бикомпонента	
	фенотипическая	Генотипическая
Изолят O18.2	1*	0.5*

*корреляция значимая (p -value < 0.05)

Анализ устойчивости корневой системы к *C. sativus* выявил две группы сортов: устойчивых (13 сортов) и восприимчивых (45 сортов) (рис. 22, табл. 14).

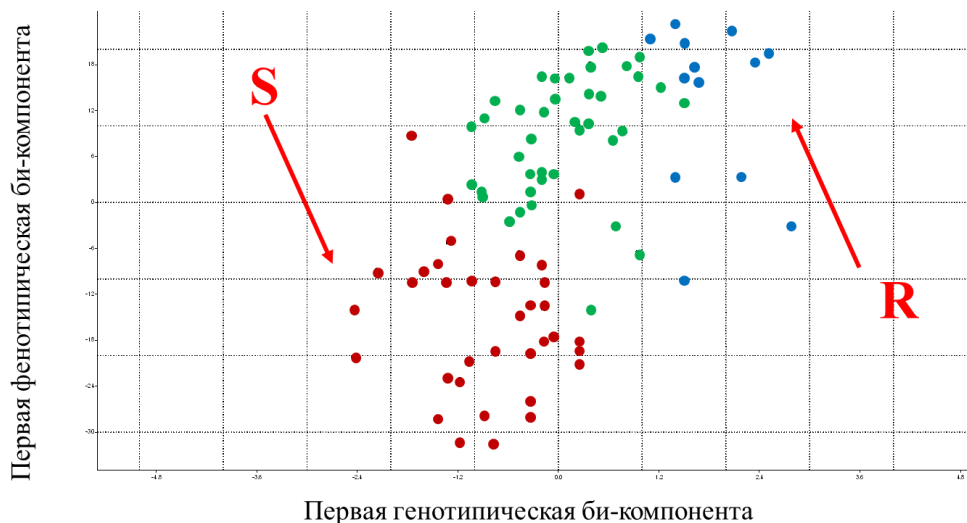


Рисунок 22. График первых бикомпонент, полученных с помощью PLS анализа по geno- и фенотипическим данным. Красным цветом показаны сорта, проявившие восприимчивость (S), синим – проявившие устойчивость (R), зеленым – сорта, проявившие промежуточный тип восприимчивости.

Таблица 14. Сорта, дифференцированные с помощью графика бикомпонент на устойчивые и восприимчивые по отношению к болезни корневые гнили.

Восприимчивые сорта:	Устойчивые сорта:
Татум Талан Jngve Омский голозер. 1 Abyssinia Местный (Дагестан) Местный (Эфиопия) Алаг-Эрд-Эне Арчекас Мутант Винер(а) Линия 1285 Линия 1 Отбор Туал Обской Никита Гранал Крымчак 55 Выбор Винер Маяк Паллидум 394 Белогорский Местный (Якутия) Заларинец Местный (Приморский край) Тарский 1 Алтан-Булаг Московский 121 Омский 13709 Курьер Оренбургский кормовой Носовский 11 Безенчукский 2 Добрый Прикульский 14 Нарымчанин	Норд 112412 Виконт Саша Ворсинский 2 Алей Лиман III Brodyole Символ Славянский Челябинск. 70 Медикум Колчан Донецкий 8

Продолжение таблицы 14.

Восприимчивые сорта:	Устойчивые сорта:
Бархатный Wial Баган Алын-Буя В-1 Соболек Емеля Красноярский 91 Нутанс 970	

3.5.4. Расчет полногеномного анализа ассоциаций с использованием фенотипической бикомпоненты

С помощью PLS анализа возможно получить вектор значений (бикомпонента), чтобы использовать его в дальнейшем, как фенотипический признак (фенотипическая бикомпонента) в полногеномном анализе ассоциаций и выявленные ассоциации будут отражать устойчивость ко всем взятым в анализ изолятам.

При использовании первой фенотипической бикомпоненты устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости в ассоциативном анализе при помощи модели GLM + PCA было выявлено два локуса на третьей и седьмой хромосомах, всего 18 значимых SNP (15 SNP на хромосоме 3H в интервале 15.2-18.8 cM и 3 на хромосоме 7H в интервале 7.52-15.44 cM) (рис. 23а), а при помощи модели GLM + Q – два локуса: на второй и на третьей хромосоме, всего 35 SNP (18 SNP на хромосоме 2H в интервале 58.64 – 59.42 cM, и 17 SNP на хромосоме 3H в интервале 15.2-18.8 cM) (рис. 23б). MLM анализ значимых маркеров не выявил (рис. 23в).

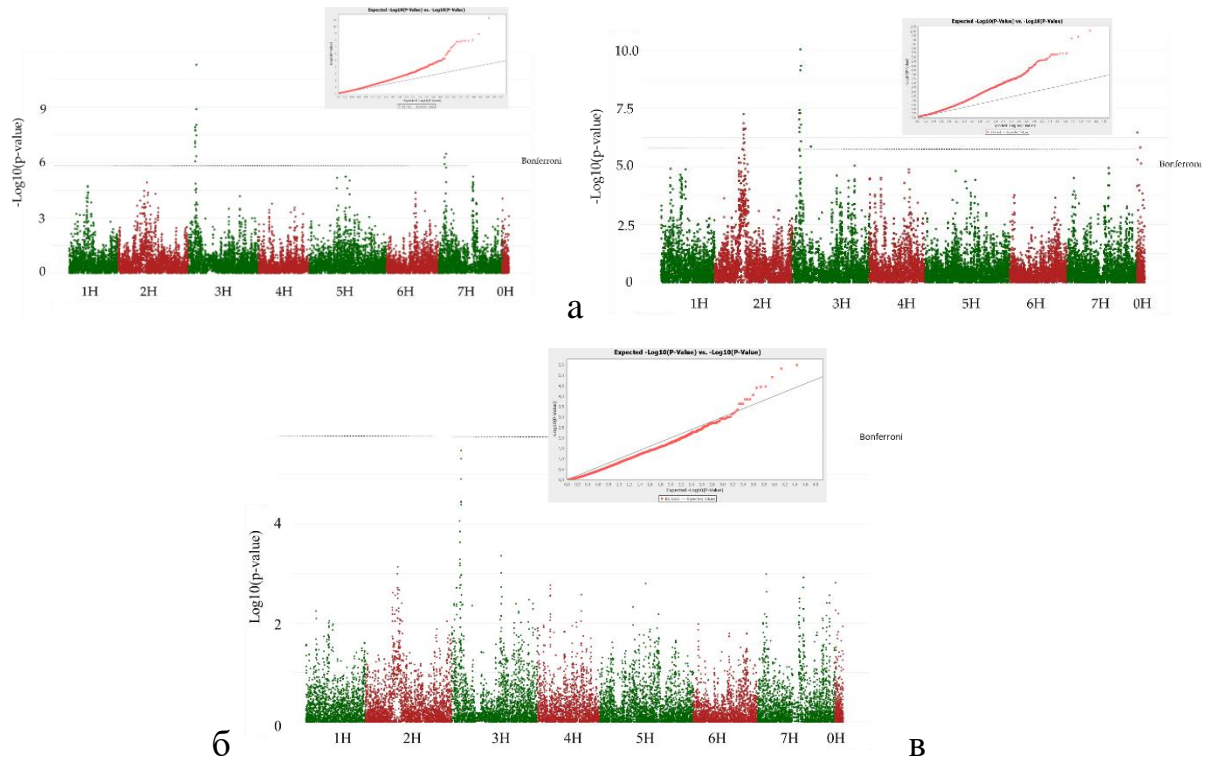


Рисунок 23. GWAS первой фенотипической компоненты данных по темно-бурой пятнистости. Manhattan plot и QQ plot для моделей: (а) GLM + PCA, (б) GLM + Q, (в) MLM + K.

Всего при использовании фенотипической бикомпоненты было обнаружено 3 локуса которые совпадали с выявленными локусами при ассоциативном анализе отдельно по признакам. Из 35 выявленных SNP (табл. 15) 27 совпали с выявленными при ассоциативном анализе отдельно по признакам. Дополнительно было выявлено 8 SNP из которых 7 SNP локализовались на хромосоме 2H на интервале (58.36-59.49 сМ) и один SNP на хромосоме 7H на интервале 7.32 сМ. Обнаруженные SNP ассоциируются с устойчивостью ко всем исследуемым изолятам. Участок генома на хромосоме 1H не проявился, что позволяет предположить, что он является распецифичным в отличии от остальных обнаруженных локусов.

Таблица 15. Маркеры, выявленные при использовании фенотипической компоненты в качестве фенотипических данных для болезни темно-бурая пятнистость.

№	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	<i>p</i> -value	Модель	Локализация на генетической карте (сМ)
1	BOPA2_12_10035	2H	408286040	1.75*10 ^{-06*}	GLM+Q	58.36-59.5
2	SCRI_RS_161169		425598637	1.75*10 ^{-06*}	GLM+Q	
3	SCRI_RS_162917		455173630	5.35*10 ^{-08*}	GLM+Q	
4	BOPA1_2634-2228		NA	6.23*10 ^{-07*}	GLM+Q	
5	SCRI_RS_191136		457742165	1.01*10 ^{-06*}	GLM+Q	
6	BOPA2_12_11504		457989681	2.28*10 ^{-07*}	GLM+Q	
7	BOPA1_5160-268		NA	6.23*10 ^{-07*}	GLM+Q	
8	SCRI_RS_233449		457983490	1.36*10 ^{-07*}	GLM+Q	
9	SCRI_RS_83731		NA	4.09*10 ^{-07*}	GLM+Q	
10	SCRI_RS_132839		461440050	2.59*10 ^{-07*}	GLM+Q	
11	SCRI_RS_136740		NA	2.59*10 ^{-07*}	GLM+Q	
12	BOPA1_4280-295		NA	8.96*10 ^{-07*}	GLM+Q	
13	SCRI_RS_141789		484678185	2.28*10 ^{-07*}	GLM+Q	
14	BOPA2_12_30108		489044408	2.28*10 ^{-07*}	GLM+Q	
15	JHI-Hv50k-2016-98667		492079773	2.28*10 ^{-07*}	GLM+Q	
16	SCRI_RS_206529		503351577	2.28*10 ^{-07*}	GLM+Q	
17	JHI-Hv50k-2016-155569	3H	12322177	9.30*10 ^{-08*}	GLM+PCA	15.2-18.8
				9.10*10 ^{-08*}	GLM+Q	
18	JHI-Hv50k-2016-155785		12580968	1.82*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				4.87*10 ^{-08*}	GLM+Q	
19	JHI-Hv50k-2016-155803		12578996	1.26*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				3.67*10 ^{-08*}	GLM+Q	
20	JHI-Hv50k-2016-155805		12578789	1.82*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				4.87*10 ^{-08*}	GLM+Q	
21	JHI-Hv50k-2016-155806		12578778	1.26*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				3.67*10 ^{-08*}	GLM+Q	
22	JHI-Hv50k-2016-156062		12986518	1.26*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				3.67*10 ^{-08*}	GLM+Q	
23	JHI-Hv50k-2016-156304		13214780	7.04*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				2.10*10 ^{-08*}	GLM+Q	
24	JHI-Hv50k-2016-156310		13214125	8.74*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
25	JHI-Hv50k-2016-156329		13213342	1.78*10 ^{-06*}	GLM+Q	
26	JHI-Hv50k-2016-156336		13212930	1.41*10 ^{-07*}	GLM+PCA	
				3.27*10 ^{-07*}	GLM+Q	
27	JHI-Hv50k-2016-156387		13168607	1.82*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				4.87*10 ^{-08*}	GLM+Q	
28	JHI-Hv50k-2016-156820		14017928	9.20*10 ^{-09*}	GLM+PCA	
				7.02*10 ^{-10*}	GLM+Q	
29	JHI-Hv50k-2016-156842		14020389	1.28*10 ^{-09*}	GLM+PCA	
				9.11*10 ^{-11*}	GLM+Q	
				3.24*10 ^{-06**}	MLM+K	
30	JHI-Hv50k-2016-156999		14306317	3.49*10 ^{-08*}	GLM+PCA	
				1.54*10 ^{-07*}	GLM+Q	
31	JHI-Hv50k-2016-157070		14237637	5.27*10 ^{-12*}	GLM+PCA	
				4.46*10 ^{-10*}	GLM+Q	
				4.80*10 ^{-06**}	MLM+K	

Продолжение таблицы 15.

№	Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	<i>p</i> -value	Модель	Локализация на генетической карте (сМ)
32	ЖНН-Нv50k-2016-157182	3Н	14349924	4.51*10 ⁻⁰⁷ *	GLM+PCA	15.2-18.8
				8.00*10 ⁻⁰⁷ *	GLM+Q	
33	ЖНН-Нv50k-2016-448898	7Н	14372276	5.21*10 ⁻⁰⁷ *	GLM+PCA	11.54
34	ЖНН-Нv50k-2016-449158		14445553	1.22*10 ⁻⁰⁶ *	GLM+PCA	7.32
35	ЖНН-Нv50k-2016-451269		17358749	3.50*10 ⁻⁰⁷ *	GLM+PCA	13.88

*- Бонферрони, **- Предполагаемый уровень. Жирным выделены маркеры, которые были обнаружены при GWAS на признаках.

Ассоциативный анализ при использовании первой фенотипической бикомпоненты оценки устойчивости сетчатой пятнистости не выявил значимых маркеров (рис. 24).

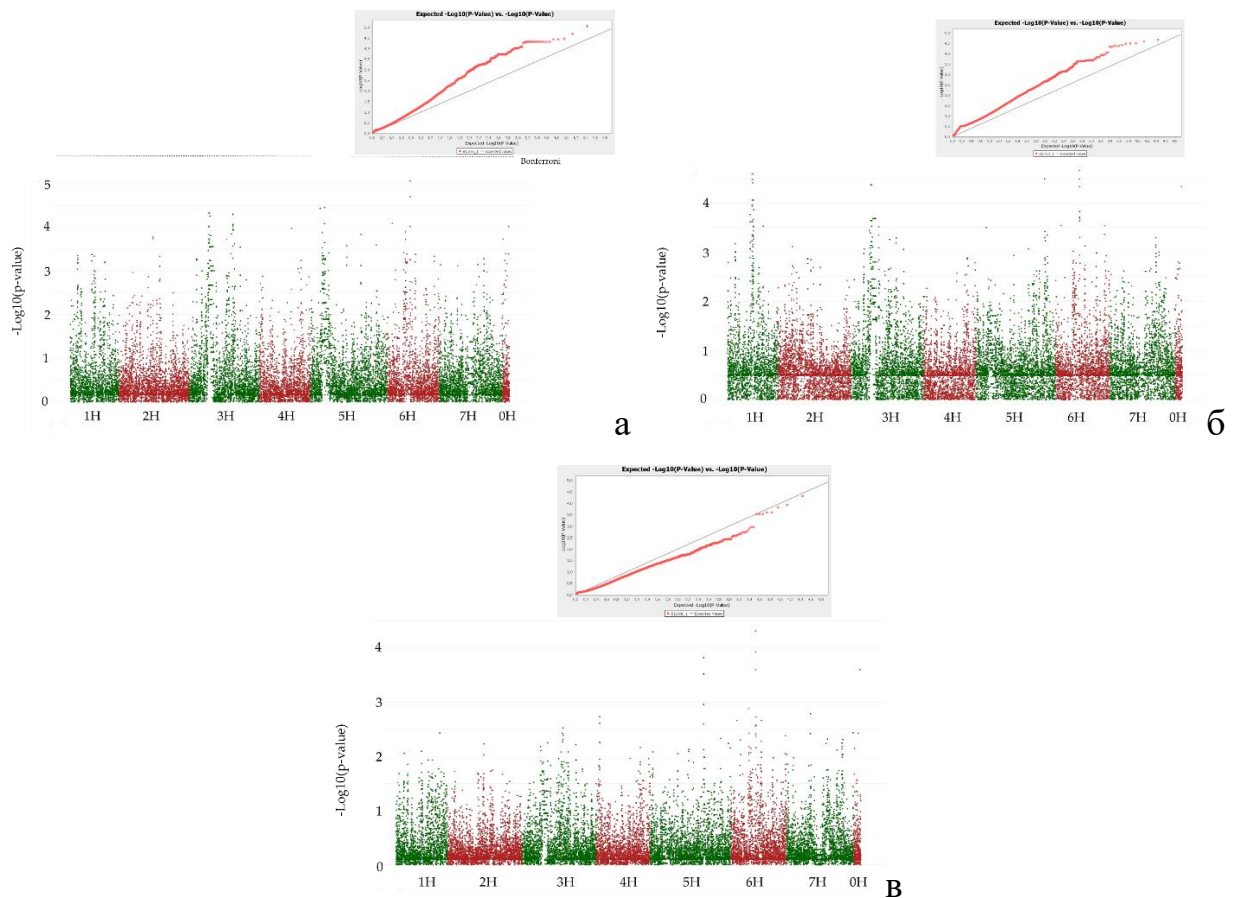


Рисунок 24. GWAS анализ первой фенотипической компоненты данных по оценке сетчатой пятнистости. Manhattan plot и QQ plot для моделей: (а) GLM + PCA, (б) GLM + Q, (в) MLM + K.

В случае с корневыми гнилями признак исследуется один, его корреляция с фенотипической бикомпонентой равна 1. Поэтому для ассоциативного анализа не имеет значение, берем ли признак или его фенотипическую бикомпоненту.

3.6. Разработка и валидация диагностических ПЦР-маркеров

По результатам полногеномного анализа ассоциаций на устойчивость к болезни темно-бурая пятнистость было выявлено 49 SNP, из которых 41 SNP – по результатам GWAS для каждого отдельного изолята и 8 SNP – при использовании первой фенотипической бикомпоненты, полученной с помощью PLS-анализа (см. главу 3.6.1.). На устойчивость к сетчатой пятнистости было выявлено 14 SNP только по результатам GWAS для каждого отдельного изолята (см. главу 3.6.3.). В совокупности 63 SNP было выявлено для дальнейшего исследования.

3.6.1. KASP-маркеры устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости

По результатам GWAS (Vyukova et al., 2017) было выбрано 10 SNP-маркеров для разработки на их основе диагностических ДНК-маркеров, с дальнейшим применением в селекционных программах. Выбранные SNP локализовались на пяти геномных районах. Первый район на хромосоме 1Н (позиция 57.29 сМ) был выявлен только по отношению к одному изоляту Kr2 и было решено проверить, как отразится влияние расоспецифичного маркера на независимую выборку, хотя предположительно данный маркер должен обладать невысоким уровнем количественной устойчивости к изолятам патогена *C. sativus*. Три геномных района на хромосоме 3Н, локализованные в позициях 2.11 сМ, 15.16 сМ и интервале 17.35-18.8 сМ, включали в себя маркеры, выявленные как методом GWAS по отношению ко всем изучаемым изолятам, так и при GWAS по данным PLS анализа (рис. 16, рис. 22). Один геномный район на хромосоме 7Н в

интервале 11.54-13.88 сМ. Два маркера с данного геномного района были выявлены по отношению к разным изолятам Ch3 и O18.2 (рис 16 а,б) и при расчете GWAS данных PLS анализа (табл. 14, рис 23 а). По данным Steffenson на хромосоме 7Н присутствует локус устойчивости к темно-бурой пятнистости *Rcs5* (Steffenson et al., 1996), с примерной локализацией 26-27*10⁶ пн. Предположив, что возможно, геномный район на хромосоме 7Н, обнаруженный в данной работе и локализующийся в районе 14*10⁶ – 17*10⁶ пн, сцеплен с *Rcs5*, хотя выявленные значения *p*-value не являются самыми значимыми среди получившихся, было принято решение анализировать маркеры с данного локуса на независимой выборке. Несмотря на выявленные локусы на хромосоме 2Н, маркеры на этой хромосоме не были отобраны, так как не дифференцировались на две, выделенные при использовании PLS анализа, группы.

Таблица 16. KASP маркеры для темно-бурой пятнистости.

Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Последовательность, содержащая SNP
JHI-Hv50k-2016-33568	1Н	418919445	57.29	ATTACATTGGATTACTAATTCAGGCCT CGTTCGTTTCGACAGGGATTTAGA[A/C]G GGGTTTGGCAGGGATTGAGGTGGATAT AATCCCTACAAGTCATATTCC
JHI-Hv50k-2016-155569	3Н	12322177	12.11	TCTCCTGTGTTTACGATCACTGTCGCT CTCTGATTCACTATCAGATTCC[A/G]AG GAAGAATAGCTTCGCCTCCTGTGCTTT CTTGACTTGAGCTTCTTCTCC
JHI-Hv50k-2016-156820	3Н	14017928	15.16	TCCACTGTCATCTTTGACAATGCCAGC CTCTCGAGTACCACCTGTAACCC[C/T]C ATTCAACGGAATACATGTCAAATGAAT GGTCGTCTGGACGGAGAGGATT
JHI-Hv50k-2016-156833	3Н	14019492	15.16	TTGCTCTTGCAATGGAGGCCATCACTC ACCAACAACSTTGACACAAACAA[A/T] AGCAGCCCAGGTGCATTTACCGCATCC GACGGCGACTGCTCGATCATCGA
JHI-Hv50k-2016-156842	3Н	14020389	15.16	CGTGGTTGCAACAATACTGCTTATCTA CGGGAGAGCTTCACGGACAAATC[A/G] CTCCTGGATAGGCTTCATTGTTTCAATG CATTCCTTTGGGTGGCACTGA
JHI-Hv50k-2016-157070	3Н	14237637	17.35	GTTCGATTTGATTCTTTGGGTCGGGTTA ATACATATGATTGAAATGTGTT[C/G]GT GCTGACGCTTGTCTGATCATGTCCAT GCAGGTTTCATCAACCTGCGGC

Продолжение таблицы 16.

Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Последовательность, содержащая SNP
JHI-Hv50k-2016-156999	3Н	14306317	18.83	AACAAAATATTCAGCAAAAGCAATCCA GCTTCTTGAGTACTCCCTCCGTT[A/C]C TAAATATAAGTCTTTTTACAGGTTTTCA TAGGGGACTACATATGGATGT
JHI-Hv50k-2016-157182	3Н	14349924	18.83	TGGACTTTTTTTTGCTTGTGGTTTGGGT GGACAGAATCTGCACAAACAAA[A/T]G TTTTGTCATTTATCATGTATAAAAATTT GTGAGTGTCTGGTCAACGGG
JHI-Hv50k-2016-448898	7Н	14372276	11.54	AAGAACCAGTTCCTGCGGAGTAAGTT CCCAATACCCCGAATATTCTGCG[T/C]G GGCCAATAAGTCCCCATATGACGGACG CATCGTAGAACACATGATCAGT
JHI-Hv50k-2016-451269	7Н	17358749	13.88	GAAAAAAAGTTCATTGCATGATAAAGA ACGGCCAGGAACCAGTAATTAGG[A/T] CTCCTTGGTCAAGAATTATCATACCTTG GCGCCCTCACCTCCTATGAAGA

KASP-анализ проводился на независимой выборке из 22 сортообразцов (табл 17).

Для того, чтобы определить, какой маркер будет оптимальным для дальнейших селекционных программ, рассматривались такие статистических значения, как коэффициент корреляции Спирмена, частота встречаемости (в %) ассоциированного с устойчивостью аллеля маркерного локуса среди устойчивых образцов независимой выборки, частота встречаемости альтернативного аллеля в восприимчивых сортах и диагностическая эффективность.

Таблица 17. Результаты KASP-генотипирования 22 образцов ячменя независимой выборки с помощью разработанных SNP-маркеров, ассоциированных с устойчивостью к изоляту Ch3 *S. sativus*.

Название маркерного локуса (SNP)	Хромосома	Локализация (сМ)	Аллельное состояние маркерного локуса	Устойчивые генотипы (шт.)	Встречаемость аллеля, ассоциированного с устойчивостью среди устойчивых образцов независимой выборки	Восприимчивые генотипы (шт.)	Встречаемость альтернативного аллеля среди восприимчивых образцов независимой выборки	Диагностическая эффективность
JHI-Hv50k-2016-33568	1Н	57.20	CC AA CA	6 5 -	55%	5 6 -	55 %	55%
JHI-Hv50k-2016-155569	3Н	12.11	GG AA GA	5 4 2	45%	10 0 1	91%	64%
JHI-Hv50k-2016-156842*	3Н	15.16	GG AA GA	3 8 -	73%	11 0 -	100%	86%
JHI-Hv50k-2016-156820*	3Н	15.16	TT AA TA	7 3 -	67%	2 8 1	72%	71%
JHI-Hv50k-2016-156833	3Н	15.16	TT AA TA	9 2 -	87%	4 6 -	55%	71%
JHI-Hv50k-2016-157070	3Н	17.35	GG CC GC	5 4 -	45%	11 0 -	100%	68%
JHI-Hv50k-2016-157182*	3Н	18.83	TT AA TA	7 3 -	67%	2 8 1	72%	68%
JHI-Hv50k-2016-156999*	3Н	18.83	CC AA AC	4 7 -	64%	11 0 -	100%	82%
JHI-Hv50k-2016-448898	7Н	11.54	TT CC TC	8 3 -	27%	11 0 -	100%	63%
JHI-Hv50k-2016-451269	7Н	13.88	AA TT TA	6 4 1	36%	8 3 -	73%	54%

Из 10 маркеров, ассоциированных с темно-бурой пятнистостью, 7 локализовались на хромосоме 3Н. Все они позволяли отличать аллели устойчивых и восприимчивых сортов. У четырех маркеров (три – на хромосоме 3Н и один – на хромосоме 7Н) наблюдалось 100% наличие аллеля, ассоциированного с восприимчивостью. Из отобранных четырех маркеров с 100% наличием таких аллелей наибольшую статистическую значимость (по Спирмену) по наличию альтернативного аллеля у устойчивых сортов показали два маркера JHI-Hv50k-2016-156999 ($R = -0.59$, $p < 0.05$) и JHI-Hv50k-2016-

156842 ($R = -0.72$, $p < 0.05$). Дополнительно были выбраны два маркера (JHI-Nv50k-2016-156820 и JHI-Nv50k-2016-157182) с высокой частотой встречаемости устойчивого/восприимчивого аллеля среди устойчивых/восприимчивых генотипов и высокой диагностической эффективностью. Коэффициент корреляции Спирмена для них составил: $R = -0.73$, $p < 0.05$ и $R = 0.43$, $p < 0.05$, что свидетельствует о наличии корреляции между маркерами и устойчивостью.

Среди других маркеров, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости, KASP-маркер на основе локуса JHI-Nv50k-2016-33568 (1H, позиция 57.2 cM) показал небольшую (55%) частоту встречаемости аллеля, ассоциированного с устойчивостью среди устойчивых образцов независимой выборки. Коэффициент корреляции Спирмена ($R = -0.17$, $p > 0.05$) указывает на отсутствие значимой корреляции между устойчивостью и ДНК-маркером. Но, возможно, данный маркер может быть эффективно использован как расоспецифичный при оценке устойчивости к определенным изолятам патогена. На хромосоме 7H оба маркера показали низкую частоту встречаемости ассоциированного с устойчивостью аллеля (27 и 36%) и, следовательно, не прошли валидацию, хотя коэффициент корреляции Спирмена показал отсутствие значимой корреляции только для одного маркера ($R = -0.48$, $p < 0.05$ и $R = -0.22$, $p > 0.05$).

Наиболее перспективные (отдельные) маркеры были выявлены на хромосоме 3H, однако было проверено, можно ли установить по значимым SNP из нескольких хромосом такие гаплотипы, с помощью которых можно было бы выявлять образцы с кумулятивным эффектом от нескольких локусов устойчивости, однако проведенное тестирование показало, что эффективнее всего вести отбор по SNP-маркерам хромосомы 3H (табл. 18).

Таблица 18. Процент устойчивых/восприимчивых генотипов независимой выборки, в которых одновременно присутствуют аллельные состояния маркеров, ассоциированные с устойчивостью/восприимчивостью. Клетки серого цвета обозначают, что данный маркер не учитывался.

Хр	Название маркерного локуса (SNP)	Аллельное состояние маркерного локуса, ассоциирующийся с устойчивостью	Процент устойчивых образцов независимой выборки в которых присутствуют совокупное аллельное состояние, ассоциированное с устойчивостью				Процент восприимчивых образцов независимой выборки в которых присутствуют совокупное аллельное состояние, ассоциированное с восприимчивостью			
			1	2	3	4	1	2	3	4
1Н	1Н_ЖНН-Нv50k-2016-33568	A:A								
3Н	3Н_ЖНН-Нv50k-2016-156820	T:T	55%	18%	27%	0%	73%	36%	73%	10%
	3Н_ЖНН-Нv50k-2016-156842	A:A								
	3Н_ЖНН-Нv50k-2016-156999	A:A								
	3Н_ЖНН-Нv50k-2016-157182	T:T								
7Н	7Н_ЖНН-Нv50k-2016-448898	C:C								
	7Н_ЖНН-Нv50k-2016-451269	T:T								

Мы проанализировали в каких генах локализуются валидированные маркеры. Было обнаружено, что маркер ЖНН-Нv50k-2016-156820 находится между последовательностями генов HORVU.MOREX.r3.3HG0225900 и HORVU.MOREX.r3.3HG0225910, кодирующих белки семейства F-box и семейства анкириновых повторов. Белки F-box являются одним из крупнейших суперсемейств белков, обнаруженных в растениях (Abd-Hamid et al., 2020). Анкирины – это внутриклеточные белки, участвующие в разнообразных клеточных функциях (Blanvillain et al., 2011). SNP ЖНН-Нv50k-2016-156842 находится в гене HORVU.MOREX.r3.3HG0225910, кодирующем анкириновые повторы. Маркер ЖНН-Нv50k-2016-156999 – в HORVU.MOREX.r3.3HG0226080, кодирующий фермент Aldose reductase, который является цитозольной НАДФН-зависимой оксидоредуктазой, катализирующей восстановление различных альдегидов и карбониллов, включая моносахариды. Этот фермент известен тем, что катализирует восстановление глюкозы до сорбита, первого этапа полиольного пути метаболизма глюкозы. Маркер ЖНН-Нv50k-2016-157182

оказался в межгенном пространстве, на расстоянии 707 пн от последовательности гена HORVU.MOREX.r3.3HG0226140, предположительно кодирующего белок теплового шока.

Выявленные ассоциации могут задействовать дальнейшие идентификации генов кандидатов, связанных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости.

3.6.2. Аллель-специфичный маркер к локусу JHI-Hv50k-2016-156999

Для четырех SNP, выбранных для использования в дальнейших селекционных программах, были разработаны аллель-специфичные маркеры. Маркеры 3H_JHI-Hv50k-2016-156820 (Т/С), 3H_JHI-Hv50k-2016-156842 (А/Г), 3H_JHI-Hv50k-2016-156999 (А/С), 3H_JHI-Hv50k-2016-157182 (А/Т) локализируются в интервале 15.1 – 18.8 сМ на хромосоме 3Н. Данный локус был выявлен по отношению ко всем исследуемым изолятам (рис. 25) и не зависел от статистической модели. Как надежный диагностический ПЦР-маркер проявил себя JHI-Hv50k-2016-156999.

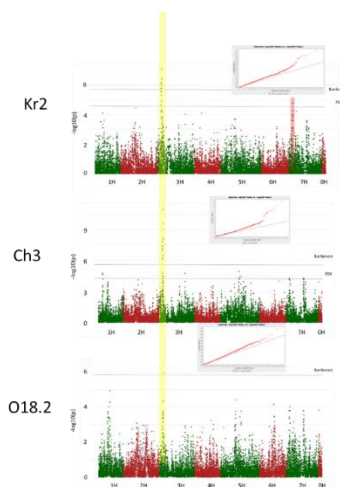


Рисунок 25. Локус устойчивости на третьей хромосоме по отношению ко всем исследуемым изолятам. Рисунок приведен для модели GLM + PCA.

Далее геномная ДНК всех 94 сортов была проверена с помощью предлагаемого ДНК-маркера JHI-Hv50k-2016-156999. На рисунке 26 видны различия по наличию/отсутствию ампликона. Наличие фрагмента ДНК, длиной ~200 пн указывает на присутствие аллеля А в геноме сорта ячменя, тогда как отсутствие фрагмента ДНК на электрофорезе указывает на присутствие альтернативного аллеля С (рис. 27). Данные ПЦР совпадают с данными полученными по генотипированию на чипе Barley 50 K Illumina Infinium iSELECT (см. Доп. табл. 6).

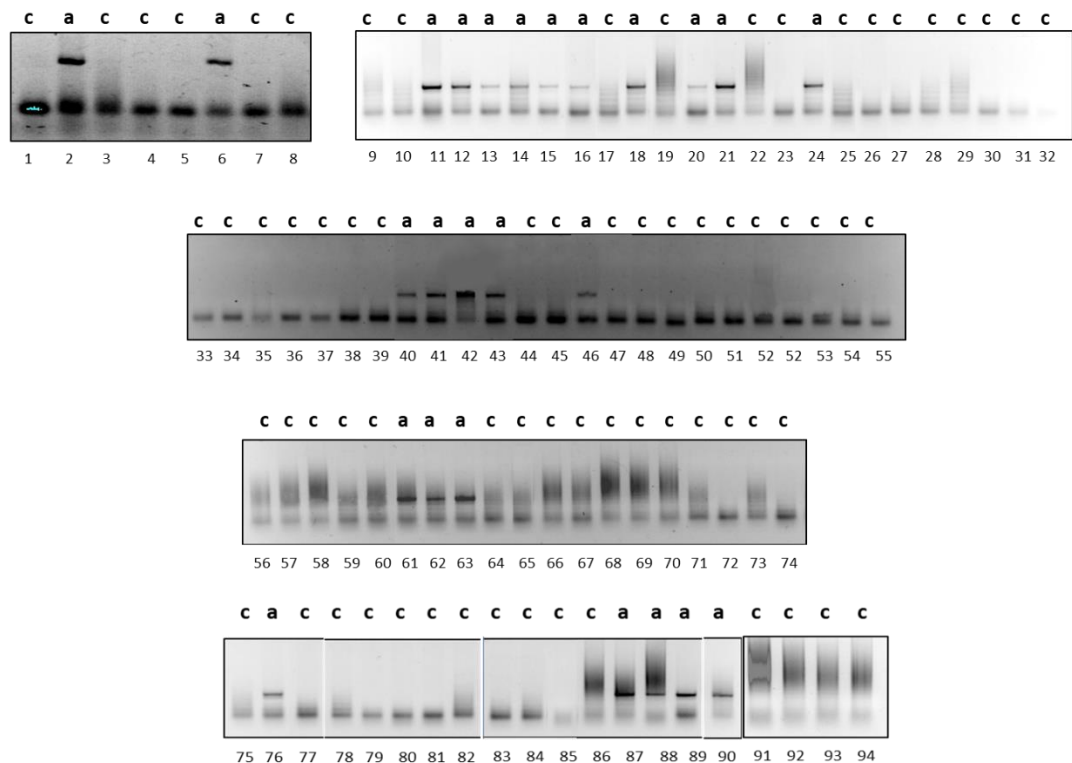


Рисунок 26. Результаты для ПЦР-анализа маркера JHI-Hv50k-2016-156999 с геномной ДНК исследуемой коллекции.

Примечание: 1. Г-19951, 2. Г-19980, 3. Авалон, 4. Норд 112412, 5. Мелиус, 6. Мерит 57, 7. AC 0760258, 8. Татум, 9. Г-21038, 10. Г-21671, 11. Биом, 12. Танай, 13. Талан, 14. Г-21219, 15. Jngve, 16. Виконт, 17. Саша, 18. Ворсинский 2, 19. Золотник, 20. Алей, 21. Арна, 22. Сымбат, 23. Голозер. 1, 24. Омский голозерный 2, 25. Омский голозерный 1, 26. Abyssinia, 27. Местный (Дагестан), 28. Местный (Эфиопия), 29. Алаг-Эрд-Эне, 30. Оскар, 31. Арчекас, 32. Мутант

Винер(а), 33. Линия 1285, 34. Линия 1, 35. Отбор Туал, 36. Рейд, 37. Лиман III, 38. Ача, 39. Таганай, 40. Обской, 41. Сигнал, 42. Светик, 43. Омский 85, 44. Мутант 68, 45. зерноградский 86, 46. Северный, 47. № 259/528, 48. Никита, 49. Brodyole, 50. Символ, 51. Гранал, 52. Крымчак 55, 53. Выбор, 54. Винер, 55. Славянский, 56. Челябинск. 70, 57. Маяк, 58. Агул, 59. Паллидум 394, 60. Белогорский, 61. Местный (Якутия), 62. Заларинец, 63. Местный (Приморский край), 64. Тарский 1, 65. Алтан-Булаг, 66. Московский 121, 67. Омский 13709, 68. Л-421, 69. Курьер, 70. Оренбургский кормовой, 71. Носовский 11, 72. Красноярский 1, 73. Импульс, 74. Маныч 459, 75. Безенчукский 2, 76. Кедр, 77. Темп, 78. Добрый, 79. Приекульский 14, 80. Нарымчанин, 81. Бархатный, 82. Медикум, 83. Wial, 84. Анна, 85. Баган, 86. Алын-Буя, 87. Колчан, 88. Новосибирский 80, 89. В-1, 90. Соболек, 91. Емеля, 92. Красноярский 91, 93. Нутанс 970, 94. Донецкий 8.

При сравнении с выделенными группами устойчивых и восприимчивых сортов, полученными в результате PLS анализа, ДНК-маркер JH1-Hv50k-2016-156999 показал, что в 7 сортах из 8 устойчивых было обнаружено присутствие аллеля А, что соответствует 87,5% встречаемости аллеля и в 26 сортах из 30 восприимчивых было обнаружено присутствие аллеля С, что соответствует 87% встречаемости альтернативного аллеля. Диагностическая эффективность маркера составила 86%. Расчет коэффициента корреляции Спирмена ($R = -0.66$, $p < 0.05$) подтвердил, что данный маркер значимо коррелирует с устойчивостью к темно-бурой пятнистости.

Валидация маркера была проведена на независимой выборке, состоявшей из 21 сорта, описания которых представлены в таблице 2. Результаты ПЦР показали (рис. 27), что во всех 10 восприимчивых сортах присутствует аллель С и в 7 из 11 (64%) устойчивых сортов присутствует аллель А.

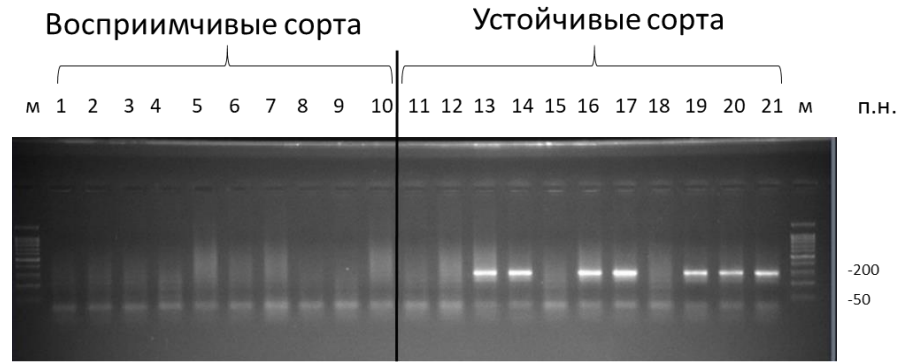


Рисунок 27. Результаты ПЦР-анализа маркера JHI-Hv50k-2016-156999. Примечание: 1. К-15431, 2. К-18506, 3. К-18614, 4. К-18973, 5. К-21799, 6. К-27346, 7. К-27650, 8. К-28674, 9. К-30292, 10. К-30311, 11. К-11025, 12. К-17262, 13. К-18523, 14. К-29192, 15. К-30029, 16. К-30035, 17. К-30408, 18. К-30741, 19. CI 11531, 20. К-29576, 21. К-26959.

Полученные данные доказывают, что заявляемый ДНК-маркер позволяет с вести отбор, исключая растения, обладающие меньшей устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости, и с относительно высокой (для количественного признака) точностью отбирая устойчивые.

Для применения диагностического маркера JHI-Hv50k-2016-156999 с целью выбора пользователем того или иного способа установления аллельного состояния соответствующего SNP-локуса был протестирован альтернативный подход, основанный на KASP-анализе. Все сортообразцы, сравненные друг с другом по локусу маркера JHI-Hv50k-2016-156999 соответствуют друг другу при ПЦР и KASP-анализе (табл. 19). Таким образом, на выбор предложены и валидированы 2 альтернативных способа детекции.

Таблица 19. Данные по аллельному состоянию маркера JHI-Hv50k-2016-156999, полученные с помощью KASP-генотипирования и ПЦР.

№ сорта	Кат номер ВИР	Аллельное состояние, полученное:		Тип восприимчивости генотипа
		при KASP- анализе	при обычном ПЦР	
1	К-15431	С:С	С:С	Восприимчивые
2	К-18506	С:С	С:С	Восприимчивые
3	К-18614	С:С	С:С	Восприимчивые
4	К-18973	С:С	С:С	Восприимчивые
5	К-21799	С:С	С:С	Восприимчивые
6	К-27346	С:С	С:С	Восприимчивые
7	К-27650	С:С	С:С	Восприимчивые
8	К-28674	С:С	С:С	Восприимчивые
9	К-30292	С:С	С:С	Восприимчивые
10	К-30311	С:С	С:С	Восприимчивые
10-а	К-30491	А:А	---	Восприимчивые
11	К-11025	С:С	С:С	Устойчивые
12	К-17262	С:С	С:С	Устойчивые
13	К-18523	А:А	А:А	Устойчивые
14	К-29192	А:А	А:А	Устойчивые
15	К-30029	С:С	С:С	Устойчивые
16	К-30035	А:А	А:А	Устойчивые
17	К-30408	А:А	А:А	Устойчивые
18	К-30741	С:С	С:С	Устойчивые
19	СІ 11531	А:А	А:А	Устойчивые
20	К-29576	А:А	А:А	Устойчивые
21	К-26959	А:А	А:А	Устойчивые

3.6.3. KASP-маркеры устойчивости к возбудителю сетчатой пятнистости

На основе данных полногеномного анализа ассоциаций (Rozanova et al., 2019) были выбраны 4 SNP, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres* на хромосомах 2Н (интервал 71.0 – 74.1 сМ), 3Н (50.9 – 54.8 сМ) и 6Н (52.6 – 55.4 сМ) (табл. 20).

Таблица 20. KASP маркеры для сетчатой пятнистости.

Название маркерного локуса (SNP)	Хр	Локализация на физической карте (пн)	Локализация на генетической карте (сМ)	Последовательность, содержащая SNP.
JHI-Hv50k-2016-104859	2Н	560662266	71.0-74.1	СТААААТАТТТCAAАТТТGCAACGTTGCAA АТАСААТАСАТGAAAGАТАС[G/A]САТАСG ТАGАСАТGТАGAAАСТАСААСAGТАAGТАА СТСТАСGАСGТССС
JHI-Hv50k-2016-169338	3Н	189518077	51.0-52.2	АТGGGAGТТGАAGGAGAGТАТGААССАСТC AGСAAАТGСАСТGСАТАААА[G/A]СGСАТG ТGТGСАТGСАТGТААССААТАGAGAAААТА AGТАGТАТАААТТА
JHI-Hv50k-2016-183207	3Н	442203921		ТТGССАССAAАAGТGСТТGAGТТGАСАТ GТТТАТАТАТТGТТСТСGСС[A/T]АСТТGСТC СAGСАТТТGСАТАААТААТСТGТАААСAGСТ СGGАСАСТТСТТ
JHI-Hv50k-2016-398663	6Н	352113517	58.91	ТСGТАТТАСAGТСТТАGСТАGGСТТАСGGТТ АСAGGGGAAАAGСАСАСАТ[C/T]GTGTGGC ТСТТТААААСАААААAGGAAGТТGTСТААС АСТАGТТТАТССТ

KASP-генотипирование было проведено на независимой выборке, состоявшей из 102 сортов (см. Доп. табл. 2). Большинство (49) устойчивых сортов из исследуемой независимой выборки несли в себе локусы устойчивости в хромосоме 3Н. Локусами устойчивости, расположенными на хромосоме 6Н, обладали 46 из 52 представленных устойчивых сортов.

Все четыре маркера были также исследованы на 11 дигиплоидных линиях, полученных от скрещивания сорта CI 5791, несущего устойчивость по хромосоме 6Н и восприимчивого сорта Harrington: CI 5791x Harrington (табл. 21).

Таблица 21. Результаты KASP-генотипирования образцов ячменя с помощью разработанных SNP-маркеров, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres*.

Название маркерного локуса (SNP)	Хромосома	Локализация (сМ)	Аллельное состояние маркерного локуса	Устойчивые генотипы (шт.)	Встречаемость аллеля, ассоциированного с устойчивостью среди устойчивых образцов независимой выборки	Восприимчивые генотипы (шт.)	Встречаемость аллеля, ассоциированного с восприимчивостью среди восприимчивых образцов независимой выборки	Диагностическая эффективность
На независимой выборке, состоящей из 102 образцов ячменя, контрастных по устойчивости								
JHI-Hv50k-2016-398663	6H	54.89	TT CC CT	32 15 -	36%	40 11 -	79%	43%
JHI-Hv50k-2016-183207	3H	52.6	TT AA TA	44 5 1	84%	10 38 1	73%	82%
JHI-Hv50k-2016-169338	3H	51.20	AA GG GA	4 16 31	8%	11 19 19	36%	27%
JHI-Hv50k-2016-104859	2H	72.59	AA GG AG	30 21 -	40%	43 8 -	85%	63%
На независимой выборке, состоящей из 11 дигаплоидных рекомбинантных линий от скрещивания сорта CI 5791, несущего локус устойчивости в хромосоме 6H и восприимчивого сорта Harrington								
JHI-Hv50k-2016-398663	6H	54.89	TT CC CT	0 5 -	100%	6 0 -	100%	100%
JHI-Hv50k-2016-183207	3H	52.6	TT AA TA	0 5 -	100%	3 3 -	50%	72%
JHI-Hv50k-2016-169338	3H	51.20	AA GG GA	2 0 3	0%	3 0 3	50%	27%
JHI-Hv50k-2016-104859	2H	72.59	AA GG AG	5 0 -	0%	6 0 -	100%	54%

Маркер JHI-Hv50k-2016-398663 (хромосома 6H, позиция 54.89 сМ) не показал себя как диагностический на независимой выборке, состоящей из 102 контрастных по устойчивости сортообразцов ячменя ($R = -0.12$, $p > 0$). Однако в потомстве от скрещивания CI 5791/ Harrington, 100% устойчивых генотипов несли аллель локуса JHI-Hv50k-2016-398663, ассоциированный с устойчивостью, и 100% восприимчивых – альтернативный аллель. Расчет коэффициента корреляции Спирмена ($R = -0.87$, $p < 0.05$) показал, что наблюдается значимая корреляция между маркером и устойчивостью. Маркер JHI-Hv50k-2016-398663

может быть рекомендован для отбора носителей локуса устойчивости в хромосоме 6Н.

Маркер JHI-Hv50k-2016-183207 (хромосома 3Н, позиция 52.6 сМ) показал дифференциацию аллелей на устойчивых и восприимчивых сортах, статистические значения были высокими ($R = -0.5$, $p < 0.05$). Однако на дигаплоидных линиях процент предсказания нуклеотида в восприимчивых образцах составил 50%. Это объяснялось тем, что изменчивость дигаплоидных линий по устойчивости обусловлена только локусом в хромосоме 6Н. Коэффициент корреляции Спирмена показал наличие значимой корреляции между ДНК-маркером и устойчивостью ($R = -0.72$, $p < 0.05$). Этот маркер может быть рекомендован для отбора носителей локуса устойчивости в хромосоме 3Н.

Значимой корреляции между вторым маркером на хромосоме 3Н, JHI-Hv50k-2016-169338 (51.20 сМ) и устойчивостью обнаружено не было ни на независимой выборке ($R = -0.14$, $p > 0.05$), ни на дигаплоидных линиях ($R = 0.12$, $p > 0.05$). Использование данного маркера для поиска устойчивых образцов нецелесообразно.

Маркер JHI-Hv50k-2016-104859 (хромосома 2Н, позиция 72.59 сМ) показал практически одинаковую частоту аллелей в группах устойчивых и восприимчивых сортов ($R = -0.2$, $p < 0.05$), и следовательно, как диагностический маркер использоваться не может. При исследовании дигаплоидных линий у всех линий наблюдался только один генотип ($R = -0.22$, $p < 0.05$).

При рассмотрении связи валидированных маркеров с генами было обнаружено, что маркер JHI-Hv50k-2016-398663 (хромосома 6Н) локализуется в последовательности гена BART1_0-u45275. Данный ген был выявлен биоинформатическим путем, однако не был подтверждён с помощью экспериментальных методов, функция неизвестна. Маркер JHI-Hv50k-2016-183207 (хромосома 3Н) находится в гене HORVU.MOREX.r3.3HG0281340,

кодирующем протеинкиназу, обладающую рецепторными свойствами (Receptor-like protein kinase). Эти белки участвуют в регуляции процессов развития растений и в ответе на абиотический стресс (Ye et al., 2017).

Выявленные ассоциации могут задействовать дальнейшие идентификации генов кандидатов, связанных с устойчивостью к сетчатой пятнистости.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Устойчивость сибирских сортов ярового ячменя к болезням, вызываемым гембиотрофными грибами

Cochliobolus sativus (вызывающий у ячменя темно-бурую пятнистость и корневые гнили) и *Pyrenophora teres* (вызывающий сетчатую пятнистость) относятся к гембиотрофным грибам – возбудителям основных трех болезней, поражающих ячмень в различных регионах Российской Федерации, в том числе в условиях Сибири. В работах, охватывающих мировое и локальное генетическое разнообразие ячменя, и направленных на выявление сортов, устойчивых к данным заболеваниям, не были ранее представлены сорта ярового ячменя, создаваемые или используемые в селекционных программах в сибирских селекционных центрах (см. главу 1.5).

В нашей работе, нацеленной на выявление локусов, ассоциированных с устойчивостью к перечисленным болезням, впервые была проведена фитопатологическая оценка сибирских сортов ячменя и впервые установлена представленность в сибирском сортименте устойчивых форм, в том числе и к нескольким патогенам.

Среди всех исследуемых образцов четыре оказались устойчивыми ко всем четырем изолятам *P. teres* (Алаг-Эрд-Эне, Линия 259/528, Омский 13709, Омский голозерный 2) и четыре (Алей, Алтан-Булаг, Местный (Приморский край), Кедр) – к трем из четырех изолятов *P. teres*. Устойчивость ко всем изолятам *C. sativus* была выявлена для двух сортов (Алей и Колчан), причем устойчивость проявлялась как в отношении темно-бурой пятнистости, так к корневым гнилям. Семь генотипов (В-1, Г-21219, Мутант 68, Омский голозерный 2, Светик, Северный, Сигнал) оказались устойчивыми ко всем трем изолятам при заражении

возбудителем темно-бурой пятнистости, однако не проявили устойчивость к корневым гнилям.

Выявленная изменчивость по устойчивости позволила в дальнейшем провести генетический анализ с использованием данных фено- и генотипирования с целью выявить и маркировать локусы устойчивости.

4.2. Ассоциация «маркер-признак» в современных исследованиях по количественной генетике устойчивости ячменя к грибным болезням

Болезни растений являются одним из важнейших факторов, ограничивающих получение качественного и высокого урожая сельскохозяйственных растений. Несмотря на применение фунгицидов, для многих болезней, в число которых входят темно-бурая и сетчатая пятнистости, существует вероятность возникновения эпифитотий. В настоящее время в мире и в России программы сельского хозяйства направлены на развитие безопасных экологических технологий, которые основываются на выведении сортов устойчивых к болезням, что является эффективным средством контроля заболевания.

Разрабатываемые в ведущих селекционных учреждениях технологии возделывания сортов базируются на подходах, основанных на применении ДНК-маркеров. Процесс подразумевает поиск локуса (ДНК-маркера) в геноме культуры, изменения в котором влияют на устойчивость/восприимчивость к патогену у растения.

Поиск и выявление генов и локусов, ассоциированных с устойчивостью к болезням, началось с картирования популяций (QTL-анализа) – подхода, основанного на скрещивании контрастных по признаку родителей и изучению их потомства. Разработка маркеров в прошлом занимала много времени. В

последнее время широкую популярность приобрел метод GWAS, который позволяет вместо создаваемых двуродительских популяций применять выборки образцов коллекций, охватывая большее генетическое разнообразие. Разработке маркеров с последующим применением их в селекционных программах способствует развитие в настоящее время доступных эффективных систем высокопроизводительного генотипирования, и наличие референсного генома ячменя (Mascher et al., 2017).

4.2.1. Устойчивость к *C. sativus*

Выявление локусов устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости важно для создания новых сортов ячменя. Это особенно актуально в связи с тем, что появились новые патотипы *C. sativus*, которые обладают высокой вирулентностью по отношению к доступным в настоящее время источникам устойчивости (Ghazvini, Tekauz, 2007; Gyawali, 2010). К настоящему моменту на карту нанесены три основных локуса, ассоциированных с устойчивостью к воздействию данного патогена, а именно *Rcs6/Scs6*, *Rbs7* и *Rcs5*, расположенные на хромосомах 1Н, 6Н и 7Н, соответственно (Steffenson et al., 1996; Drader et al., 2009; Leng et al., 2018; Wang et al., 2019). Кроме того, несколько минорных QTL были идентифицированы на всех семи хромосомах ячменя (Steffenson et al., 1996; Bilgic et al., 2005, 2006; Roy et al., 2010; Bovill et al., 2010; Grewal, Rossnagel and Scoles, 2012; Berger et al., 2013; Zhou and Steffenson, 2013; Gutiérrez et al., 2015; Haas et al., 2016; Wang et al., 2017; Выкова et al., 2017; Gyawali et al., 2018; Novakazi et al., 2019a). В настоящее время ведутся работы по разрабатыванию SNP-маркеров на основе выявленных QTL (Afanasenko et al., 2022).

В данном исследовании обнаружено 49 SNP в пяти геномных районах на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н, и 7Н.

Данные, полученные нами, были сопоставлены с литературными данными (табл. 22) и было выявлено, что локусы, обнаруженные на хромосомах 1Н, 2Н и

3Н, совпадают с ранее описанными локусами устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости. Локусы, обнаруженные нами на хромосоме 7Н не совпадают с известными локусами устойчивости. В таблице указаны SNP, наиболее значимо ассоциируемые с выявленными районами устойчивости из обнаруженных в данной работе. Все литературные данные были соотнесены с используемыми в нашей работе генетическими картами (Mascher et al., 2013, Mascher et al., 2017)

Таблица 22. Сравнение выявленных геномных районов, ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости, с литературными данными.

Хромосома	Изолят	Название маркерного локуса (SNP)	<i>p</i> -value	cM	Ранее идентифицированные локусы QTL (cM)
1Н	Ch3	JHI-Hv50k-2016-17526	1.05*10 ^{-7*}	41.5-42.35	(41.5 cM) (Afanasenko et al., 2015); (45.5-50.0 cM) (Gutiérrez et al., 2013); 40.08-43.06 (Zhou and Steffenson, 2013))
		SCRI_RS_153785	8.64*10 ^{-8*}		
		BOPA2_5381-1950	6.63*10 ^{-8*}		
		SCRI_RS_140837	6.74*10 ^{-8*}		
		JHI-Hv50k-2016-17967	4.21*10 ^{-7*}		
		JHI-Hv50k-2016-18133	1.41*10 ^{-6*}		
	Kr2	JHI-Hv50k-2016-33568	1.29*10 ^{-6*}	57.29	(65.8 cM) (Bilgic et al., 2005); (59.7 cM) (Roy et al., 2010);
2Н	Ch3	BOPA1_3355-605	1.19*10 ^{-7*}	58.78-59.46	(54.2 cM) (Afanasenko et al., 2015) (21.2 и 71.7 cM) (Bilgic et al., 2005)
		SCRI_RS_153880	1.19*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_206529	1.19*10 ^{-7*}		
		BOPA2_12_11504	1.19*10 ^{-7*}		
		BOPA2_12_30108	1.19*10 ^{-7*}		
		JHI-Hv50k-2016-98667	1.19*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_141789	1.19*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_83731	1.84*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_162917	1.84*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_233449	1.84*10 ^{-7*}		
		SCRI_RS_186769	1.35*10 ^{-6*}		
		BOPA1_2634-2228	1.35*10 ^{-6*}		

Продолжение таблицы 22.

Хромо сома	Изолят	Название маркерного локуса (SNP)	<i>p</i> -value	сМ	Ранее идентифицированные локусы QTL (сМ)
2Н	Ch3	BOPA1_5160-268	1.35*10 ^{-6**}	58.78-	
		SCRI_RS_132839	1.35*10 ^{-6**}		
		SCRI_RS_136740	1.35*10 ^{-6**}	59.46	
		SCRI_RS_191136	1.35*10 ^{-6**}		
3Н	Ch3	JHI-Hv50k-2016-157070	1.16*10 ^{-11*}	12.11, 15.16, 17.35- 18.8	(53.6 – 61.2 сМ - локус устойчивости взрослых растений) (Bovill et al., 2010); (9.6 сМ - локус устойчивости для проростков); (14.87 – 15.30 сМ – локус устойчивости для взрослых растений) (Zhou and Steffenson, 2013); (28.7 – 42.4 сМ) (Bilgic et al. 2005); (25.3 сМ и 66.2 сМ) (Wang et al., 2017);
		JHI-Hv50k-2016-156842	3.3*10 ^{-11*}		
		JHI-Hv50k-2016-156999	2.67*10 ^{-10*}		
		JHI-Hv50k-2016-156329	3.36*10 ^{-8**}		
		JHI-Hv50k-2016-157182	6.54*10 ^{-9*}		
		JHI-Hv50k-2016-156387	3.88*10 ^{-8**}		
		JHI-Hv50k-2016-156336	7.10*10 ^{-8**}		
		JHI-Hv50k-2016-156833	2.88*10 ^{-7*}		
		JHI-Hv50k-2016-155569	7.25*10 ^{-7*}		
	JHI-Hv50k-2016-158003	1.56*10 ^{-8**}			
	Kr2	JHI-Hv50k-2016-157070	6.04*10 ^{-6*}		
JHI-Hv50k-2016-156842		1.20*10 ^{-6**}			
7Н	Ch3	JHI-Hv50k-2016-448898	5.01*10 ^{-5**}	11.54- 13.88	(23.73 – 24.15 сМ – локус устойчивости проростков); (27.62 сМ – локус устойчивости для взрослых растений) (Gyawali et al., 2018) 29.75 (Bilgic et al., 2005)
	O18.2	JHI-Hv50k-2016-451269	1.67*10 ^{-5**}		

*Значимые SNP соответствующие поправке Бонферрони, ** - SNP предполагаемого уровня.

На хромосоме 1Н нами было выявлено восемь маркеров, которые локализуются в двух областях: 32,1*10⁶-36,9*10⁶ пн и 446,8*10⁶ пн, что соответствует районам 41.5-42.35 сМ и 57.29 сМ на молекулярно-генетической карте (Mascher et al., 2017) соответственно (табл. 5).

При сравнении с литературными данными локус, выявленный нами в интервале 41.5-42.35 сМ, совпадает с обнаруженными в работах Афанасенко с соавторами в 2015 (41.5 сМ) и располагается рядом с обнаруженными Gutierrez с

коллегами в 2013 (45.5-50.0 сМ) (табл. 22). Ко второму локусу, идентифицированному в интервале 57.3 сМ (табл. 5), наиболее близко расположены локусы, обнаруженные в следующих исследованиях: QTL, ответственный за устойчивость взрослых растений в позиции 65.8 сМ (Steffenson et al., 1996), и локус, ответственный за устойчивость проростков, обнаруженный Roy с соавторами в 2010 в позиции 59.7 сМ (Roy et al., 2010). По сравнению с предыдущими работами, мы выявили более точное положение локуса устойчивости, что будет содействовать ускорению поиска гена-кандидата для него.

Bilgic с коллегами (Bilgic et al., 2006) идентифицировали область на коротком плече хромосомы 1Н, ассоциированную с устойчивостью проростков и взрослых растений к патотипу 2 темно-бурой пятнистости в популяции ДН Calicuchima-sib × Bowman-BC(C/B). Авторами было показано, что устойчивости растений способствовал резистентный родитель Calicuchima-sib, который нес в себе ген, названный *Rcs 6*. В более недавнем исследовании (Leng et al., 2018), используя ту же популяцию ДН, удалось показать, что восприимчивый родительский сорт Bowman содержал ген доминантной восприимчивости, *Scs 6*, который находился в том же локусе, что и ген устойчивости *Rcs 6*. Дальнейшее более точное картирование в популяции F2 Bowman × ND 5883 и Bowman × ND B112 сузили интервал до области в $128 \cdot 10^6$ пн, физически расположенной между $64 \cdot 10^6$ и $192 \cdot 10^6$ пн (Leng et al., 2018). Локусы, обнаруженные в данной работе, имеют локализацию на физической карте $32 - 38 \cdot 10^6$ пн и $418 \cdot 10^6$ пн. Таким образом, локусы, обнаруженные в нашем исследовании, не соответствуют локусу устойчивости / восприимчивости *Rcs 6* / *Scs 6*.

Маркер JHI-Hv50k-2016-33568 (57.29 сМ, хромосома 1Н) был выбран и проверен далее как диагностический при последующем KASP генотипировании на независимой выборке. Коэффициент корреляции Спирмена показал отсутствие

значимой корреляции между устойчивостью и маркером ($R = -0.17$, $p > 0.05$). Использование данного маркера для поиска устойчивых образцов нецелесообразно.

Район 58.78-59.46 сМ хромосомы 2Н, выявленный в данном исследовании, показывал устойчивость к изолятам Ch3 и O18.2 (табл. 5, рис. 17а,б). Девять маркеров ассоциировались с устойчивостью к изоляту Ch3. Локус, выявленный по отношению к изоляту O18.2, содержал 52 маркера (рис. 17б), включая и те девять, ассоциированных с устойчивостью к Ch3. Далее использовались только те SNP, которые были выявлены одновременно для обоих изолятов. Bilgic в 2005 году (Bilgic et al., 2005) выявил локус на хромосоме 2Н в интервале 27.1–46.9 сМ (маркеры: Rbcs–ABG459), используя картирующую популяцию Steptoe / Morex (R). Позднее Афанасенко с соавторами в 2015 (Afanasenko et al., 2015) был выявлен QTL в позиции 54.2 сМ по положению на карте iSelect путем анализа карт двуродительских популяций, полученных скрещиванием Зерноградский 85 (R)/Ранний 1. Таким образом, выявленные нами SNP совпадали с ранее обнаруженным локусом. Однако для дальнейшей валидации отобранные не были, так как PLS анализ позволил выделить в изучаемой выборке группы устойчивых и восприимчивых сортов (рис. 21, табл. 9), и маркеры к локусу на хромосоме 2Н не дифференцировались по данным группам. Также ассоциация с маркером SCRI_RS_152664, который находится в позиции 164.4 сМ, выявленная Wang с соавторами (Wang et al., 2017), не подтвердилась ни в нашей работе, ни в работах остальных исследователей.

В текущем исследовании геномные участки на хромосоме 3Н с наиболее значимыми SNP были обнаружены в позициях: 12.11, 15.01, 16.5, 17.35 и 18.8 сМ. Мы предполагаем, что это один геномный локус. Всего было выявлено 22 маркера в интервале от 12 322 177 пн до 15 617 068 пн. Маркер JHI-Hv50k-2016-

157070, находящийся на позиции 14 237 637 пн, ассоциируется с устойчивостью ко всем трем исследуемым изолятам (табл. 5) и он единственный, который был ассоциирован с устойчивостью к изоляту Kr2. По отношению к изоляту Ch3 был выявлен 21 маркер и по отношению к изоляту O18.2 – 12 маркеров. Ранее несколькими исследователями сообщалось о локусе устойчивости, который объясняет фенотипические различия между 1% и 60%, выявленном рядом с данным районом: Zhou с соавторами в 2013 году в положении 9.6 сМ (Вора_12_30818) выявил локус устойчивости для проростков и в интервале 14.87–15.30 сМ – локус устойчивости для взрослых растений (Zhou, Steffenson, 2013); также локус устойчивости для проростков был обнаружен в интервале 24.9–31.1 сМ (Grewal et al., 2012); Wang с соавторами выявил две области на хромосоме 3Н, ассоциированные с разными изолятами, одна из которых находится в положении 25.3 сМ. Данные работы были проанализированы для генотипов из США и Канады. В настоящем исследовании основу выборки составили сорта, созданные в селекционных центрах Сибирского федерального округа. Второй локус, выявленный Wang к другому изоляту, находится в положении 66.2 сМ (Wang et al., 2017). Bovill выявил QTL устойчивости для взрослых растений в интервале 53.6–61.2 сМ (Bovill et al., 2010). В нашем исследовании значимых SNP в этих локусах не обнаружено. В нашей работе локус, выявленный на хромосоме 3Н, является самым значимым и был сцеплен с устойчивостью по отношению ко всем изолятам вне зависимости от выбранной статистической модели. Из выявленных с помощью GWAS маркеров на хромосоме 3Н (Букова et al., 2017) было выбрано семь для KASP-генотипирования, и валидация на независимой выборке показала, что четыре (JHI-Hv50k-2016-157182, JHI-Hv50k-2016-156820, JHI-Hv50k-2016-156842, JHI-Hv50k-2016-156999) можно использовать для проведения селекционных работ (Rozanova et al., 2020). Маркер JHI-Hv50k-2016-156999 хорошо показал себя как

диагностический ПЦР-маркер (рис. 26, 27, табл. 19) и был запатентован (патент №2740404 от 14.01.2021, заявка №2020120776 от 16.06.2020).

Мы обнаружили геномный район, идентифицированный в хромосоме 7Н в области 11.54 – 13.88 сМ. Этот район включает в себя два маркера: JHI-Hv50k-2016-448898 – 14 372 276 пн (11,54 сМ) и JHI-Hv50k-2016-451269 – 17 358 749 пн (13.88 сМ) (табл. 5, 15). Steffenson с соавторами идентифицировали локус устойчивости проростков на хромосоме 7Н (Steffenson et al., 1996), которые они обозначили как *Rcs 5*. В последующих работах Bilgic et al., (2005), Yun et al., (2006) и Bovill et al. (2010) продемонстрировали статистическую значимость локусов устойчивости, совмещенных с *Rcs5*. Drader с коллегами в 2009 году картировали приблизительное положение *Rcs5* на 1,5 сМ проксимальнее маркера BF263248 ($27.8 \cdot 10^6$ пн) и на 1.3 сМ дистальнее BG414713 ($31.3 \cdot 10^6$ пн) (Drader et al., 2009).

Roy с соавторами выявили QTL (*Rcs-qt1-7H-bPb-4584*) в позиции 28.3 сМ, который совпадает с основным эффектом локуса устойчивости *Rcs5* и находится между $20 \cdot 10^6$ пн и $22.8 \cdot 10^6$ пн (Roy et al., 2010). Drader с соавторами (2009) выдвинули гипотезу, что ген, несущий устойчивость к возбудителю темно-бурой пятнистости на хромосоме 7Н у ячменя схож или даже тот же самый, что и у пшеницы. Эта гипотеза была подтверждена Ayana (Ayana et al., 2018), который провел GWAS с 294 образцами озимой твердой пшеницы и идентифицировал значимый QTL (*Q_{Sb.sdsu-7B.1}*) на хромосоме 7В пшеницы, соответствующий устойчивости QTL *Rcs5* у ячменя. В работе Berger et al. (2013) был выявлен локус, расположенный на хромосоме 7Н в диапазоне от $22 \cdot 10^6$ до $31 \cdot 10^6$ пн, значимо ассоциированный с устойчивостью проростков. Zhou и Steffenson (2013) продемонстрировали с помощью GWAS, что район, расположенный на $26-32 \cdot 10^6$ пн, ассоциирован как с проростковой, так и взрослой устойчивостью. Gyawali с

соавторами (2018) определили область, ассоциированную с устойчивостью проростков и взрослых растений, расположенную на хромосоме 7Н в интервале 26–27*10⁶ пн (Gyawali et al., 2018). Лocus, расположенный на хромосоме 7Н, выявленный в нашей работе, находится между 14.3*10⁶ и 17.4*10⁶ пн.

Выявленные на хромосоме 7Н маркеры были выбраны для проведения KASP-анализа, хотя по уровню значимости они относятся к «предполагаемому». Мы предположили, что обнаруженные нами маркеры могут быть сцепленными с геном устойчивости *Rcs5*, о котором говорилось выше. Однако, оба исследуемых маркера (JHI-Hv50k-2016-448898 и JHI-Hv50k-2016-451269) показали низкую статистическую значимость по Спирмену ($R = -0.48, p > 0.05$ и $R = -0.22, p > 0.05$) и низкую предсказательную ценность и, соответственно, не могут рекомендоваться в качестве диагностических.

С помощью метода GWAS мы обнаружили локусы устойчивости на 1Н, 2Н, 3Н, и 7Н хромосомах, а при использовании PLS анализа – на 2Н, 3Н и 7Н. В целом, если мы оцениваем результаты ассоциативного анализа (GWAS и PLS), то видно, что наибольшая значимость ассоциирована с хромосомой 3Н независимо от изолята (рис. 23).

Три статистические модели были применены в отношении показателей устойчивости к темно-бурой пятнистости для выявления значимых SNP, включая подходы как GLM (обобщенная линейная модель), так и MLM (смешанная линейная модель). MLM является более строгой моделью по сравнению с GLM и позволяет учитывать в анализе как фиксированные, так и случайные эффекты. То есть в нашем случае, если модель GLM рассматривает ассоциацию генотип-фенотип, упуская влияние окружающей среды, то модель MLM учитывает эту последнюю компоненту. Во всех случаях, если опираться только на самую строгую модель (MLM), то выявляется лишь один locus на хромосоме 3Н.

Несмотря на то, что мы выбрали 10 потенциальных маркеров для KASP-генотипирования, находящихся на хромосомах 1Н, 3Н, и 7Н, свою значимость как перспективные однозначно показали только маркеры на хромосоме 3Н, которые и были изначально обнаружены с использованием наиболее жесткой статистической модели. Возможно другие маркеры могут быть использованы для обнаружения минорных локусов, ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости.

Помимо болезни темно-бурая пятнистость патоген *C. sativus* вызывает заболевание корневая гниль. Поиск локусов устойчивости также проводился с помощью метода GWAS, однако значимых SNP обнаружено не было. В данной работе был проведен корреляционный анализ (по Пирсону) для сравнения оценок устойчивости к болезням темно-бурая пятнистость и корневые гнили. Корреляция варьировалась от 0,22 до 0,25, что объясняет 6% изменчивости. Соответственно за 94% отвечают неизвестные факторы. В работах (Kutcher et al., 1994; Almgren et al., 1999) не было выявлено значимой корреляции между оценкой темно-бурой пятнистости листьев и корневыми гнилями. В работе Clark (1966) было показано, что все потомки исследуемых линий от межвидового скрещивания ячменя были восприимчивы к *C. sativus*, как к возбудителю темно-бурой пятнистости, но имели широкий спектр реакций на этот грибок, как на возбудитель обычной корневой гнили.

Kutcher (1994) предполагает, что отбор на общую устойчивость к *C. sativus*, как к возбудителю корневой гнили и темно-бурой пятнистости у ячменя должен быть успешным, но этот отбор и оценку следует отложить до более поздних поколений, если не используются удвоенные гаплоиды. Хотя в нашем исследовании не удалось получить значимых маркеров, ассоциирующихся с воздействием патогена на корневую систему, корреляционный анализ позволяет

предположить, что устойчивость к темно-бурой пятнистости и к корневым гнилям находится под контролем разных локусов.

4.1.2. Устойчивость к *P. teres*

Сетчатая пятнистость, вызываемая патогеном *Pyrenophora teres* f. *teres*, одна из важных и значимых болезней, как представляющая угрозу для всех областей, где выращивается ячмень. Высокая изменчивость этого патогена (Tekauz, 1990; Steffenson, Webster, 1992; Serenius, 2006; Liu et al., 2011) затрудняет селекционерам идентификацию и успешное внедрение новых генов устойчивости в современный селекционный материал. При помощи анализа двуродительских картирующих популяций были выявлены локусы, ассоциированные с устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости на всех хромосомах ячменя (Liu et al., 2011; König et al., 2014; Vatter et al., 2017; Martin et al., 2018). На настоящий момент все большую популярность приобретают исследования по выявлению локусов, ассоциированных с устойчивостью к сетчатой пятнистости, выполненные с помощью GWAS (Afanasenko et al., 2022). Первоначально использовался чип iSelect SNP низкой плотности 9К в качестве платформы для генотипирования и применялись карты генетических связей для аппроксимации положений QTL (Richards et al., 2017; Wonneberger et al., 2017b; Amezrou et al., 2018). С 2019 года работы выполняются на чипе 50К (Novakazi et al., 2019b; Rozanova et al., 2019, Skiba et al., 2022) в сочетании с физическими позициями маркеров на основе сборки псевдомолекулы генома от Mascher (Mascher et al., 2017). Одна из работ опубликована по результатам данного исследования (Rozanova et al., 2019).

Всего методом GWAS нами было обнаружено 14 значимых SNP, ассоциированных с проростковой устойчивостью к четырем изолятам патогена *P. teres* (A2.6.0, S10.2, P3.4.0 и K5.1), вызывающего у ячменя болезнь сетчатая пятнистость, которые соотносились с шестью геномными районами (табл. 4). Все

геномные районы были выявлены на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 6Н. Сравнение данных локусов с литературными данными представлено в таблице 23. Валидация маркеров, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости, была проведена с помощью KASP-генотипирования на независимой выборке, состоящей из 102 сортов, контрастных по устойчивости к *P. teres* (см. Доп. табл. 2) и на 11 дигаплоидных рекомбинантных линиях от скрещивания сорта CI 5791, несущего локус устойчивости в хромосоме 6Н и восприимчивого сорта Harrington.

Таблица 23. Сравнение выявленных геномных районов, ассоциированных с проростковой устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости, с литературными данными.

Хр	Изолят	Название маркерного локуса (SNP)	<i>p</i> -value	Локализация на генетической карте (сМ)	Ранее идентифицированные локусы QTL (сМ)
1Н	K5.1	JHI-Hv50k-2016-33160	$1.45 \cdot 10^{-4}****$	57.3-62.8	(52.4-56.8 сМ) (Grewal et al., 2012); (50-86 сМ) (Afanasenko et al., 2015); (52.55 сМ) (Wonneberger et al., 2017b); (92.2 сМ) (Amezrou et al., 2018); (95.9 сМ) (Vatter et al., 2017);
2Н	S10.2	JHI-Hv50k-2016-74407	$1.82 \cdot 10^{-5}****$	24.5	(7.44 сМ) (Wonneberger et al., 2017b); (23 сМ) (Vatter et al., 2017);
	P3.4.0	ВОРА2_12_31445	$1.44 \cdot 10^{-5}$	72.59	(50-51 сМ) (Grewal et al., 2008); (54.2-55.4 сМ) (Steffenson et al., 1996); (55.5 сМ) (Vatter et al., 2017);
	P3.4.0	JHI-Hv50k-2016-104859	$7.42 \cdot 10^{-6}$		(51-75 сМ) (Afanasenko et al., 2015); (57.15, 59.35 сМ и 92.22 сМ) (Amezrou et al., 2018); (120.04-125.35 сМ) (Richards et al., 2017);
3Н	A2.6.0	JHI-Hv50k-2016-169338	$7.37 \cdot 10^{-7}****$	51.0-52.2	(47.61 сМ) (Richards et al., 2017); (52.6-54.8 сМ) (Koladia et al., 2017);
	A2.6.0	SCRI_RS_186341	$5.96 \cdot 10^{-6}****$		(51.6 сМ) (Vatter et al., 2017);
	A2.6.0	JHI-Hv50k-2016-183207	$1.01 \cdot 10^{-6}*$		(50.99-53.26 сМ) (Wonneberger et al., 2017b); (48.44-48.63 сМ) (Novakazi et al., 2019b)

Продолжение таблицы 23.

Хр	Изолят	Название маркерного локуса (SNP)	<i>p</i> -value	Локализация на генетической карте (сМ)	Ранее идентифицированные локусы QTL (сМ)
	K5.1	JHI-Hv50k-2016-215624	2.84*10 ^{-5****}	135.6-137.5	(115–119 сМ) (Grewal et al., 2008); (112-150 сМ) (Afanasenko et al., 2015); (115.74, 122.59, 154.89 сМ) (Amezrou et al., 2018); (132.93 сМ) (Wonneberger et al., 2017b)
6Н	S10.2	JHI-Hv50k-2016-391875	2.38*10 ^{-6****}	53.33-55.03	(53.33 – 55.67 сМ) (Wonneberger et al., 2017b); (50.2 – 58.4 сМ) (Koladia et al., 2017); (53.6 – 55.52 сМ) (Richards et al., 2017) (53.52 сМ) (Novakazi et al., 2019b)
	S10.2	JHI-Hv50k-2016-392656	2.20*10 ^{-6****}		
	S10.2	BOPA2_12_30021	2.38*10 ^{-6****}		
	P3.4.0	SCRI_RS_239642	3.24*10 ^{-8*}		
	K5.1	SCRI_RS_239642	3.14*10 ^{-5****}		
	S10.2	JHI-Hv50k-2016-398663	3.76*10 ^{-6***}		
	P3.4.0	SCRI_RS_224389	4.84*10 ^{-8*}		

* - значимые SNP, соответствующие поправке Бонферрони, **-значимые SNP соответствующие поправке FDR, *** - SNP предполагаемого уровня.

Маркер, который был выявлен на хромосоме 1Н в настоящем исследовании, ассоциирован с устойчивостью к изоляту K5.1. Он локализован в позиции 57.3 сМ, что соответствует 415 449 531 пн. Данный локус схож с выявленным Grewal et al. (2012) в интервале 52.4-56.8 сМ. В работе Afanasenko et al. 2015 сообщалось о QTL между 50 и 86 сМ на первой хромосоме. Мы предполагаем, что проростковая устойчивость к изоляту K5.1 согласуется с прежде обнаруженными локусами Grewal et al. 2012 и Afanasenko et al. 2015. Другие авторы находили локусы в районе 40 сМ (Amezrou et al., 2018 и Vatter et al., 2017) (табл. 23).

Локусы устойчивости на хромосоме 2Н были выявлены в отношении двух изолятов: P3.4.0 и S10.2, и ассоциировалась с двумя различными районами.

Локус, ассоциированный с устойчивостью к изоляту S10.2, включал в себя один SNP предполагаемого уровня (JHI-Hv50k-2016-74407), картированный в интервале 23.3-23.8 сМ, что соответствовало позиции 28 202 988 пн (табл. 4). Мы полагаем, что проростковая устойчивость к изоляту S10.2 согласуется с прежде известными локусами, картированными ранее Vatter et al., 2017 и Wonneberger et al., 2017 в районе 23 сМ и 10-28 сМ (табл. 23). Локус на хромосоме 2Н, выявленный для изолята P3.4.0, включает в себя 2 SNP, BOPA2_12_31445 и JHI-Hv50k-2016-104859, и локализован в интервале 560 662 266 – 560 717 186 пн, что соответствует позиции 72.59 сМ. Этот район совпадает с районом, картированным между 51 и 75 сМ (Afanasenko et al., 2015). Вероятно, этот же локус был детектирован König в 2014 между 75 и 80 сМ (König et al., 2014). Также есть сведения об областях на хромосоме 2Н, которые не были выявлены в данной работе. В нее включены локусы на позициях 48 сМ (Arru et al., 2003), 50-51 сМ (Grewal et al., 2008); 54.2-55.4 сМ (Steffenson et al., 1996), 55.5 сМ (Vatter et al., 2017), 57.15, 59.35 (Amezrou et al., 2018), 62.7 сМ (Cakir et al., 2011). К тому же обнаружены локусы на хромосоме 2Н в позиции 92.22 сМ (Amezrou et al., 2018) и в интервале 120,04-125,35 сМ (Richards et al., 2017) (табл. 23).

Данные по KASP-генотипированию, полученные для маркера, локализованного на хромосоме 2Н (табл. 21) показывают, что он не может быть использован как диагностический. Однако, большинство (49) устойчивых сортов независимой выборки несли в себе локусы устойчивости в хромосоме 3Н. Локусами устойчивости, расположенными на хромосоме 6Н, обладали 46 из 52 представленных устойчивых сортов. Поскольку, в данной выборке не содержалось сортов, несущих в себе устойчивость по второй хромосоме, мы предполагаем, что данный маркер нуждается в дальнейшей проверке.

На хромосоме 3Н было выявлено два района, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости.

Один район на хромосоме 3Н, выявленный для изолята А2.6.0, соответствует интервалу 51.0-52.2 сМ по генетической карте. Ранее этот район, ассоциированный с устойчивостью к *P. teres*, был обнаружен Koladia et al., 2017 (52.6-54.8 сМ), Vatter et al., 2017 (51.6 сМ), и Wonneberger et al., 2017b (46.2-54.5 сМ). Маркер JHI-Hv50k-2016-183207 из данного исследования располагается менее, чем в 18 тыс пар нуклеотидов от маркера SCRI_RS_221644, обнаруженного Koladia et al., 2017, в позиции 442203921 пн. Однако, несмотря на то, что по генетической карте три выявленных маркера относятся к одному локусу, по физической карте маркеры SCRI_RS_186341 и JHI-Hv50k-2016-169338 располагаются отдельно, в районе $184 \cdot 10^6$ - $189 \cdot 10^6$ пн.

Второй район на хромосоме 3Н был выявлен для изолята К5.1 и включает в себя один SNP (JHI-Hv50k-2016-215624) предполагаемого уровня, расположенный в позиции 593 898 394 пн и картированный на интервале 135.6-137.5 сМ. Нами предполагается, что проростковая устойчивость к изоляту К5.1 согласуется с обнаруженным прежде локусом, картированным Afanasenko et al., 2015 (112-150 сМ) и Amezrou et al., 2018 (136.6 сМ) (табл. 23). Ранее Martin и соавторы (2018) также обнаружили QTL устойчивости к сетчатой пятнистости, расположенный в позиции $622 \cdot 10^6$ пн, путем картирования ДН-популяции (UVC8 x SABBI Erica) и разработали KASP-маркер (USQ3_1329) для использования в селекционных программах. Koladia et al. (2017) исследовали девять изолятов *P. teres* и обнаружили QTL, который был значимым для всех этих изолятов, расположенный на $490 \cdot 10^6$ пн с пиковым маркером SCRI_RS_221644 (52.01 сМ). Burlakoti et al., 2017 также нашли QTL (58.4 сМ), который соответствует району, обнаруженному в данной работе. Интересно, что они провели GWAS по устойчивости для другой формы *P. teres* – пятнистой формы сетчатой пятнистости (*P. teres* f. *maculata*) – что указывает на то, что, хотя обе формы генетически различны, этот район несет устойчивость к обеим.

Два маркера на хромосоме 3Н, выявленные на основании метода GWAS, были конвертированы в KASP-маркеры. По генетической карте они находятся в интервале 51.0-52.2 сМ, однако, расположены друг от друга на расстоянии $253 \cdot 10^6$ пн. Маркер JHI-Hv50k-2016-183207 показал четкое распределение по классам устойчивых/восприимчивых сортов, статистические значения были высокими. Этот маркер может быть рекомендован для отбора носителей локуса устойчивости в хромосоме 3Н. Статистические значения для другого маркера JHI-Hv50k-2016-169338 показали, что он не может быть использован как диагностический (табл. 21).

На хромосоме 6Н была идентифицирована область, ассоциированная с устойчивостью к сетчатой форме сетчатой пятнистости. Она представляет собой два интервала: на позиции $139 \cdot 10^6$ - $153 \cdot 10^6$ пн по физической карте, что соответствует 52.6-53.8 сМ и на позиции $350 \cdot 10^6$ - $352 \cdot 10^6$ пн, что соответствует 55.4 сМ. Фактически существует расстояние между маркерами BOPA2_12_30021 ($153\,078\,392$ пн) и SCRI_RS_239642 ($350\,331\,000$ пн), однако на генетической карте популяции RIL Bayer et al. (2017), все эти маркеры локализованы в одном интервале 52.6-55.4 сМ. Область расположена в прицентромерном районе. В этом регионе частота рекомбинационных событий невелика, что объясняет большой физический интервал. Область была обнаружена в испытаниях тремя из четырех исследуемых изолятов (P3.4.0, K5.1 и S10.2). В данном районе особо выделяется маркер SCRI_RS_239642, показавший наибольшую значимость, ранее он упоминался в работе Vatter et al., 2017. В непосредственной близости от обнаруженного района в работах других авторов были так же выявлены локусы устойчивости. В работе Novakazi et al. 2019 был идентифицирован район $352 \cdot 10^6$ пн. Также QTL на позиции $350 \cdot 10^6$ пн, ассоциированный с устойчивостью проростков был обнаружен Steffenson et al. (1996) и Wonneberger et al. (2017a).

Маркер (JHI-Hv50k-2016-398663), выбранный для валидации с помощью KASP-генотипирования, не показал себя как диагностический на независимой выборке, состоящей из 102 контрастных по устойчивости сортообразцов ячменя (табл. 21). Однако независимая выборка содержала преимущественно сорта, которые несли локус устойчивости в хромосоме 3Н (персональное сообщение Афанасенко О.С.). На 11 рекомбинантных дигаплоидных линиях от скрещивания сорта CI 5791, несущего локус устойчивости в хромосоме 6Н и восприимчивого сорта Harrington (табл. 21) проявилась четкая корреляция маркера с устойчивостью: 100% устойчивых генотипов несли аллель локуса JHI-Hv50k-2016-398663, ассоциированный с устойчивостью, и 100% восприимчивых – альтернативный аллель. Соответственно, этот маркер может быть рекомендован для отбора носителей локуса устойчивости в хромосоме 3Н.

Несмотря на то, что локусы устойчивости к болезням были выявлены ранее в предыдущих исследованиях, маркерные SNP, идентифицированные в данной работе, представлены впервые (кроме одного – SCRI_RS_239642). В настоящей работе обнаруженные районы содержали в себе новые SNP за счет использования чипа более высокой плотности, что позволило задействовать больше вариантов при разработке диагностических маркеров.

При этом нельзя полностью исключить из дальнейших исследований маркеры, не прошедшие в нашей работе валидацию на применяемых независимых выборках, так как использование их на более специфичных выборках подтверждает высокую степень дифференциации устойчивых/восприимчивых генотипов. Маркеры, прошедшие валидацию, как по отдельности, так и в комбинации друг с другом, можно использовать для скрининга коллекций генетических ресурсов ячменя и для анализа потомства от скрещиваний элитных сортов с донорами устойчивости. Как показано выше, было выявлено в случае двуродительской популяции дигаплоидных линий,

отличавшихся только по локусу в хромосоме 6Н, маркер четко дифференцировал между собой устойчивого и восприимчивого родителя. Такие маркеры могут быть пригодны для отбора нужных генотипов в двуродительских популяциях, то есть в потомстве от скрещивания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведена оценка устойчивости сибирского генофонда ячменя к гемиотрофным патогенам *Pyrenofora teres* f. *teres* (возбудитель сетчатой пятнистости) и *Cochliobolus sativus* (возбудитель темно-бурой пятнистости и корневой гнили). Исследование проводилось с использованием современных методов количественной генетики (генотипирование на чипе 50К, полногеномный анализ ассоциаций, преобразование фенотипических данных методом частичных наименьших квадратов) с целью выявления геномных локусов, ассоциированных с устойчивостью к грибным болезням. Было выявлено пять геномных районов, значимо ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости, и шесть – к сетчатой пятнистости. Выявленные геномные районы соответствовали положению ранее описанных локусов в литературе. Однако применение чипа высокой плотности позволило сузить внутривхромосомный район их локализации, что в дальнейшем может быть полезно для поиска генов-кандидатов, контролирующей устойчивость к исследуемым заболеваниям. Выявленные локусы содержали в себе новые SNP, что сделало возможным разработку диагностических ПЦР-маркеров. Их использование позволяет выявлять устойчивые генотипы среди селекционных гибридов, что существенно сокращает объем анализируемых селекционных линий за счет исключения большей части восприимчивых генотипов без выполнения их фенотипической оценки.

Таким образом, на основе полученных результатов возможно дальнейшее развитие, как работ в области практической селекции, так и фундаментальных исследований молекулярно-генетических механизмов формирования устойчивости ячменя к гемиотрофным патогенам.

ВЫВОДЫ

1. При помощи фитопатологической оценки устойчивости к четырем изолятам возбудителей сетчатой, к трем темно-бурой пятнистостей и одного к корневой гнили были выделены сорта ячменя Алей и Колчан с групповой устойчивостью (Алей ко всем трем болезням, Колчан – к темно-бурой пятнистости и корневой гнили), а также 8 сортов устойчивых ко всем используемым изолятам возбудителя сетчатой и 7 сортов – ко всем изолятам темно-бурой пятнистостей.

2. Анализ генетической структуры популяции сибирского генофонда ячменя показал, что изученные генотипы разделяются на четыре кластера. Установлено, что устойчивость сортов к фитопатогенам не связана с их принадлежностью к определенному кластеру.

3. При помощи GWAS и PLS-анализа установлено, что шесть геномных районов (на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 6Н) ассоциированы с ювенильной устойчивостью к сетчатой пятнистости (к индивидуальным изолятам) и пять геномных районов (на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 7Н) – с ювенильной устойчивостью к темно-бурой пятнистости (к индивидуальным изолятам), из которых три геномных района (на хромосомах 2Н, 3Н и 7Н) ассоциированы, возможно, с расонеспецифической устойчивостью к трем исследуемым изолятам *C. sativus*.

4. На основе анализа независимых выборок образцов ячменя подтверждено, что маркеры JHI-Hv50k-2016-156842, -156820, -157182, -156999 ассоциированы с локусом устойчивости к темно-бурой пятнистости в районе 15.16 – 18.83 сМ хромосомы 3Н, а маркеры JHI-Hv50k-2016-183207 и -398663 – с локусами устойчивости к сетчатой пятнистости в районе 52.6 сМ хромосомы 3Н и в районе 54.89 сМ хромосомы 6Н. Данные SNP маркеры могут быть рекомендованы для

маркер-ориентированной селекции ячменя на устойчивость к соответствующим заболеваниям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аксенович Т.И. Картирование генов с помощью неравновесия по сцеплению или аллельных ассоциаций: учеб. пособие / Аксенович Т.И., Белоногова Н.М. // НГУ – 2008.
2. Астахов А.И. Определение наследуемости в популяциях растений при сочетании перекрестного опыления и самоопыления / Астахов А.И. // Сельскохозяйственная биология – 2005. – Т. 40 – №1 – С.96-100.
3. Афанасенко О.С. Генетическая защита растений: проблемы и перспективы / О. С. Афанасенко // Защита и карантин растений – 2016. – Т. 1 – С. 13–16.
4. Афанасенко О.С. Методические указания по диагностике и методам полевой оценки устойчивости ячменя к возбудителям пятнистостей листьев / Афанасенко О.С. // РАСХН, ВИЗР. – 1987. – С. 20.
5. Богданова О. В. Обзор эмпирических и современных методов селекции для улучшения ячменя (*Hordeum vulgare*) / Богданова О. В., Новикова А. А. // Животноводство и кормопроизводство, 2022. – Т. – 105 – №1 - С. 139-158.
6. Брагина М. К. Прогресс в секвенировании геномов растений – направления исследований / Брагина М.К., Афонников Д.А., Салина Е.А. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2019. – Т. 23 – №1 – С. 38-48. DOI 10.18699/VJ19.459
7. Вандерпланк Я.Е. Устойчивость растений к болезням / Вандерпланк Я.Е. // Пер. с англ. М.: Колос 1972 [Van der Plank, J.E. ‘Disease Resistance in Plants’. New York: Acad. Press. 1968.]
8. Веллер Дж.И. Геномная селекция животных / Веллер Дж.И. // СПб.: Проспект Науки – 2018. – Т 208 – С.
9. Гончаров Н. П. Доместикация растений / Гончаров Н. П. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2015. – Т.17 – №4/2 – С. 884-899.

10. Горобей И.М. Болезни однолетних кормовых культур и их фитосанитарный контроль в лесостепи Западной Сибири / Горобей И.М. – Новосибирск – Докторская диссертация – 2011.
11. Колчанов Н.А. Материалы научной сессии общего собрания членов РАН на тему: Генетические ресурсы растений, животных и микроорганизмов на службе человечества / Колчанов Н.А., Кочетов А.В., Салина Е.А., Першина Л.А., Хлесткина Е.К., Шумный В.К. – 26 октября 2016 г., г. Москва
12. Лапина В.В. Этиология корневых гнилей и пятнистостей ячменя в условиях южной части Центрального Нечерноземья / Лапина В.В., Смолин Н.В., Жемчужина Н.С., Овчинников А.П. // Вестник Алтайского государственного аграрного университета – 2014. – Т. 3 – №113 – С. 34–39.
13. Лашина Н.М. Поражаемость пятнистостями сортов ячменя, включенных в государственный реестр селекционных достижений и находящихся на сортоиспытаниях / Лашина Н.М., Афанасенко О.С. // Вестник защиты растений – 2019. – Т. 2 – №100 – С. 23–28.
14. Максимов Р. А. Исторические аспекты селекции ячменя на Среднем Урале / Максимов Р. А., Лихачева Н. В. // АПК России – 2019. – Т. 26 – №5 – С. 769-774.
15. Медведев С. С. Физиология растений: учебник. — Издательство С.-Петербур. Университета – 2004.
16. Наумкин Д.В. Морфобиологические и биохимические особенности исходного материала ярового ячменя в селекции на урожайность и качество зерна / Наумкин Д. В. – Брянская государственная сельскохозяйственная академия – Докторская диссертация – 2009.
17. Обухов В. М. Движение урожаев зерновых культур в Европейской России в период 1883-1915 гг / Обухов В. М. // Влияние неурожаев на народное хозяйство России – М.: РАНИОН 1927. – С. 2-5.

18. Полунин Д.А. Разработка программного комплекса JACOBI 4 для многомерного анализа микрочиповых данных / Полунин Д.А., Штайгер И.А., В.М. Ефимов // Вестник НГУ – 2014. – Т. 12 – №2 – С. 90-98.
19. Родина Н. А. Селекция ячменя на Северо-Востоке Нечерноземья / Родина Н. А. // Киров: Зональный НИИСХ Северо-Востока – 2006. – С. 488.
20. Розанова И.В. NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя / Розанова И.В., Хлесткина Е.К. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2020. – Т. 24 – №4 – С. 348.
21. Сколотнева Е.С. Разнообразие механизмов устойчивости, вовлеченных в многоуровневый иммунитет пшеницы к ржавчинным заболеваниям / Сколотнева Е.С., Салина Е.А. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2019. – Т. 23 – №5 – С. 542-550.
22. Федеральная служба государственной статистики (Росстат) [Электронный ресурс] // Сельское хозяйство – 2021. – URL: <https://rosstat.gov.ru/folder/210/document/13226> (Дата обращения 04.11.2022)
23. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Хлесткина Е.К. // Вавиловский журнал генетики и селекции – 2013. – Т. 17 – №4/2 – С. 1044–1054.
24. Шешегова Т. К. Зависимость развития грибной инфекции зерновых культур от сезонной динамики климатических факторов / Шешегова Т. К., Щеклеина Л. М., Щенникова И. Н., Мартьянова, А. Н // Достижения науки и техники АПК – 2017. – Т. 31 – №4 – С. 58-61.
25. Abd-Hamid N. A. Diverse and dynamic roles of F-box proteins in plant biology / Abd-Hamid N. A., Ahmad-Fauzi M. I., Zainal Z., Ismail I. // Planta – 2020. – Т. 251 – № 3 – С. 1-31.

26. Abed A. A high-resolution consensus linkage map for barley based on GBS-derived genotypes / Abed A., Badea A., Beattie A., Khanal R., Tucker J., Belzile F // *Genome* – 2022. – T. 65 – № 2 – C. 83-94.
27. Abed A. Genotyping-by-sequencing on the ion torrent platform in barley / Abed A., Légaré G., Pomerleau S., St-Cyr J., Boyle B., Belzile F. J. // *In Barley* – 2019. – C. 233-252.
28. Adhikari A. Identification of quantitative trait loci for net form net blotch resistance in contemporary barley breeding germplasm from the USA using genome-wide association mapin / Adhikari A., Steffenson B. J., Smith K. P., Smith M., Dill-Macky R. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2020. – T. 133 – №3 – C. 1019-1037.
29. Afanasenko O. S. Mapping of the loci controlling the resistance to *Pyrenophora teres f. teres* and *Cochliobolus sativus* in two double haploid barley populations / Afanasenko O. S., Koziakov A.V., Hedlay P. E., Lashina N.M., Anisimova A.V., Manninen O., Potokina E.K. // *Russian Journal of Genetics: Applied Research* – 2015. – T.5 – №3 – C. 242–253. doi: 10.1134/S2079059715030028.
30. Afanasenko O. Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3H for marker-assisted selection / Afanasenko O., Rozanova I., Gofman A., Lashina N., Novakazi F., Mironenko N., Zubkovich A. // *Agriculture* – 2022. T.12 – №4 – C. 439.
31. Afonin A.N. Interactive Agricultural ecological atlas of Russia and neighboring countries / Afonin A.N., Greene S.L., Dzyubenko N.I., Frolov A.N., Afanasenko O.S., Berim M.N., Yakutkin V.I. // *Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds* – 2008. <http://www.agroatlas.ru/>.
32. Aghnoum R. Host/Nonhost status and genetics of resistance in barley against Three Pathotypes of Magnaporthe Blast Fungi / Aghnoum R., Bvindi C., Menet G., D'hoop B., Maciel J.L.N., Niks R.E. // *Euphytica* – 2019. – T.215 – №7 – C.

- 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2436-z>.
33. Albrecht M. Update on the domain architectures of NLRs and R proteins / Albrecht M., Takken F.L. // Biochemical and biophysical research communications – 2005. – T.339 – №2 – C. 459-462.
34. Almgren I. Interaction between root and leaf disease development in barley cultivars after inoculation with different isolates of *Bipolaris sorokiniana* / Almgren I., Gustafsson M., Lindgren H., Liljeroth E. // Journal of Phytopathology – 1999. – T.147 – №6 – C. 331–337. doi: 10.1046/j.1439-0434.1999.00382.x
35. Alqudah A. M. Genetic dissection of photoperiod response based on GWAS of pre-anthesis phase duration in spring barley / Alqudah A. M., Sharma, R., Pasam, R. K., Graner, A., Kilian, B., and Schnurbusch, T. // PLoS ONE – 2014. – T.9 – №11 – e113120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113120>.
36. Alqudah A. M. Insight into the genetic contribution of maximum yield potential, spikelet development and abortion in barley / Alqudah A. M., Sharma R., Börner A. // Plants, People, Planet – 2021. – T.3 – №6 – C. 721-736.
37. Alqudah A. M. Natural variation and genetic make-up of leaf blade area in spring barley / Alqudah A. M., Youssef H. M., Graner A., Schnurbusch T. // Theoretical and Applied Genetics – 2018. – T.131 – №4 – C. 873–86. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3053-2>.
38. Alqudah A. M. The genetic architecture of barley plant stature / Alqudah A. M., Kopolu R., Wolde G.M., Graner A., Schnurbusch T. // Frontiers in Genetics – 2016. – T.7 – C. 117. <https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00117>.
39. Amezrou R. Genome-wide association studies of net form of net blotch resistance at seedling and adult plant stages in spring barley collection / Amezrou R., Verma R.P.S., Chao S., Brueggeman R.S., Belqadi L., Arbaoui M., Gyawali S. // Molecular Breeding – 2018. T. 38 – C. 58. doi: 10.1007/s11032-018-0813-

- 2.
40. Andrews K.R. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics / Andrews K.R., Good J.M., Miller M.R., Luikart G., Hohenlohe P.A. Nature Reviews Genetics – 2016. – T.17 – №2 – C. 81-92.
41. Arabi M. I. E. Identification of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) isolates expressing differential virulence on barley genotypes in Syria / Arabi M. I. E., Jawhar M. // Journal of Phytopathology – 2004. – T.152 – №8-9 – C. 461-464.
42. Arabi M.I.E. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus* / Arabi M. I. E., Jawhar M., Australasian Plant Pathology – 2007. T.36 – №1 – C. 17–21. doi: 10.1071/AP06081.
43. Arabi M.I.E. Mycorrhizal application as a biocontrol agent against common root Rot of barley / Arabi M.I.E., Kanacri S., Ayoubi Z., Jawhar M. // Research in Biotechnology – 2013. – T.4 – № - C. 7–12. www.researchinbiotechnology.com
44. Arabi M.I.E. Virulence spectrum to barley (*Hordeum vulgare* L.) in some isolates of cochliobolus sativus from Syria / Arabi M. I. E., Jawhar M. // Journal of Plant Pathology – 2002. – T.84 – №1 – C. 35–39. <http://sipav.org/main/jp/index.php/jp/article/viewFile/1085/868>.
45. Ariyadasa R. A sequence-ready physical map of barley anchored genetically by two million single-nucleotide polymorphisms / Ariyadasa R., Mascher M., Nussbaumer T., Schulte D., Frenkel Z., Poursarebani N., Stein N. // Plant Physiology – 2014. – T.164 – №1 – C. 412–423. doi: 10.1104/p.113.228213.
46. Arru L. Isolate-specific QTLs of resistance to leaf stripe (*Pyrenophora graminea*) in the “ Steptoe ” × “ Morex ” spring barley cross / Arru L., Francia E., Pecchioni N. // Theoretical and Applied Genetics – 2003. – T.106 – №4 – C. 668–675. doi: 10.1007/s00122-002-1115-x.
47. Atienza S.G. Accumulation of genes for susceptibility to rust fungi for which barley is nearly a nonhost results in two barley lines with extreme multiple

- susceptibility / Atienza S.G., Jafary, H., Niks, R.E. // *Planta* – 2004. T.220 – C. 71-79.
48. Atwell S. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines / Atwell S., Huang Y. S., Vilhjálmsson B. J., Willems G., Horton, M., Li, Y., ... & Nordborg, M. // *Nature* – 2010. T.465 – №7298 – C. 627-631..
49. Ayana G. T. Genome-wide association study for spot blotch resistance in hard winter wheat / Ayana G. T., Ali S., Sidhu J. S., Gonzalez Hernandez J.L., Turnipseed B., Sehgal, S.K. // *Frontiers in Plant Science* – 2018. – T.9 – C. 926. doi: 10.3389/fpls.2018.00926.
50. Bai J. Diversity in nucleotide binding site-leucine-rich repeat genes in cereals / Bai J., Pennill L.A., Ning J., Lee S.W., Ramalingam J., Webb C.A., Zhao B., Sun Q., Nelson J.C., Leach J.E., Hulbert S.H. // *Genome Research* – 2002. – T.12 – C. 1871-1884. 10.1101/gr.454902.
51. Bai Y. Genome wide association study of plant height and tiller number in hullless barley / Bai Y., Zhao, X., Yao X., Yao Y., An L., Li X., Wang Z. // *PloS one* – 2021. T. 16 – №12 – e0260723.
52. Barbazuk W. B. SNP discovery via 454 transcriptome sequencing / Barbazuk W. B., Emrich, S. J., Chen H. D., Li L., Schnable P. S. // *The plant journal* – 2007. – T.51 – №5 – C. 910-918.
53. Batley J. Mining for single nucleotide polymorphisms and insertions/deletions in maize expressed sequence tag data / Batley J., Barker G., O'Sullivan H., Edwards K. J., Edwards D. // *Plant physiology* – 2003. – T. 132 – №1 C. 84-91.
54. Bayer M.M. Development and evaluation of a barley 50k iSelect SNP array / Bayer M.M., Rapazote-Flores, P., Ganal M., Hedley P. E., Macaulay M., Plieske J., Waugh R. // *Frontiers in plant science* – 2017. – T.8 – C. 1792.
55. Becker J. Barley microsatellites: allele variation and mapping / Becker J., Heun,

- M. // *Plant Molecular Biology* – 1995. – T. 27 – №4 – C. 835-845.
56. Bedawy I. Mining the global diversity of barley for *Fusarium* resistance using leaf and spike inoculations / Bedawy I., Dehne H. W., Léon J., Naz A. A. // *Euphytica* – 2018. – T.214 - №1 – C. 1-13.
57. Belcher A. R. Registration of the TCAP FAC-WIN6 barley panel for genome-wide association studies / Belcher A. R., Graebner, R.C., Cuesta-Marcos, A., Fisk S., Filichkin T, Smith K.P., Blake V.C., Hayes P.M. // *Journal of Plant Registrations* – 2015. – T. 9 – №3 – C. 411–18. <https://doi.org/10.3198/jpr2014.12.0083crmp>.
58. Bellucci A. Genome-wide association mapping in winter barley for grain yield and culm cell wall polymer content using the high-throughput CoMP technique / Bellucci A., Tondelli A., Fangel J.U., Torp A.M., Xu X., Willats W.G.T., Flavell A., Cattivelli L., Rasmussen S.K. // *PLOS ONE* – 2017. – T.12 – №3 – e0173313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173313>.
59. Bengtsson T. A novel QTL for powdery mildew resistance in nordic spring barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *vulgare*) revealed by genome-wide association study / Bengtsson T., Ahman I., Manninen O., Reitan L., Christerson T., Due Jensen J., Orabi J // *Frontiers in plant science* – 2017. – T. 8 – C. 1954.
60. Benjamini Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing / Benjamini Y., Hochberg, Y // *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* – 1995. – T.57 – №1 – C. 289-300.
61. Bent A.F. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes / Bent A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Staskawicz, B.J. / *Science* – 1994. – T. 265 – №5180 – C. 1856-1860.
62. Berger G.L. Marker-trait associations in Virginia Tech winter barley identified using genome-wide mapping / Berger G.L., Liu S., Hall M.D., Brooks W.S., Chao

- S., Muehlbauer G.J., Griffey C. A. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2013. – T. 126 – №3 – C. 693–710. doi: 10.1007/s00122-012-2011-7.
63. Bernoux M. RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* Pop2 effector / Bernoux M., Timmers T., Jauneau A., Briere C., de Wit P.J., Marco Y., Deslandes L. // *Plant Cell* – 2008. – T. 20 – №8 – C. 2252–2264. doi: 10.1105/tpc.108.058685.
64. Bilgic H. Comprehensive genetic analyses reveal differential expression of spot blotch resistance in four populations of barley / Bilgic H., Steffenson, B.J., Hayes, P.M. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2005. – T.111 – №7 – C. 1238–1250. doi: 10.1007/s00122-005-0023-2.
65. Bilgic H. Molecular mapping of Loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley / Bilgic H., Steffenson B.J., Hayes P.M. // *Phytopathology* – 2006. – T.96 – №7 – C. 699–708. doi: 10.1094/PHYTO-96-0699.
66. Blanvillain R. Stress tolerance to stress escape in plants: role of the OXS2 zinc-finger transcription factor family / Blanvillain R., Wei S., Wei P., Kim J. H., Ow D. W. // *The EMBO journal* – 2011. – T. 30 – №18 – C. 3812-3822.
67. Bonman J.M. Disease and insect resistance in cultivated barley accessions from the USDA National Small Grains Collection / Bonman J.M., Bockelman, H.E., Jackson, L.F., Steffenson, B.J. // *Crop Science* – 2005. – T.45 – №4 – C. 1271–1280. doi: 10.2135/cropsci2004.0546.
68. Bovill J. Mapping spot blotch resistance genes in four barley populations / Bovill J., Lehmensiek A., Sutherland M.W., Platz G.J., Usher T., Franckowiak J., Mace, E. // *Molecular Breeding* – 2010. – T. 26 – №4 – C. 653–666. doi: 10.1007/s11032-010-9401-9.
69. Bradbury P.J. TASSEL: software for association mapping of complex traits in

- diverse samples / Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. // *BIOINFORMATICS* – 2007. – T. 23 – №19 – C. 2633–2635. doi: 10.1093/bioinformatics/btm308.
70. Burch-Smith T.M. A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors / Burch-Smith T.M., Schiff M., Caplan J.L., Tsao J., Czymmek K., Dinesh-Kumar S. P. // *PLoS Biology* – 2007. – T. 5 – №3 – C. 0501–0514. doi: 10.1371/journal.pbio.0050068.
71. Burdon J. Sources and patterns of diversity in plant-pathogenic fungi / Burdon J.; Silk, J. // *Phytopathology* – 1997. – T. 87 – C. 664–669.
72. Burlakoti R.R. Genome-wide association study of spot form of net blotch resistance in the uper midwest barley breeding programs / Burlakoti R.R., Gyawali S., Chao S., Smith K.P., Horsley R.D., Cooper B., Neate S.M. // *Phytopathology* – 2017. – T. 107 – №1 – C. 100–108. doi: 10.1094/PHYTO-03-16-0136-R.
73. Burleigh J. R. Effects of *Pyrenophora teres* and weeds on barley yield and yield components / Burleigh J. R., Tajani, M., Seck, M. // *Phytopathology* – 1988. – T. 78 – №3 – C. 295-299.
74. Bykova I.V. Identification of 50 K Illumina-chip SNPs associated with resistance to spot blotch in barley / Bykova I.V., Lashina N.M., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. // *BMC Plant Biology* – 2017. – T. 17 – №2 – C. 250. doi: 10.1186/s12870-017-1198-9.
75. Cai S. Grain protein content variation and its association analysis in barley / Cai S., Yu G., Chen X., Huang Y., Jiang X., Zhang G., Jin X. // *BMC plant biology* – 2013. – T. 13 – №1 – C. 1-11.
76. Cakir M. Genetic mapping and QTL analysis of disease resistance traits in the barley population Baudin x AC Metcalfe / Cakir M., Gupta S., Li C., Hayden M., Mather D.E., Ablet G.A., Lance R.C. // *Crop and Pasture Science* – 2011. – T.

- 62 – №2 – C. 152–161. doi: 10.1071/CP10154.
77. Cantalapiedra C.P. BARLEYMAP: physical and genetic mapping of nucleotide sequences and annotation of surrounding loci in barley / Cantalapiedra C.P., Boudiar R, Casas A.M., Igartua E., Contreras-Moreira B. // *Molecular Breeding* – 2015. – T. 35 – №1 – C. 13.
78. Casas A. M. Resequencing the *Vrs1* gene in Spanish barley landraces revealed reversion of six-rowed to two-rowed spike / Casas A. M., Contreras-Moreira B., Cantalapiedra C. P., Sakuma S., Gracia M. P., Moralejo M., Igartua E. // *Molecular Breeding* – 2018. – T. 38 – №5 – C. 1-12.
79. Çelik Oğuz A. Genetic diversity of barley foliar fungal pathogens / Çelik Oğuz, A., Karakaya A. // *Agronomy* – 2021. – T. 11 – №3 – C. 434.
80. Chang C.W. Physical geography, isolation by distance and environmental variables shape genomic variation of wild barley (*Hordeum vulgare* L. ssp. *spontaneum*) in the Southern Levant / Chang C.W., Fridman E, Mascher M, Himmelbach A, Schmid K. // *Heredity* – 2022. – T. 128 – №2 – C. 107-119. doi: 10.1038/s41437-021-00494-x.
81. Choi M. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing / Choi M., Scholl U. I., Ji W., Liu T., Tikhonova I. R., Zumbo P., Lifton R. P. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2009. – T. 106 – №45 – C. 19096-19101.
82. Christensen J. J. Studies on the parasitism of *helminthosporium sativum* PK & B / Christensen J. J. // 1922.
83. Chromosome R. Sequencing consortium 2003 //depth view of structure, activity, and evolution of rice chromosome. – 10. – T. 10. – C. 1566-1569.
84. Chutimanitsakun Y. Application of marker-assisted selection and genome-wide association scanning to the development of winter food barley germplasm resources / Chutimanitsakun Y., Cuesta-Marcos A., Chao S., Corey A., Filichkin

- T., Fisk S., Kolding M. // *Plant Breeding* – 2013. – T. 132 – №6 – C. 563–70. <https://doi.org/10.1111/pbr.12086>
85. Chutimanitsakun Y. Construction and application for QTL analysis of a restriction site associated DNA (RAD) linkage map in barley / Chutimanitsakun Y., Niper R.W., Cuesta-Marcos A., Cistué L., Corey A., Filichkina T., Hayes P. M. // *BMC genomics* – 2011. – T.12 – №1 – C. 1-13.
86. Cistué L. Comparative mapping of the Oregon Wolfe Barley using doubled haploid lines derived from female and male gametes / Cistué L., Cuesta-Marcos A., Chao S., Echavarri B., Chutimanitsakun Y., Corey A., Hayes P.M. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2011. – C. 1399–1410. doi: 10.1007/s00122-011-1540-9.
87. Clark R.V. The reaction of barley lines to root rot, leaf spot, and head blight / Clark R.V. // *Canadian Journal of Plant Science* – 1966. – T.46 – №6 – C.603-609.
88. Clark R.V. Yield losses in barley cultivars caused by spot blotch / Clark R.V. // *Canadian Journal of Plant Pathology* – 1979. – T.1 – №2 – C. 113–117. doi: 10.1080/07060667909501473.
89. Close T.J. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley / Close T.J., Bhat P.R., Lonardi S., Wu Y., Rostoks N., Ramsay L., Druka A., Waugh R. // *BMC genomics* – 2009. – T. 10 – №1 – C. 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-582>.
90. Cockram J. Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome / Cockram J., White J., Zuluaga D.L., Smith D., Comadran J., Macaulay M., Luo Z. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2010. – T. 107 – №50 – C. 21611–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010179107>.
91. Comadran J. Natural variation in a homolog of *Antirrhinum*

- CENTRORADIALIS contributed to spring growth habit and environmental adaptation in cultivated barley / Comadran J., Kilian B., Russell J., Ramsay L., Stein N., Ganal M., Shaw P., Waugh, R. // *Nature Genetics* – 2012. – T. 44 – №12 – C. 1388–1391. doi: 10.1038/ng.2447.
92. Consortium. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome / Mayer, K. F., Waugh, R., Langridge, P., Close, T. J., Wise, R. P., Graner, A., ... Stein, N. // *Nature* – 2012. – T. 491 – №7426 – C. 711–716. doi: 10.1038/nature11543.
93. Cozzolino D. Combining partial least squares (PLS) discriminant analysis and rapid visco analyser (RVA) to classify barley samples according to year of harvest and locality - Cozzolino D., Roumeliotis S., Eglinton J. // *Food analytical methods* – 2014. – T. 7 – №4 – C. 887-892.
94. Cuesta-Marcos A. Genome-wide SNPs and re-sequencing of growth habit and inflorescence genes in barley: implications for association mapping in germplasm arrays varying in size and structure / Cuesta-Marcos A., Szűcs P., Close T. J., Filichkin T., Muehlbauer G. J., Smith K. P., Hayes P. M. // *BMC genomics* – 2010. – T. 11 – №1 – C. 1-14.;
95. Czembor J. H. Genome-wide association study for powdery mildew and rusts adult plant resistance in european spring barley from polish gene bank / Czembor J. H., Czembor E., Suchecki R., Watson-Haigh N. S. // *Agronomy* – 2021. – T. 12 – №1 – C. 7.
96. Daba S. D. Genome-wide association studies and candidate gene identification for leaf scald and net blotch in barley (*Hordeum vulgare* L.) / Daba S. D., Horsley, R., Brueggeman, R., Chao, S., Mohammadi, M. // *Plant disease* – 2019. – T. 103 – №5 – C. 880-889.
97. Dangl J.L. Defence responses to infection / Dangl J.L., Jones J.D.G. // *Nature* – 2001. – T. 411 – № June.

98. Darrier B. A comparison of mainstream genotyping platforms for the evaluation and use of barley genetic resources / Darrier B., Russell J., Milner S.G., Hedley P.E., Shaw P.D., Macaulay M., Ramsay L.D., Waugh, R. // *Frontiers in Plant Science* – 2019. – T. 10 – C. 544. doi: 10.3389/fpls.2019.00544.
99. Davey J.W. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing / Davey J.W., Hohenlohe P.A., Etter P.D., Boone J.Q., Catchen J.M., Blaxter M.L. // *Nature Reviews Genetics* – 2011. – T. 12 – №7 – C. 499-510.
100. Day B. NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis* / Day B., Dahlbeck D., Staskawicz B. J. // *Plant Cell* – 2006. – T. 18 – №10 – C. 2782–2791. doi: 10.1105/tpc.106.044693.
101. Deslandes L. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and Pop2, a type III effector targeted to the plant nucleus / Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D.X., Khounlotham M., Boucher C., Marco Y. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2003. – T. 100 – №13 – C. 8024–8029. doi: 10.1073/pnas.1230660100.
102. Dinglasan E. Genetic characterization of resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in the international barley differential Canadian lake shore / Dinglasan E., Hickey L., Ziemis L., Fowler R., Anisimova A., Baranova O., Afanasenko O. // *Frontiers in plant science* – 2019. – T. 10 – C.326.
103. Dodds P.N. Plant immunity: Towards an integrated view of plant pathogen interactions / Dodds P.N., Rathjen J.P. // *Nature Reviews Genetics* – 2010. – T. 11 – №8 – C. 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
104. Doebley J. F. The molecular genetics of crop domestication / Doebley J. F., Gaut B. S., Smith B. D. // *Cell* – 2006. – T. 127 – №7 – C. 1309-1321.

105. Drader T. Genetic and physical mapping of a high recombination region on chromosome 7H(1) in barley / Drader T., Johnson K., Brueggeman R., Kudrna D., Kleinhofs A. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2009. – T. 118 – №4 – C. 811–820. doi: 10.1007/s00122-008-0941-x.
106. Druka A. Exploiting induced variation to dissect quantitative traits in barley / Druka A., Franckowiak J., Lundqvist U., Bonar N., Alexander J., Guzy-Wrobelska J., Waugh // *Biochemical Society Transactions* – 2010. – T. 38 – №2 – C. 683-688.
107. Elshire R. J. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species / Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. // *PloS one* – 2011. – T. 6 – №5 – e19379.
108. Fairbairn A. The origins and spread of domesticated plants in Southwest Asia and Europe / Fairbairn A. // *Environmental Archaeology* – 2010. – T. 15 – №1 – C. 99-100.
109. Fan J.B. Highly parallel SNP genotyping / Fan J.B., Oliphant A., Shen R., Kermani B.G., Garcia F., Gunderson K.L., Hansen M., Chee M.S. // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* – 2003. – T. 68 – C. 69–78. doi: 10.1101/sqb.2003.68.69.
110. Fan X. Comparative mapping and candidate gene analysis of SSIIa associated with grain amylopectin content in barley – (*Hordeum vulgare* L.) / Fan X., Zhu J., Dong W., Sun Y., Lv C., Guo B., Xu R. // *Frontiers in Plant Science* – 2017. – T. 8 – C. 1531. doi: 10.3389/fpls.2017.01531.
111. Faure S. The FLOWERING LOCUS T-like gene family in barley – (*Hordeum vulgare*) / Faure S., Higgins J., Turner A., Laurie D. A. // *Genetics* – 2007. – T. 176 – №1 – C. 599-609.
112. Fetch T.G. Rating scales for assessing infection responses of barley

- infected with *Cochliobolus sativus* / Fetch T.G., Steffenson B.J. // Plant Disease – 1999. T. 83 – №3 – C. 213–217. doi: 10.1094/PDIS.1999.83.3.213.
113. Gawenda I. Genome-wide association studies in elite varieties of german winter barley using single-marker and haplotype-based methods / Gawenda I., Thorwarth P., Günther T., Ordon F., Schmid K.J. // Plant Breeding – 2015. – T. 134 – №1 – C. 28–39. <https://doi.org/10.1111/pbr.12237>.
114. Genievsckaya Y. Marker-trait associations in two-rowed spring barley accessions from Kazakhstan and the USA / Genievsckaya Y., Almerkova S., Sariev B., Chudinov V., Tokhetova L., Sereda G, Ortaev A., et al. // PLOS ONE – 2018. – T. 13 – №10 – e0205421. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205421>.
115. Ghazvini H. Molecular diversity in the barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* – (*Cochliobolus sativus*) / Ghazvini H., Tekauz, A. // Australasian Plant Pathology, 41, p. 283–293.
116. Ghazvini H. Virulence diversity in the population of *Bipolaris sorokiniana* / Ghazvini H., Tekauz A. // Plant Disease - 2007, 91– №7 – C. 814–821.
117. Goff S.A. A draft sequence of the rice genome – (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) / Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Macalma T., Oliphant, A., Briggs S. // Science – 2002. – T. 296 – №5565 – C. 92–100.
118. Göransson M. Identification of ideal allele combinations for the adaptation of spring barley to northern latitudes / Göransson M., Hallsson J.H., Lillemo M., Orabi J., Backes G., Jahoor A., Hermannsson J., et al.'. Frontiers in Plant Science – 2019. – T. 10 - C 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00542>.
119. Gower J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis / Gower J.C. // Biometrika – 1966. – T. 53 – №3-4 – C. 325-338.

120. Graner A. Construction of an RFLP map of barley / Graner A., Jahoor A., Schondelmaier J., Siedler H., Pillen K., Fischbeck G., Herrmann R.G. // Theoretical and Applied Genetics – 1991. – T. 83 – №2 – C. 250-256.
121. Grant M.R. Structure of the Arabidopsis RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance / Grant M.R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Dangl J. L. / Science – 1995. – T. 269 – №5225 – C. 843-846.
122. Grewal T.S. Mapping quantitative trait loci associated with barley net blotch resistance / Grewal T.S., Rossnagel B.G., Pozniak C.J., Scoles G.J. // Theoretical and Applied Genetics – 2008. – T. 116 – №4 – C. 529–539. doi: 10.1007/s00122-007-0688-9.
123. Grewal T.S. Mapping quantitative trait loci associated with spot blotch and net blotch resistance in a doubled-haploid barley population / Grewal T.S., Rossnagel B.G., Scoles G.J. // Molecular Breeding – 2012. T. 30 – №1 – C. 267–279. doi: 10.1007/s11032-011-9616-4.
124. Gupta P. K. Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding / Gupta P. K., Chand R., Vasistha N. K., Pandey S. P., Kumar U., Mishra V. K., Joshi A. K. // Plant pathology – 2018. – T. 67 – №3 – C. 508-531.
125. Gustafson A. M. Towards the identification of essential genes using targeted genome sequencing and comparative analysis / Gustafson A. M., Snitkin E. S., Parker S. C., DeLisi C., Kasif S. – №200 // BMC Genomics – 2006. – T. 7 – №1 – C. 1-16.
126. Gutiérrez L. Genome-wide association mapping identifies disease-resistance QTLs in barley germplasm from Latin America / Gutiérrez L., Berberian N., Capettini F., Falcioni E., Fros D., Germán S., Castro A. // In Advance in Barley Sciences – 2013. – C. 209–215. doi: 10.1007/978-94-007-

- 4682-4_18.
127. Gutiérrez L. Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America / Gutiérrez L., Germán, S., Pereyra S., Hayes P. M., Pérez C. A., Capettini F., Castro A. J. // Theoretical and applied genetics – 2015. – T. 128 – №3 – C. 501-516.
 128. Gutiérrez L. Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America / Gutiérrez L., Germán S., Pereyra S., Hayes P.M., Pérez C.A., Capettini F., Castro A.J. // Theoretical and Applied Genetics. 128– №3 – C. 501–516. doi: 10.1007/s00122-014-2448-y.
 129. Gyawali S. Genome wide association studies (GWAS) of spot blotch resistance at the seedling and the adult plant stages in a collection of spring barley / Gyawali S., Chao S., Vaish S.S., Singh S.P., Rehman S., Vishwakarma S.R., Verma R.P.S. // Molecular Breeding – 2018. – T. 38 – №5 – C. 62. doi: 10.1007/s11032-018-0815-0.
 130. Gyawali S. Genome-wide association studies revealed novel stripe rust resistance QTL in barley at seedling and adult-plant stages / Gyawali S., Mamidi S., Chao S., Bhardwaj S. C., Shekhawat P. S., Selvakumar R., Verma R. P. S. // Euphytica – 2021. – T. 217 – №1 – C. 1–18.
 131. Haas M. Mapping quantitative trait loci conferring resistance to a widely virulent isolate of *Cochliobolus sativus* in wild barley accession PI 466423 / Haas M., Menke J., Chao S., Steffenson B.J. // Theoretical and Applied Genetics – 2016. – T. 129 – №10 – C. 1831–1842. doi: 10.1007/s00122-016-2742-y.
 132. Hamblin M. T. Population genetics of genomics-based crop improvement methods / Hamblin M. T., Buckler E. S., Jannink J. L. // Trends in Genetics – 2011. – T. 27 – №3 – C. 98-106.
 133. Hammer Ø. PAST–Paleontological statistics / Hammer Ø., Harper D.A.T.,

- Ryan P.D. // ver. 2.17 – 2006. Distributed by author.
134. Hardham A.R. Cell biology of fungal and oomycete infection of plants // The Mycota / ed. by R. J. Howard, N. A. R. Gow. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg – Vol VIII. Biology of the Fungal Cell – 2007. – C. 251—289.
135. Harlan JR. Barley / Harlan JR. // Evolution of crop plants – 1995. – C. 140–147.
136. Haseneyer G. DNA Polymorphisms and haplotype patterns of transcription factors involved in barley endosperm development are associated with key agronomic traits / Haseneyer G, Stracke S., Piepho H.P., Sauer S., Geiger H.H., Graner A. // BMC Plant Biology – 2010. – T. 10 – №1 – C. 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-5>.
137. He Z. Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1 / He Z., Wang Z.Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P., Chory J. // Science – 2000. T. 288 – №5475 – C. 2360–2363. doi: 10.1126/science.288.5475.2360.
138. Hommel G. A stagewise rejective multiple test procedure based on a modified Bonferroni test / Hommel G. // Biometrika – 1988. – T. 75– №2 – C. 383-386.
139. Horst R. K. Westcott's plant disease handbook / Horst R. K. // Springer Science & Business Media – 2013.
140. Hyne V. QTL analysis: further uses of 'marker regression / Hyne V., Kearsey M.J. // Theoretical and Applied Genetics – 1995. – T. 91 – №3 – C. 471–76. doi: 10.1007/BF00222975.
141. Ingvordsen C. H. Genome-wide association study of production and stability traits in barley cultivated under future climate scenarios / Ingvordsen C. H., Backes G., Lyngkjær M. F., Peltonen-Sainio P., Jahoor A., Mikkelsen T. N., Jørgensen R. B. // Molecular Breeding – 2015. – T. 35 – №3 – C. 1-14.

142. International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome / Apels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., ... Singh, N. K. // *Science* – 2018. – T. 361 – №6403 – eaar7191.
143. Jabbari M. GWAS analysis in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) for morphological traits exposed to drought / Jabbari M., Fakheri B. A., Aghnoum R., Mahdi N., Ataei R. // *PloS one* – 2018. – T. 13 – №9 – e0204952.
144. Jayakodi M. The barley pan-genome reveals the hidden legacy of mutation breeding / Jayakodi M., Padmarasu S., Haberer G., Bonthala V. S., Gundlach H., Monat C., ... Stein N. // *Nature* – 2020. – T. 588 – №7837 – C. 284-289.
145. Jensen J. Estimation of recombination parameters between a quantitative trait locus (QTL) and two marker gene loci / Jensen J. // *Theoretical and Applied Genetics* – 1989. – T. 78 – №5 – C. 613–18. doi: 10.1007/BF00262554.
146. Jerbi M. Higher temperatures and lower annual rainfall do not restrict, directly or indirectly, the mycorrhizal colonization of barley (*Hordeum vulgare* L.) under rainfed conditions / Jerbi M., Labidi S., Lounès-Hadj Sahraoui A., Chaar H., Ben Jeddi F. // *PloS one* – 2020. T. 15 – №11 – e0241794.
147. Jia Z. Genetic dissection of root system architectural traits in spring barley / Jia Z., Liu Y., Gruber B.D., Neumann K., Kilian B., Graner A., von Wirén N. // *Frontiers in Plant Science* – 2019. – T. 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00400>.
148. Jones D.A., The role of leucine-rich repeat proteins in plant defenses / Jones D.A., Jones, J.D.G. // *Advances in botanical research* – 1997. T. 24 – C. 90-167.
149. Jones J.D.G. The plant immune system / Jones J.D.G., Dang J. L. // *Nature* – 2006. – T. 444 – C. 323–329.
150. Karakousis A. Potential of SSR markers for plant breeding and variety

- identification in Australian barley germplasm / Karakousis A., Barr A.R., Chalmers K.J., Ablett G.A., Holton T.A., Henry R.J., Lim P., Langridge P. // Australian Journal of Agricultural Research – 2003. T. 54 – №11–12 – C. 1197–1210, doi: 10.1071/ar02178.
151. Kaul S. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* / Kaul S., Koo H. L., Jenkins J., Rizzo M., Rooney T., Tallon L. J., ... Somerville M. C. // Nature – 2000. – T. 408 – №6814 – C. 796–815.
152. Kearsey M. J. QTL analysis in plants; where are we now? / Kearsey M. J. and Farquhar, A. G. L. // Heredity – 1998. – T. 80 – №2 – C. 137–142. doi: 10.1038/sj.hdy.6885001.
153. Khlestkin V. K. Genetic loci determining potato starch yield and granule morphology revealed by genome-wide association study (GWAS) / Khlestkin V. K., Erst T. V., Rozanova I. V., Efimov V. M., Khlestkina E. K. // PeerJ – 2020. – T. 8 – e10286.
154. Koladia V. M. Genetic analysis of net form net blotch resistance in barley lines CIho 5791 and Tifang against a global collection of *P. teres* f. *teres* isolates / Koladia V. M., Faris, J. D., Richards, J. K., Brueggeman, R. S., Chao, S., Friesen, T.L. // Theoretical and Applied Genetics – 2017. – T. 130 – №1 – C. 163–173. doi: 10.1007/s00122-016-2801-4.
155. Konieczny A. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers / Konieczny A., Ausubel F.M. // The plant journal – 1993. – T. 4 – №2 – C. 403-410.
156. König J. Mapping seedling resistance to net form of net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in barley using detached leaf assay / König J., Perovic D., Kopahnke D., Ordon F. // Plant Breeding – 2014. – T. 133 – №3 – C. 356–365. doi: 10.1111/pbr.12147.

157. Krishnan A. Partial least squares (PLS) methods for neuroimaging: a tutorial and review / Krishnan A., Williams L.J., McIntosh A.R., Abdi H. // *Neuroimage* – 2011. – T. 56 – №2 – C. 455-475.
158. Kuldeep T. Inheritance and identification of molecular markers associated with spot blotch (*Cochliobolus sativus* L.) resistance through microsatellites analysis in barley / Kuldeep T., Nandan R., Kumar U., Prasad L.C., Chand R., Joshi A. K. // *Genetics and Molecular Biology* – 2008. – T. 31 – №3 – C. 734-742.
159. Kumar J. A compromised Mlo pathway affects the response of barley to the necrotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana* (teleomorph: *Cochliobolus sativus*) and its toxins / Hückelhoven, R., Beckhove U., Nagarajan S., Kogel K.H. // *Phytopathology* – 2001. T. 91 – №2 – C. 127-133.
160. Kumar N. QTL mapping for yield and yield contributing traits in two mapping populations of bread wheat / Kumar N, Kulwal PL, Balyan HS, Gupta PK // *Molecular Breeding* – 2007. – T. 19 – №2 – C. 63–177.
161. Kutcher H.R. Heritability of common root rot and spot blotch resistance in barley / Kutcher H.R., Bailey K.L., Rossnagel B.G., Legge W.G. // *Canadian Journal of Plant Pathology* – 1994. – T. 16 – №4 – C. 287–294. doi: 10.1080/07060669409500733.
162. Kutcher H.R. Identification of RAPD markers for common root rot and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) resistance in barley / Kutcher H.R., Bailey K.L., Rossnagel B.G., Legge W.G. // *Genome* – 1996. T. 39 – №1 – C. 206–215. doi: 10.1139/g96-027.
163. Lai K. WheatGenome. info: an integrated database and portal for wheat genome information / Lai K., Berkman P. J., Lorenc M. T., Duran C., Smits L., Manoli S., ... Edwards D. // *Plant and Cell Physiology* – 2012. – T. 53 – №2 – c), e2-e2.

164. Langridge P. Untitled-Preface / Langridge P., Barr A. R. // Australian Journal of Agricultural Research – 2003. – T. 54 – №11-12 – C. I-IV.
165. Lehmensiek A. Mapping of adult plant resistance to net form of net blotch in three Australian barley populations / Lehmensiek A., Platz G.J., Mace E., Poulsen D., Sutherland M.W. // Australian Journal of Agricultural Research – 2008. – T. 58 – №12 – C. 1191–1197.
166. Leipe D.D. STAND, a class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer / Leipe D.D., Koonin E.V., Aravind L. // Journal Molecular Biology – 2004. – T. 343 – C. 1-28. doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.023.
167. Leng Y. Sources and genetics of spot blotch resistance to a new pathotype of *Cochliobolus sativus* in the USDA National small grains collection / Leng Y., Wang R., Ali S., Zhao M., Zhong S. // Plant Disease – 2016. – T. 100 – C. 1988–1993.
168. Leng Y. The gene conferring susceptibility to spot blotch caused by *Cochliobolus sativus* is located at the Mla locus in barley cultivar Bowman / Leng Y., Zhao M., Wang R., Steffenson B.J., Brueggeman R.S., Zhong S. // Theoretical and Applied Genetics – 2018. – T. 131 – №7 – C. 1531–1539. doi: 10.1007/s00122-018-3095-5.
169. Levitin M. M. Comparative analysis of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem. population for virulence / Levitin M. M., Petrova A. N., Afanasenko O. S. // Mikologiya i Fitopatologiya – 1985. T. 19 – C. 154-158.
170. Li M. Genome-wide association study on total starch, amylose and amylopectin in barley grain reveals novel putative alleles / Li M., Geng L., Xie S., Wu D., Ye L., Zhang G. // International journal of molecular sciences – 2021. T. 22 – №2 – C. 553.

171. Lipka A. E. From association to prediction: statistical methods for the dissection and selection of complex traits in plants / Lipka A. E., Kandianis C. B., Hudson M. E., Yu J., Drnevich J., Bradbury P. J., Gore M. A. // *Current Opinion in Plant Biology* – 2015. – T. 24 – C. 110-118.
172. Liu Z. *Pyrenophora teres*: Profile of an increasingly damaging barley pathogen / Liu Z., Ellwood S. R., Oliver R. P., Friesen T. L. // *Molecular Plant Pathology* – 2011. – T. 12 – №1 – C. 1–19. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00649.x.
173. Liu Z.W. Development of simple sequence repeat DNA markers and their integration into a barley linkage map / Liu Z.W., Biyashev R.M., Maroof M.S. // *Theoretical and Applied Genetics* – 1996. – T. 93 – №5-6 – C. 869-876.
174. Locatelli A. Genome-wide association mapping of agronomic traits in relevant barley germplasm in Uruguay / Locatelli A., Cuesta-Marcos A., Gutiérrez L., Hayes P.M., Smith K.P., Castro A.J. // *Molecular Breeding* – 2013. – T. 31 – №3 – C. 631–54. <https://doi.org/10.1007/s11032-012-9820-x>.
175. Mamo B. E. Genome-wide association mapping of zinc and iron concentration in barley landraces from Ethiopia and Eritrea / Mamo B. E., Barber B. L., Steffenson B. J. // *Journal of cereal science* – 2014. – T. 60 – №3 – C. 497-506.
176. Mardis E. R. Next-generation DNA sequencing methods / Mardis E. R. // *Annual review of genomics and human genetics* – 2008. – T. 9 – №1 – C. 387-402.
177. Maroof M.S. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics / Maroof M.S., Biyashev R.M., Yang G.P., Zhang Q., Allard R.W. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 1994. T. 91 – №12 – C. 5466-5470.
178. Martin A. Identification and mapping of net form of net blotch resistance in

- South African barley / Martin A., Platz G. J., de Klerk D., Fowler R.A., Smit F., Potgieter F.G., Prins R. // *Molecular Breeding* – 2018. – T. 38 – №5 – C. 53. doi: 10.1007/s11032-018-0814-1.
179. Mascher M. A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome / Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok S.O., Wicker T., Stein N. // *Nature* – 2017. – T. 544 – №7651 – C. 427–433. doi: 10.1038/nature22043.
180. Mascher M. Barley whole exome capture: A tool for genomic research in the genus *Hordeum* and beyond / Mascher M., Richmond T.A., Gerhardt D.J., Himmelbach A., Clissold L., Sampath D., Stein N. // *Plant Journal* – 2013. – T. 76 – №3 – C. 494–505. doi: 10.1111/tpj.12294.
181. Mascher M. Long-read sequence assembly: a technical evaluation in barley / Mascher M., Wicker T., Jenkins J., Plott C., Lux T., Koh C. S., ... Stein N. // *The Plant Cell* – 2021. – T. 33 – №6 – C. 1888-1906.
182. Massman J. Genome-wide association mapping of *Fusarium* head blight resistance in contemporary barley breeding germplasm / Massman J., Cooper B., Horsley R., Neate S., Dill-Macky R., Chao S., ... Smith K. P. // *Molecular breeding* – 2011. – T. 27 – №4 – C. 439-454.
183. Maurer A. Genomic dissection of plant development and its impact on thousand grain weight in barley through nested association mapping / Maurer A., Draba V., Pillen K. // *Journal of Experimental Botany* – 2016. – T. 67 – №8 – C. 2507–18. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw070>.
184. McHale L. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards / McHale L., Tan X., Koehl P., Michelmore R.W. // *Genome biology* – 2006. – T. 7– №4 – C. 1-11.
185. McIntosh A.R. Spatial pattern analysis of functional brain images using partial least squares / McIntosh A.R., Bookstein F.L., Haxby J.V., Grady C.L. //

- Neuroimage – 1996. – T. 3– №3 – C. 143-157.
186. Mehri N. Proteomic analysis of wheat contrasting genotypes reveals the interplay between primary metabolic and regulatory pathways in anthers under drought stress / Mehri N., Fotovat R., Mirzaei M., Fard E.M., Parsamatin P., Hasan M.T., Salekdeh G.H. // Journal of Proteomics – 2020. – T. – 226 – C. 103895.
187. Meldrum S. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in Australia / Meldrum S., Platz D., Ogle H. // Australasian Plant Pathology – 2004. – T. 33 – №1 – C. 109-114.
188. Meyer M. Targeted high-throughput sequencing of tagged nucleic acid samples / Meyer M., Stenzel U., Myles S., Prüfer K., Hofreiter M. // Nucleic acids research – 2007 – T. 35 – №15 – e97.
189. Meyers B.C. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis / Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H., Michelmore R.W. // Plant Cell – 2003. – T. 15 – C. 809-834. doi: 10.1105/tpc.009308.
190. Meyers B.C. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily / Meyers B.C., Dickerman A.W., Michelmore R.W., Sivaramakrishnan S., Sobral B.W., Young N.D. // Plant Journal – 1999. – T. 20 – C. 317-332.
191. Miedaner T. Applications of genetic and genomic research in cereals / Miedaner T., Korzun V. // Woodhead Publishing – 2018.
192. Miga K.H. Telomere-to-telomere assembly of a complete human X chromosome / Miga K.H., Koren, S., Rhie, A., Vollger, M.R., Gershman, A., Bzikadze, A., Brooks, S., Howe, E., Porubsky, D., Logsdon, G.A., et al. – №2020) // Nature – 2020. - -T. 585 – C. 79–84
193. Mindrinos M. The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats / Mindrinos

- M., Katagiri F., Yu G.L., Ausubel F.M. // *Cell* – 1994. – Т. 78 – №6 – С. 1089-1099.
194. Moffett P. Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death / Moffett P., Farnham G., Peart J., Baulcombe D.C. // *EMBO J* – 2002. – Т. 21 – С. 4511-4519. doi: 10.1093/emboj/cdf453.
195. Monat C. TRITEX: chromosome-scale sequence assembly of Triticeae genomes with open-source tools / Monat C., Padmarasu, S., Lux, T., Wicker, T., Gundlach, H., Himmelbach, A., Ens, J., Li, C., Muehlbauer, G.J., Schulman, A.H. и др. // *Genome biology* – 2019. – Т. 20 – С. 284
196. Morozova O. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics / Morozova O., Marra, M. A. // *Genomics* – 2008. Т. 92 – №5 – С. 255-264.
197. Morris M. Money matters (II): Costs of maize inbred line conversion schemes at CIMMYT using conventional and marker-assisted selection / Morris M., Dreher K., Ribaut J.M., Khairallah M. // *Molecular Breeding* – 2003. – Т. 11 – №3 – С. 235–247, doi: 10.1023/A:1022872604743.
198. Muñoz-Amatriaín M. The USDA barley core collection: genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies / Muñoz-Amatriaín M., Cuesta-Marcos A., Endelman J.B., Comadran J., Bonman J.M., Bockelman H.E., Chao S., и др. // *PLoS ONE* – 2014. – Т. 9 – №4 – С. 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094688>.
199. Murray G.M. Estimating disease losses to the Australian wheat industry / Murray G.M., Brennan J.P. // *Australasian Plant Pathology* – 2009. – Т. 38 – №6 – С. 558–570. doi: 10.1071/AP09053.
200. Muthamilarasan M. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism / Muthamilarasan M., & Prasad M. // *Journal of biosciences* – 2013.

- T. 38 – №2 – C. 433-449.
201. Mykhalska L.M. Distribution of species of *Fusarium* and *Alternaria* genera on cereals in Ukraine / Mykhalska L.M., Sanin O. Y., Schwartau V.V., Zozulia O. L., Hrytsev O.A. // *Biosystems Diversity* – 2019. – T. 27 – №2 – C. 186–191. doi: 10.15421/011925.
202. Myles S. An assessment of the portability of ancestry informative markers between human populations / Myles S., Stoneking M., Timpson, N. // *BMC medical genomics* – 2009. – T. 2 – №1 – C. 1-10.
203. Neumann K. Genetic architecture and temporal patterns of biomass accumulation in spring barley revealed by image analysis / Neumann K., Zhao Y., Chu J., Keilwagen J., Reif J.C., Kilian B., Graner A. // *BMC Plant Biology* – 2017. – T. 17 – №1 – C. 137. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1085-4>.
204. Niks R.E. Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? / Niks R.E., Marcel, T.C. // *New Phytol* – 2009. – T. 182 – C. 817-828.
205. Novakazi F. Genetic analysis of a worldwide barley collection for resistance to net form of net blotch disease (*Pyrenophora teres* f. *teres*) / Novakazi F., Afanasenko O., Anisimova A., Platz G.J., Snowdon R., Kovaleva O., Ordon F. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2019. – T. 132 – №9 – C. 2633–2650. doi: 10.1007/s00122-019-03378-1.
206. Novakazi F. Genome-wide association studies in a barley (*Hordeum vulgare*) diversity set reveal a limited number of loci for resistance to spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) / Novakazi F., Afanasenko O., Lashina N., Platz G.J., Snowdon R., Loskutov I., Ordon F. // *Plant Breeding* – 2019. – T. October – C. 1–15. doi: 10.1111/pbr.12792.
207. Nyiraguirwa S. A genome-wide association study identifying single-nucleotide polymorphisms for iron and zinc biofortification in a worldwide barley collection / Nyiraguirwa S., Grana Z., Ouabbou H., Iraqi D., Ibriz M.,

- Mamidi S., Udupa S. M. // *Plants* – 2022. – T. 11 – №10 – C. 1349.
208. O'Brien H. E. Evolution of plant pathogenesis in *Pseudomonas syringae*: a genomics perspective / O'Brien H. E., Thakur, S., Guttman, D. S. // *Annual review of phytopathology* – 2011. – T. 49 – C. 269-289.
209. Okonechnikov K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / Okonechnikov K., Golosova, O., Fursov, M., и Ugene Team // *Bioinformatics* – 2012. – T. 28 – №8 – C. 1166-1167.
210. Pan Q. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes / Pan Q., Wendel J., Fluhr R // *Journal of molecular evolution* – 2000. – T. 50 – C. 203-213.
211. Pasam R. K. Genome-wide association studies for agronomical traits in a world wide spring barley collection / Pasam R. K., Sharma R., Malosetti M., van Eeuwijk F.A., Haseneyer G., Kilian B., Graner A. // *BMC Plant Biology* – T. 12 – №1 – C. 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-16>.
212. Pauli D. Association mapping of agronomic QTLs in U.S. spring barley breeding germplasm / Pauli D., Muehlbauer G.J., Smith K.P., Cooper B., Hole D. // *The Plant Genome* – 2014. – T. 7 – №3 – C. 0. doi: 10.3835/plantgenome2013.11.0037.
213. Pham A. T. Genome-wide association of barley plant growth under drought stress using a nested association mapping population / Pham A. T., Maurer, A., Pillen, K., Brien, C., Dowling, K., Berger, B., ... March, T. J. // *BMC plant biology* – 2019. – T. 19 – №1 – C. 1-16.
214. Piening L.J. Effects of crop rotation on common root rot of barley - Piening L.J., Orr D. // *Canadian Journal of Plant Pathology* – 1988. T 10 – №1 – C. 61–65. doi: 10.1080/07060668809501766.
215. Plaschke J. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers / Plaschke J., Ganal M.W., Röder M.S. //

- Theoretical and Applied Genetics – 1995. – T. 191 – C. 1001–1007.
216. Pritchard J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly, P. // Genetics – 2000. – T. 155 – №2 – C. 945–959.
217. Radyukevich T.N. Assessment of new collection samples of barley according to commercially valuable traits in the conditions of north-west of Russia / Radyukevich T.N., Bondareva L., Kartasheva L. // Perm Agrarian Journal – 2018. – T. 4 – C. 76-82.
218. Rajendran N. R. Genotyping by sequencing advancements in barley / Rajendran N. R., Qureshi N., Pourkheirandish M. // Frontiers in Plant Science – 2022. – T. 13 – № 931423 – C. 1-19. doi: 10.3389/fpls.2022.931423
219. Rasheed A. Crop breeding chips and genotyping platforms: progress, challenges, and perspectives / Rasheed A., Hao Y., Xia X., Khan A., Xu Y., Varshney R.K., He Z. // Molecular plant – 2017. – T. 10 – №8 – C. 1047-1064.
220. Richards J.K. Association mapping utilizing diverse barley lines reveals net form net blotch seedling resistance/susceptibility loci / Richards J.K., Friesen T.L., Brueggeman R.S. // Theoretical and Applied Genetics – 2017. – T. 130 – №5 – C. 915–927. doi: 10.1007/s00122-017-2860-1.
221. Richardson A. Cloning and expression analysis of candidate genes involved in wax deposition along the growing barley (*Hordeum vulgare*) leaf / Richards J.K., Friesen T.L., Brueggeman R.S. // Planta 2007. – T. 226 – №6 – C. 1459-1473.;
222. Richter K. Mapping of quantitative trait loci affecting Drechslera teres resistance in barley with molecular markers / Richter K., Schondelmaier J., Jung C. // Theoretical and Applied Genetics – 1998. – T. 97 – №8 – C. 1225-1234.
223. Rick C. M. Isozyme monitoring of genetic variation in Lycopersicon / Rick C. M., Tanksley S. D. // Isozymes – 1983. – T. 11 – C. 269-284.

224. Robinson R.A. Host management in crop pathosystems / Robinson R. A. // Macmillan Publishing Company – 1987.
225. Rostoks N. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress / Rostoks N., Mudie S., Cardle L., Russell J., Ramsay L., Booth A., Svensson J.T., Waugh R. // *Molecular Genetics and Genomics* – 2006. – T. 274 – №5 – C. 515–27. doi: 10.1007/s00438-005-0046-z.
226. Roy J.K. Association mapping of spot blotch resistance in wild barley / Roy J.K., Smith K.P., Muehlbauer G.J., Chao S., Close T.J., Steffenson B.J. // *Molecular Breeding* – 2010. – T. 26 – №2 – C. 243–256. doi: 10.1007/s11032-010-9402-8.
227. Rozanova I.V. SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres* f. *teres* / Rozanova I.V., Lashina N.M., Mustafin Z.S., Gorobets S.A., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. // *BMC Genomics* – 2019. – T. 20 – №3 – C. 1-10. doi: 10.1186/s12864-019-5623-3.
228. Rozanova I.V. The in-silico development of DNA markers for breeding of spring barley varieties that are resistant to spot blotch in Russia / Rozanova I.V., Lashina N.M., Efimov V.M., Afanasenko O.S., Khlestkina E.K. // *Agriculture* – 2020. – T. 10 – №11 – C. 505
229. Salmeron J.M. Tomato Prf is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the Pto kinase gene cluster / Salmeron J.M., Oldroyd G.E., Rommens C.M., Scofield S.R., Kim H.S., Lavelle D.T., Staskawicz B.J. // *Cell* – 1996. T. 86 – №1 – C. 123–133. doi: 10.1016/S0092-8674(96)80083-5.
230. Schulte D. Update on the international barley sequencing Consortium the international barley sequencing Consortium—At the Threshold of Efficient Access to the Barley Genome / Schulte D., Close T.J., Graner A., Langridge P.,

- Matsumoto T., Muehlbauer G., Stein N. // Plant physiology – 2009. – T. 149 – №1 – C. 142–147. doi: 10.1104/p.108.128967.
231. Schulze-Lefert P. A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation / Schulze-Lefert P., Panstruga R. // Trends in plant science – 2011. – T. 16 – №3 – C. 117-125.
232. Schuy C. Deciphering the genetic basis for vitamin E accumulation in leaves and grains of different barley accessions / Schuy C., Groth J., Ammon A., Eydam J., Baier S., Schweizer G., Hanemann A., Herz M., Voll L. M., Sonnewald U. // Scientific Reports – 2019. – T. 9 – №1 – C. 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45572-7>.
233. Scofield S.R. Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato / Scofield S.R., Tobias C.M., Rathjen J.P., Chang J.H., Lavelle D.T., Michelmore R.W., Staskawicz B.J. // Science – 1996. – T. 274 – №5295 – C. 2063–2065. doi: 10.1126/science.274.5295.2063.
234. Semagn K. Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement / Semagn K., Babu R., Hearne S., Olsen M. // Molecular breeding – 2014. – T. 33 – №1 – C. 1-14.
235. Serenius M. Population structure of *Pyrenophora teres*, the causal agent of net blotch of barley / Serenius M. // Agrifood Research Reports – 2006. – №78.
236. Shan L. Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity / Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S. C., Nürnberger T., ... Sheen J. // Cell host & microbe – 2008. – T. 4 – №1 – C. 17-27.
237. Sharma R., Genome-wide association of yield traits in a nested association mapping population of barley reveals new gene diversity for future breeding /

- Sharma R., Draicchio F., Bull H., Herzig P., Maurer A., Pillen K., Thomas W.T.B., Flavell A.J. // *Journal of Experimental Botany* – 2018. – Т. 69 – №16 – С. 3811–22. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery178>.
238. Shen Q.H. Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses / Shen Q.H., Saijo Y., Mauch S., Biskup C., Bieri S., Keller B., Schulze-Lefert P. // *Science* – 2007. – Т. 315 – №5815 – С. 1098–1103. doi: 10.1126/science.1136372.
239. Shewry P. R. Barley: chemistry and technology / Shewry P. R. Ullrich S. E. // Wallingford, American Association of Cereal Chemists, Inc. (AACC)/CAB International – 2014. – 2nd edn.
240. Shin J.S. A partial map of the barley genome incorporating restriction fragment length polymorphism, polymerase chain reaction, isozyme, and morphological marker loci / Shin J.S., Chao S., Corpuz L., Blake T. // *Genome* – 1990. – Т. 33 – №6 – С. 803-810.
241. Shipton W. A. Net blotch of barley / Shipton W. A. // *Journal of the Department of Agriculture* – 1966. – Серия 4 – Т. 7 – №3 – С. 132-133.
242. Shirasu K. Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways / Shirasu K., Schulze-Lefert P. // *Trends in plant science* – 2003. – Т. 8 – №6 – С. 252-258.
243. Shu X. Quantification of amylose, amylopectin, and β -glucan in search for genes controlling the three major quality traits in barley by genome-wide association studies / Shu X., Rasmussen S. K. // *Frontiers in plant science* – 2014. – Т. 5 – С. 197.
244. Skiba R. M. Host and pathogen genetics reveal an inverse gene-for-gene association in the *P. teres* f. *maculata*–barley pathosystem / Skiba R. M., Wyatt N. A., Kariyawasam G. K., Fiedler J. D., Yang S., Brueggeman R. S., Friesen T. L. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2022. – Т. 135 – №10 – С. 3597-3609.

245. Steffenson B. Genetics of seedling and adult plant resistance to net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) and spot blotch (*Cochliobolus sativus*) in barley / Steffenson B., Hayes P., Kleinhofs A. // Theoretical and Applied Genetics – 1996. – T. 92 – C. 552–558.
246. Steffenson J. Pathotype diversity of *Pyrenophora teres* f. *teres* on barley / Steffenson J., Webster, R.K. // Phytopathology – 1992. – T. 82 – C. 170–177.
247. Szabo L.J. Hidden robbers: the role of fungal haustoria in parasitism of plants / Szabo L.J., Bushnell W.R. // National Academy of Sciences – 2001. – T. 98 – №14 – C. 7654-7765. doi: 10.1073/pnas.151262398
248. Tamang P. Association mapping of seedling resistance to spot form net blotch in a worldwide collection of barley / Tamang P., Neupane A., Mamidi S., Friesen T., Brueggeman R. // Phytopathology – 2015. – T. 105 – №4 – C. 500–508. doi: 10.1094/PHYTO-04-14-0106-R.
249. Tavakol E. Genetic dissection of heading date and yield under mediterranean dry climate in barley (*Hordeum Vulgare* L.) / Tavakol E., Elbadry N., Tondelli A., Cattivelli L., Rossini L. // Euphytica – 2016. – T. 212 – №2 – C. 343–53. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1785-0>.
250. Tekauz A. A Numerical scale to classify reactions of barley to *Pyrenophora teres* / Tekauz A. // Canadian Journal of Plant Pathology – 1985. – T. 7 – №2 – C. 181–183. doi: 10.1080/07060668509501499
251. Tekauz A. Characterization and distribution of pathogenic variation in *Pyrenophora teres* f. *teres* and *P. teres* f. *maculata* from western canada / Tekauz A. // Canadian Journal of Plant Pathology – 1990. – T. 12 – №2 – C. 141–148. doi: 10.1080/07060669009501017.
252. Templer S. E. Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defense / Templer S. E., Ammon A., Pscheidt D.,

- Ciobotea O., Schuy C., McCollum C., ... Voll L. M. // Journal of experimental botany – 2017. – T. 68 – №7 – C. 1697-1713.
253. Thabet S. G. Exploring natural diversity reveals alleles to enhance antioxidant system in barley under salt stress / Thabet S. G., Alomari D. Z., Alqudah A. M. // Plant Physiology and Biochemistry – 2021. – T. 166 – C. 789-798.
254. Thabet S. G. Genetic basis of drought tolerance during seed germination in barley / Thabet S. G., Moursi Y. S., Karam M. A., Graner A., Alqudah A. M. // PloS one – 2018. – T. 13 – №11 – e0206682.
255. Thirulogachandar V. Leaf primordium size specifies leaf width and vein number among row-type classes in barley / Thirulogachandar V., Ahmad M. A.M., Kopolu R., Rutten T., Graner A., Hensel G., Kumlehn J. // The Plant Journal – 2017. – T. 91 – №4 – C. 601–12. <https://doi.org/10.1111/tpj.13590>.
256. Tsai H. Y. Genomic prediction and GWAS of yield, quality and disease-related traits in spring barley and winter wheat / Tsai H. Y., Janss L. L., Andersen J. R., Orabi J., Jensen J. D., Jahoor A., Jensen, J. // Scientific reports – 2020. – T. 10 – №1 – C. 1-15.
257. Turuspekov Y. Genome-wide association study on stem rust resistance in Kazakh spring barley lines / Turuspekov Y., Ormanbekova D., Rsaliev A., Abugalieva S. // BMC plant biology – 2016. – T. 16 – №1 – C. 13-21.
258. Valjavec-Gratian M. Pathotypes of *Cochliobolus sativus* on barley in North Dakota / Valjavec-Gratian M., Steffenson B // Plant Disease – 1997. – T. 81 – C. 1275–1278.
259. van der Hoorn R. A. From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors / van der Hoorn R. A., Kamoun S. // The Plant Cell – 2008. – T. 20 – №8 – C. 2009-2017.
260. Van Ginkel M. Breeding for resistance to spot blotch in wheat: Global

- perspective / Van Ginkel M., Rajaram S. // Helminthosporium blights of wheat: Spot blotch and tan spot – 1998. – C. 162-170.
261. Vatter T. A nested association mapping population identifies multiple small effect QTL conferring resistance against net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in wild barley / Vatter T., Maurer A., Kopahnke D., Perovic D., Ordon F., Pillen K. // PLoS One – 2017. – T. 12 – №10 – C. e0186803. doi: 10.1371/journal.pone.0186803.
262. Venu R.C. Large scale identification of genes involved in plant–fungal interactions using illumina’s sequencing-by-synthesis technology / Venu R.C., Zhang Y., Weaver B., Carswell P., Mitchell T. K., Meyers B. C., ... Wang G. L. // In Fungal Genomics – 2011. – C. 167-178.
263. Visionsi A. Genome-wide association mapping of frost tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.) / Visionsi A., Tondelli A., Francia E., Pswarayi A., Malosetti M., Russell J., ... Comadran J. // BMC genomics – 2013 – T. 14 – №1 – C. 1-13.
264. Vos P. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting / Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.V.D., Hornes M., Zabeau M. // Nucleic acids research – 1995. – T. 23 – №21 – C. 4407-4414.
265. Wabila C. A tiered approach to genome-wide association analysis for the adherence of hulls to the caryopsis of barley seeds reveals footprints of selection / Wabila C., Neumann K., Kilian B, Radchuk, V., and Graner, A. // BMC Plant Biology – 2019. – T. 19 – №1 – C. 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1694-1>.
266. Wallwork H. Pathogen diversity and screening for minor gene resistance to *Pyrenophora teres* f. *teres* in barley and its use for plant breeding / Wallwork H., Butt M., Capio E. // Australasian Plant Pathology. 45– №5 – C. 527–531. doi: 10.1007/s13313-016-0433-4.

267. Wang R. Fine mapping of a dominant gene conferring resistance to spot blotch caused by a new pathotype of *Bipolaris sorokiniana* in barley / Wang R., Leng Y., Zhao M., Zhong S. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2019. – T. 132 – №1 – C. 41–51. doi: 10.1007/s00122-018-3192-5.
268. Wang R. Genome-wide association mapping of spot blotch resistance to three different pathotypes of *Cochliobolus sativus* in the USDA barley core collection / Wang R., Leng Y., Ali S., Wang M., Zhong S. // *Molecular Breeding* – 2017. – T. 37 – №4 – C. 44. doi: 10.1007/s11032-017-0626-8.
269. Warr A. Exome sequencing: current and future perspectives / Warr, A., Robert, C., Hume, D., Archibald, A., Deeb, N., Watson, M. // *G3: Genes, Genomes, Genetics* – 2015. – T. 5 – №8 – C. 1543-1550.
270. Wehner G. Expression profiling of genes involved in drought stress and leaf senescence in juvenile barley / Wehner G., Balko C., Humbeck K., Zyprian E., Ordon F. // *BMC plant biology* – 2016. – T. 16 – №1 – C. 1-12.
271. Willcox G. The distribution, natural habitats and availability of wild cereals in relation to their domestication in the Near East: multiple events, multiple centres / Willcox G. // *Vegetation History and Archaeobotany* – 2005. – T. 14 – №4 – C. 534-541.
272. Williams K. J. Identification and mapping of a gene conferring resistance to the spot form of net blotch (*Pyrenophora teres f maculata*) in barley / Williams K. J., Lichon A., Gianquitto P., Kretschmer J. M., Karakousis A., Manning S., ... Wallwork H. // *Theoretical and Applied Genetics* – 1999. – T. 99 – №1 – C. 323-327.
273. Wirthmueller L. Nuclear accumulation of the Arabidopsis Immune receptor RPS4 is necessary for triggering EDS1-dependent defense / Wirthmueller L., Zhang Y., Jones J.D., Parker J.E. // *Current Biology* – 2007. – T. 17 – №23 – C. 2023–2029. doi: 10.1016/j.cub.2007.10.042.

274. Wold S. The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS method / Wold S., Martens H., Wold H. // *Matrix pencils* – 1983 – C. 286–293.
275. Wonneberger R. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch in a collection of Nordic barley germplasm / Wonneberger R., Ficke A., Lillemo M. // *Theoretical and Applied Genetics* – 2017. – T. 130 – №10 – C. 2025–2043. doi: 10.1007/s00122-017-2940-2.
276. Wonneberger R. Mapping of quantitative trait loci associated with resistance to net form net blotch (*Pyrenophora teres* f. *teres*) in a doubled haploid Norwegian barley population / Wonneberger R., Ficke A., Lillemo M. // *PLoS One* – 2017. – T. 12 – №4 – C. e0175773. doi: 10.1371/journal.pone.0175773.
277. Xu X. Genome-wide association analysis of grain yield-associated traits in a pan-european barley cultivar collection / Xu X., Sharma R., Tondelli A., Russell J., Comadran J., Florian S., Pillen K. и др. // *The Plant Genome* – 2018. – T. 11 – №1 – C. 0. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.08.0073>.
278. Ye Y. The role of receptor-like protein kinases (RLKs) in abiotic stress response in plants / Ye Y., Ding, Y., Jiang, Q., Wang, F., Sun, J., Zhu, C. // *Plant cell reports* – 2017. – T. 36 – №2 – C. 235–242. doi: 10.1007/s00299-016-2084-x.
279. Yu J. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. *ssp. indica*) / Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K.S., Li S., Liu B., Deng Y., ... Zhu L., Yuan L., Yang H. // *Science* – 2002. – T. 296 – №5565 – C. 79–92.
280. Yun S.J. Quantitative trait loci for multiple disease resistance in wild barley / Yun S.J., Gyenis L., Hayes P.M., Matus I., Smith K.P., Steffenson B.J., Muehlbauer G J. // *Crop Science* – 2005. – T. 45 – №6 – C. 2563-2572.
281. Yun S.J. Validation of quantitative trait loci for multiple disease resistance in barley using advanced backcross lines developed with a wild barley / Yun S.J.,

- Gyenis L., Bossolini E., Hayes P.M., Matus I., Smith K.P., Muehlbauer G.J. // *Crop Science* – 2006. – T. 46 – №3 – C. 1179–1186. doi: 10.2135/cropsci2005.08-0293.
282. Zhong S. *Brachypodium distachyon*–*Cochliobolus sativus* pathosystem is a new model for studying plant–fungal interactions in cereal crops / Zhong S., Ali, S., Leng, Y., Wang, R., & Garvin, D. F. // *Phytopathology* – 2015. – T. 105 – №4 – C. 482-489.
283. Zhong S. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus* / Zhong S.; Steffenson, B.J. // *Phytopathology* – 2001. – T. 91 – C. 469–476.
284. Zhou H. Genome-wide association mapping reveals genetic architecture of durable spot blotch resistance in US barley breeding germplasm / Zhou H., Steffenson B. // *Molecular Breeding* – 2013. – T. 32 – №1 – C. 139–154. doi: 10.1007/s11032-013-9858-4.
285. Zohary D. Domestication of plants in the old world: The origin and spread of domesticated plants in Southwest Asia, Europe, and the Mediterranean Basin / Zohary D., Hopf M., Weiss E. // Oxford University Press – 2012.
286. Zohary D. Domestication of pulses in the old world: legumes were companions of wheat and barley when agriculture began in the Near East / Zohary D., Hopf M. // *Science* – 1973. – T. 182 – №4115 – C. 887-894.
287. Zohary D. Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the Near East / Zohary D. // *Genetic Resources and Crop Evolution* – 1999. – T. 46 – №2 – C. 133-142.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Доп таблица 1. Независимая выборка яровых сортов ячменя, используемых для валидации маркеров, ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости.

Полевой номер сорта	№каталога ВИР	Разновидность	Страна	Тип устойчивости
152	К-11025	Coeleste	Япония	Устойчивый
215	К-17262	Breve	Великобритания	Устойчивый
228	К-18523	Pallidum	Китай	Устойчивый
344	К-29192	Rikotense	Канада	Устойчивый
382	К-30029	Rikotense	Канада	Устойчивый
385	К-30035	Rikotense	США	Устойчивый
424	К-30408	Rikotense	Канада	Устойчивый
442	К-30741	Nutans	Франция	Устойчивый
448	C.I. 11531*	Rikotense	США	Устойчивый
449	К-29576	Medicum	США	Устойчивый
450	К-26959	Rikotense	США	Устойчивый
194	К-15431	Pallidum	Австралия	Восприимчивый
227	К-18506	Rikotense	Канада	Восприимчивый
231	К-18614	Nutans	Франция	Восприимчивый
240	К-18973	Coeleste	Китай	Восприимчивый
292	К-21799	Erectum	Австралия	Восприимчивый
323	К-27346	Nutans	Греция	Восприимчивый
325	К-27650	Nutans	Россия	Восприимчивый
338	К-28674	Nudum, Neogenes	Мексика	Восприимчивый
398	К-30292	Medicum	Австралия	Восприимчивый
399	К-30311	Medicum	Россия	Восприимчивый
430	К-30491	Nutans	Дания	Восприимчивый

* C.I. — американский каталог. Гибридная (селекционная) линия NDB 112. В каталоге ВИР на сайте ее номер не найден.

Доп таблица 2. Независимая выборка яровых сортов ячменя, используемых для валидации маркеров, ассоциированных с устойчивостью к сетчатой пятнистости

Порядковый № сорта	№ каталога ВИР	Разновидность	Происхождение	Тип устойчивости
1	К-2893	Nigripallidum	Туркменистан	Устойчивый
2	К-2959	Nigrum	Монголия	Устойчивый
3	К-3108	Nigripallidum	Туркменистан	Устойчивый
4	К-3132	Pallidum	Таджикистан	Устойчивый
5	К-3175	Pallidum	Таджикистан	Устойчивый
6	К-4355	Pallidum	США	Устойчивый
7	К-4719	Pallidum	Узбекистан	Устойчивый
8	К-5909	Rikotense	Туркменистан	Устойчивый
9	К-6827	Nutans, Medicum, Persicum, Nigricans	Турция	Устойчивый
10	К-7747	Medicum	Турция	Устойчивый
11	К-7765	Medicum, Nigricans, Pallidum	Турция	Устойчивый
12	К-8332	Pallidum	Монголия	Устойчивый
13	К-8780	Pallidum, Recens	Италия	Устойчивый
14	К-9308	Pallidum	Туркменистан	Устойчивый
15	К-11987	Pallidum	Кыргызстан	Устойчивый
16	К-11996	Nutans	Кыргызстан	Устойчивый
17	К-12023	Pallidum	Кыргызстан	Устойчивый
18	К-14249	Pallidum, Nutans, Himalayense	Таджикистан	Устойчивый
19	К-14679	Pallidum	Россия	Устойчивый
20	К-14900	Pallidum	Таджикистан	Устойчивый
21	К-15811	Pallidum	Китай- страна донор; США- страна происхождения	Устойчивый
22	К-15823	Pallidum	Китай- страна донор; США- страна происхождения	Устойчивый
23	К-15872	Pallidum	США	Устойчивый
24	К-15912	Pallidum	США	Устойчивый
25	К-17820	Pallidum	Китай	Устойчивый
26	К-18268	Pallidum	Китай	Устойчивый
27	К-18269	Pallidum	Китай	Устойчивый
28	К-18505	Rikotense	Канада	Устойчивый
29	К-18523	Pallidum	Китай	Устойчивый

30	K-18552	Pallidum	Марокко	Устойчивый
31	K-18728	Pallidum	Канада	Устойчивый
32	K-18760 a	Pallidum	Канада	Устойчивый
33	K-19182	Rikotense	США	Устойчивый
34	K-19643	Pallidum	Индия	Устойчивый
35	K-19646	Pallidum	США	Устойчивый
36	K-21112	Nigrum, Pallidum	Эфиопия	Устойчивый
37	K-21115	Nigricans, Nutans	Эфиопия	Устойчивый
38	K-21538	Pallidum	Боливия	Устойчивый
39	K-21578	Pallidum	Эквадор	Устойчивый
40	K-22022	Medicum, Nutans	Казахстан	Устойчивый
41	K-24723	Nutans	Казахстан	Устойчивый
42	K-25283	Pallidum	США	Устойчивый
43	K-26664	Pallidum	Pakistan	Устойчивый
44	K-29040	Nutans	Россия	Устойчивый
45	K-29192	Rikotense	Канада	Устойчивый
46	K-29416	Medicum	Россия	Устойчивый
47	K-29709	Nutans	Мексика	Устойчивый
48	K-30029	Rikotense	Канада	Устойчивый
49	K-30351	Nigripallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Устойчивый
50	K-30408	Rikotense	Канада	Устойчивый
51	K-26959	Rikotense	США	Устойчивый
52	K-2814	Pallidum	Узбекистан	Восприимчивый
53	K-4071	Nudipyramidatum, Coeleste	Монголия	Восприимчивый
54	K-5211	Breviaristatum	США	Восприимчивый
55	K-10843	Pallidum	Туркменистан	Восприимчивый
56	K-10975	Parallelum, Pallidum	Япония	Восприимчивый
57	K-12663	Nutans	Moldova	Восприимчивый
58	K-17507	Nutans	Великобритания	Восприимчивый
59	K-18267	Erectum	Китай	Восприимчивый
60	K-18353	Nutans	Кыргызстан	Восприимчивый
61	K-18890	Pallidum	Индия	Восприимчивый
62	K-19934	Medicum	Украина	Восприимчивый
63	K-20185	Deficiens, Pallidum	Эфиопия-страна донор; Германия - страна происхождения	Восприимчивый
64	K-22292	Asmaricum, Nigripallidum	Боливия	Восприимчивый
65	K-22336	Erectum	Австралия	Восприимчивый
66	K-22835	Nutans	Австралия	Восприимчивый
67	K-22836	Nutans	Австралия	Восприимчивый

68	K-26338	Nutans	Украина	Восприимчивый
69	K-26926	Nudum	Германия	Восприимчивый
70	K-27346	Nutans	Греция	Восприимчивый
71	K-27650	Nutans	Россия	Восприимчивый
72	K-27737	Nutans	Россия	Восприимчивый
73	K-28674	Neogenes	Мексика	Восприимчивый
74	K-28999	Medicum	Россия	Восприимчивый
75	K-29614	Nutans	Швеция	Восприимчивый
76	K-29718	Medicum	Польша	Восприимчивый
77	K-29720	Nudimelanocritum	Эфиопия-страна донор; Польша - страна происхождения	Восприимчивый
78	K-29723	Nutans	Россия	Восприимчивый
79	K-30012	Glabripyramidatum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
80	K-30013	Pyramidatum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
81	K-30014	Pallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
82	K-30288	Nutans	Австралия	Восприимчивый
83	K-30292	Medicum	Австралия	Восприимчивый
84	K-30311	Submedicum	Россия	Восприимчивый
85	K-30348	Sehimp	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
86	K-30349	Violaceum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
87	K-30350	Pallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
88	K-30353	Pallidum	Япония	Восприимчивый
89	K-30366	Nutans	Украина	Восприимчивый
90	K-30432	Nutans	Швеция	Восприимчивый
91	K-30453	Nutans	Россия	Восприимчивый
92	K-30461	Nutans	Финляндия	Восприимчивый
93	K-30471	Nutans	Германия	Восприимчивый
94	K-30562	Nutans	Россия	Восприимчивый
95	K-30573	Nutans	Россия	Восприимчивый
96	K-30591	Nutans	Россия	Восприимчивый
97	K-30616	Nudum	Греция	Восприимчивый
98	K-30634	Nigrum, Nigripallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
99	K-30650	Pallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
100	K-30666	Pyramidatum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
101	K-30670	Pallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый
102	K-30676	Nigripallidum	Перу-страна донор; США - страна происхождения	Восприимчивый

103	K-30927	Nutans	Греция	Восприимчивый
-----	---------	--------	--------	---------------

Доп. таблица 3: Результаты оценки проростковой устойчивости сетчатой пятнистости на сибирской коллекции ячменя: R – высоко устойчивые (1.0 –3.0); MR – средне устойчивые (3.1 –5.0); MS – средне восприимчивые (5.1-6.9), S – восприимчивые (7.0–10.0).

Сорт/линия	Реакция на S10.2		Реакция на K5.1		Реакция на P3.4.0		Реакция на A2.6.0	
	Значение	Шкала учета	Значение	Шкала учета	Значение	Шкала учета	Значение	Шкала учета
Abyssinia	4.5	MR	6	MS	8	S	9	S
Brodyole	7	S	7	S	6	MS	7.7	S
Jngve	10	S	10	S	4.7	MR	6.7	MS
№ 259/528	2	R	2.8	R	2.5	R	1	R
Wial	3	R	8.5	S	9.3	S	7	S
Авалон	7.8	S	8.3	S	9.3	S	9	S
Агул	7.5	S	1.8	R	8.7	S	5	MR
Алаг-Эрд-Эне	1.3	R	1.3	R	1.3	R	1.3	R
Алей	3	R	7	S	1.7	R	1.3	R
Алтан-Булаг	3	R	1.7	R	1	R	2.3	R
Алын-Буя	2.5	R	9	S	9.7	S	9.7	S
Анна	7	MS	8	S	7.7	S	6	MS
Арна	3	R	6.5	MS	7.3	S	6.7	MS
Арчекас	8.3	S	10	S	9	S	9.7	S
АС 0760258	8.5	S	9.7	S	9.3	S	6.7	MS
Ача	7.5	S	10	S	6	MS	8.7	S
Баган	6	MS	5.3	MS	9	S	5	MR
Бархатный	5	MR	1	R	6	MS	3.7	MR
Безенчукский 2	5	MR	1.5	R	5	MR	8	S
Белогорский	6.7	MS	1.5	R	1.3	R	3.7	MR
Биом	4.8	MR	7.3	S	9.3	S	9.3	S

В-1	1.3	R	9	S	5.7	MS	4.3	MR
Виконт	4.5	MR	10	S	9.7	S	9.3	S
Винер	3	R	1	R	3.2	MR	3.5	MR
Ворсинский 2	4	MR	8	S	9.3	S	10	S
Выбор	4.5	MR	9.5	S	5	MR	9.3	S
Г-19951	8	S	6	MS	7.7	S	9	S
Г-19980	3	R	6	MS	4	MR	5	MR
Г-21038	6.3	MS	8.3	S	10	S	9.3	S
Г-21219	6.8	MS	9.7	S	6,3	MS	9	S
Г-21671	8.8	S	5	MR	6	MS	7.7	S
Голозерный 1	3.3	MR	10	S	7	S	8	S
Гранал	6.5	MS	2.3	R	5.3	MS	4.3	MR
Добрый	7	S	10	S	8.7	S	9.7	S
Донецкий 8	1.3	S	1.3	R	8.3	S	6	MS
Емеля	1.3	R	5	MR	7.7	S	5	MR
Заларинец	2.8	R	7.5	S	6.3	MS	5.3	MS
Зерноградский 86	9	S	7	S	7	S	6	MS
Золотник	4.7	MR	6	MS	6	MS	5	MR
Импульс	9.8	S	7	MS	6	MS	9.7	S
Кедр	2.5	R	2	R	2.7	R	4	MR
Колчан	1.5	R	5.5	MS	8	S	6.7	MS
Красноярский 1	7	S	10	S	9.7	S	9.5	S
Красноярский 91	7.3	S	6.8	MS	7.5	S	5.3	MS
Крымчак 55	4	MR	4.5	MR	5	MR	4	MR
Курьер	9.8	S	9.5	S	7	S	8.7	S
Л-421	9	S	9	S	6	MS	1.7	R
Лиман III	2.3	R	9	S	7	S	4.3	MR

Линия 1	6.5	MS	5.7	MS	5.5	MS	7.7	S
Линия 1285	6.5	MS	1.7	R	9	S	8.3	S
Маныч 459	6.8	MS	10	S	8.7	S	9.7	S
Маяк	7.3	S	9.5	S	8.7	S	8.7	S
Медикум	7	S	4.3	MR	2	R	7.5	S
Мелиус	7.3	S	9.3	S	9.3	S	10	S
Мерит 57	3.5	MR	5.5	MS	2.3	R	3.3	MR
Местный (Дагестан)	5.7	MS	6	MS	2	R	2	R
Местный (Прим. кр)	6	MS	2	R	1.3	R	1	R
Местный (Эфиопия)	4	MR	9	S	5	MR	8	S
Местный (Якутия)	2	R	8.5	S	8.5	S	7	S
Московский 121	5.3	MS	7	S	9.7	S	9.7	S
Мутант Винер(а)	6.5	MS	3.3	MR	7	S	6	MS
Мутант 68	3	R	6.3	MS	6.7	MS	7.3	S
Нарымчанин	4.5	MR	1.5	R	3.7	MR	2.5	R
Никита	6	MS	9.8	S	7.3	S	7.7	S
Новосибирский 80	3	R	9.5	S	10	S	6.5	MS
Норд 112412	5	MR	8.5	S	6.5	MS	10	S
Носовский 11	2.5	R	9.5	S	9.7	S	10	S
Нутанс 970	8.7	S	8.7	S	10	S	6.3	MS
Обской	9.3	S	6	MS	6.7	MS	5.3	MS
Омский 13709	1.7	R	1.3	R	1.3	R	1.3	R
Омский 85	6	MS	3	R	6.3	MS	2.5	R
Омский голозер. 1	7.3	S	6.5	MS	9.7	S	10	S
Омский голозер. 2	3	R	3	R	2	R	3	R
Оренбургск. кормовой	7	S	9.3	S	9.5	S	6.3	MS

Оскар	9.5	S	9.7	S	9	S	10	S
Отбор Туал	6.5	MS	9.3	S	9.7	S	5.5	MS
Паллидум 394	3.8	MR	3.8	MR	2.7	R	2.3	R
Прикульский 14	2.3	R	9	S	8	S	3	R
Рейд	3.5	MR	6	MS	6.3	MS	6	MS
Саша	5.3	MS	9.8	S	8	S	6.7	MS
Светик	2	R	5	MR	7	S	7.5	S
Северный	2.3	R	1	R	5	MR	4.7	MR
Сигнал	7.8	S	6.7	MS	7	S	9.7	S
Символ	10	S	3	R	10	S	10	S
Славянский	3.3	MR	9	S	5	MR	4.7	MR
Соболек	7.3	S	8	S	9.3	S	7	S
Сымбат	4	MR	6.7	MS	6.5	MS	6.7	MS
Таганай	8.3	S	9	S	8.7	S	8.3	S
Талан	8	S	10	S	9.7	S	10	S
Танай	9.5	S	7.3	MS	8.3	S	6.3	MS
Тарский 1	8.8	S	3.5	MR	6.3	MS	7	S
Татум	6.3	MS	9.5	S	10	S	10	S
Темп	7	MS	5.3	MS	8.7	S	10	S
Челябинск. 70	7	S	2.5	R	10	S	10	S
Harrington/ (control)	9.8	S	9.8	S	10	S	10	S

Доп. таблица 4: Результаты оценки устойчивости темно-бурой пятнистости на сибирской коллекции ячменя. Первые три колонки показывают проростковую устойчивость к трем изолятам: R – высоко устойчивые (1.0 –4.0); MR – средне устойчивые (4.1 –5.9); S – восприимчивые (6.0–9.0); “/” – данные отсутствуют.

Четвертая колонка показывает устойчивость взрослых растений: R – высоко устойчивые (1–10.5); MR – средне устойчивые (11–20); MS – средневосприимчивые (21–39); S – восприимчивые (40–80).

Сорт/линия	Реакция на Kh2 (проростки)		Реакция на Ch3 (проростки)		Реакция на O18.2 (проростки)		Реакция на Ch3 (взрослые)			
	Значение	Шкала учета	Значение	Шкала учета	Значение	Шкала учета	Среднее значение	Шкала учета	Верхний ярус	Нижний ярус
Abyssinia	7	S	7	S	5	MR	35	MS	40	30
Brodyole	5	MR	5.3	MR	5	MR	20	MR	25	15
Jngve	7	S	6	S	6	S	35	MS	30	40
№ 259/528	7	S	7	S	6	S	22.5	MS	25	20
Wial	6.7	S	5.3	MR	6.5	S	25	MS	35	15
Авалон	6.7	S	5.7	MR	5.7	MR	17	MR	17	17
Агул	7	S	6.5	S	6	S	20	MR	30	10
Алаг-Эрд-Эне	7	S	7	S	8	S	40	S	50	30
Алей	8	S	8	S	7.5	S	45	S	50	40
Алтан-Булаг	4	R	2.3	R	2.5	R	17.5	MR	15	20
Алын-Буя	7	S	7	S	7	S	25	MS	30	20
Анна	7	S	7	S	6	S	30	MS	40	20
Арна	6	S	7	S	7.3	S	35	MS	40	30
Арчекас	6	S	6	S	6	S	32.5	MS	45	20
АС 0760258	7.5	S	/	/	8.3	S	42.5	S	50	35
Ача	6	S	4.7	MR	4	R	22.5	MS	30	15
Баган	4.5	MR	7	S	7	S	30	MS	40	20
Бархатный	4	R	4.3	MR	3.5	R	20	MR	25	15
Безенчукский 2	4.5	MR	6.3	S	5.7	MR	17.5	MR	20	15
Белогорский	7.5	S	7.7	S	6	S	47.5	S	55	40
Биом	/	/	2.7	R	1.8	R	10	R	15	5
В-1	3	R	2	R	2.2	R	9	R	15	3
Виконт	7	S	5.7	MR	7	S	25	MS	30	20
Винер	5	MR	5	MR	4.5	MR	25	MS	30	20

Ворсинский 2	5.5	MR	3.7	R	2.7	R	12.5	MR	20	5
Выбор	6	S	6	S	6	S	37.5	MS	50	25
Г-19951	6	S	5	MR	6.8	S	25	MS	35	15
Г-19980	/	/	3.3	R	5	MR	22.5	MS	25	20
Г-21038	5	MR	4.5	MR	5	MR	30	MS	40	20
Г-21219	3.3	R	2	R	1.9	R	25	MS	20	30
Г-21671	3	R	4.5	MR	3.8	R	12.5	MR	15	10
Голозер. 1	7	S	8	S	6.5	S	35	MS	50	20
Гранал	5.5	MR	7	S	5.7	MR	35	MS	45	25
Добрый	6.3	S	6.7	S	6	S	45	MS	50	40
Донецкий 8	6.7	S	7	S	4.7	MR	35	MS	45	25
Емеля	7	S	3.7	R	4.3	MR	12.5	MR	20	5
Заларинец	5	MR	4	R	5	MR	25	MS	35	15
Зерноградский 86	7	S	7.3	S	7	S	25	MS	30	20
Золотник	6	S	4	R	3.8	R	40	S	40	40
Импульс	3.7	R	7	S	7.7	S	32.5	MS	40	25
Кедр	3.5	R	6.3	S	3.1	R	32.5	MS	45	20
Колчан	3.5	R	2	R	2.3	R	6.5	R	10	3
Красноярский 1	8	S	7	S	7.3	S	30	MS	40	20
Красноярский 91	5	MR	4	R	4.4	MR	10	R	15	5
Крымчак 55	4.5	MR	5	MR	4.3	MR	40	S	40	40
Курьер	7	S	7	S	5	MR	32.5	MS	45	20
Л-421	5	MR	6	S	5.3	MR	27.5	MS	35	20
Лиман III	6.7	S	6.7	S	6	S	25	MS	30	20
Линия 1	7	S	7.3	S	6	S	45	S	50	40
Линия 1285	6.5	S	7	S	5.5	MR	45	S	50	40

Маньч 459	4.3	MR	5	MR	4.8	MR	32.5	MS	40	25
Маяк	6.5	S	6.5	S	6	S	30	MS	40	20
Медикум	5	MR	7	S	3.3	R	25	MS	35	15
Мелиус	7	S	6	S	6.2	S	25	MS	35	15
Мерит 57	7.7	S	3	R	7.3	S	22.5	MS	30	15
Местный (Дагестан)	7	S	8	S	8	S	50	S	60	40
Местный (Прим. кр)	4	R	5.3	MR	4.5	MR	27.5	MS	35	20
Местный (Эфиопия)	7	S	7	S	6	S	45	S	50	40
Местный (Якутия)	5.3	MR	4.7	MR	6	S	30	MS	35	25
Московский 121	7.3	S	7	S	7	S	20	MR	30	10
Мутант Винер(а)	2.7	R	5	MR	7	S	26	MS	35	17
Мутант 68	3.7	R	3	R	2.8	R	30	MS	40	20
Нарым-чанин	5	MR	4	R	4.3	MR	25	MS	30	20
Никита	6	S	6	S	4.7	MR	25	MS	35	15
Новосибирский 80	4.3	MR	5	MR	4.5	MR	20	MR	30	10
Норд 112412	7	S	8	S	7	S	23.5	MS	30	17
Носовский 11	7.7	S	7.3	S	7	S	15	MR	20	10
Нутанс 970	7	S	7	S	7	S	40	S	50	30
Обской	7	S	7	S	6	S	40	S	50	30
Омский 13709	4.7	MR	7	S	6	S	27.5	MS	30	25
Омский 85	5.3	MR	6	S	5.7	MR	30	MS	40	20
Омский голозер. 1	6.3	S	6.5	S	6.3	S	35	MS	50	20

Омский голозер. 2	2.3	R	2.3	R	1.4	R	30	MS	40	20
Оренбургск. кормовой	7	S	6.5	S	6	S	25	MS	30	20
Оскар	7	S	6	S	7	S	30	MS	40	20
Отбор Туал	7	S	7.3	S	6	S	45	S	50	40
Паллидум 394	7.3	S	7	S	5.3	MR	45	S	50	40
Прикульский 14	5.5	MR	6	S	4.9	MR	22.5	MS	30	15
Рейд	7	S	3.3	R	4.7	MR	20	MR	30	10
Саша	7	S	5.3	MR	7	S	30	MS	40	20
Светик	4	R	1	R	1.2	R	10	R	10	10
Северный	3	R	2.7	R	2	R	22.5	MS	35	10
Сигнал	4	R	2	R	1.9	R	17.5	MR	20	15
Символ	3	R	5	MR	2.3	R	40	S	40	40
Славянский	7	S	5.7	MR	5	MR	27.5	MS	40	15
Соболек	6.3	S	6.5	S	6	S	25	MS	40	10
Сымбат	6.7	S	7	S	5.8	MR	37.5	MS	45	30
Таганай	6	S	5	MR	6.5	S	27.5	MS	30	25
Талан	7	S	4.3	MR	5.5	MR	25	MS	35	15
Танай	3.5	R	2.7	R	5.3	MR	27.5	MS	40	15
Тарский 1	4.7	MR	5.3	MR	5	MR	40	S	40	40
Татум	8	S	4.3	MR	7	S	32.5	MS	35	30
Темп	6.5	S	6.5	S	5.4	MR	32.5	MS	40	25
Челябинск. 70	5	MR	5	MR	4.9	MR	17.5	MR	20	15
Harrington	7.5	S	8	S	8.3	S	45	S	40	50
(control)										

Доп. таблица 5: Результаты оценки устойчивости корневых гнилей.

Устойчивость проростков R – устойчивые (1–2,5); MR – средне устойчивые (2,6–2,9); S – восприимчивые (3,0–5,0).

Сорт/линия	Среднее значение	Шкала учета
Abyssinia	3.8	S
Brodyole	1.7	R
Jngve	3.6	S
№ 259/528	2.2	R
Wial	4.1	S
Авалон	2.6	S
Агул	3.5	S
Алаг-Эрд-Эне	3.3	S
Алей	1.5	R
Алтан-Булаг	4.2	S
Алын-Буя	3.1	S
Анна	3.9	S
Арна	3	S
Арчекас	5	S
АС 0760258	1.2	R
Ача	3.1	S
Баган	2.4	R
Бархатный	3.4	S
Безенчукский 2	4	S
Белогорский	3.6	S
Биом	2.9	S
В-1	3.6	S
Виконт	1.8	R
Винер	3.5	S
Ворсинский 2	2.2	R
Выбор	3.5	S
Г-19951	3.1	S
Г-19980	4.8	S
Г-21038	2.8	MR
Г-21219	2.7	MR
Г-21671	2.2	R
Голозер. 1	3.1	S
Гранал	3.5	S
Добрый	3.9	S
Донецкий 8	3.4	S
Емея	3.8	S
Заларинец	4.1	S
Зерноградский 86	2.9	S
Золотник	3.4	S
Импульс	3	S
Кедр	3.5	S
Колчан	1.3	R
Красноярский 1	3.2	S
Красноярский 91	3.5	S
Крымчак 55	3.1	S
Курьер	4	S
Л-421	2.6	S
Лиман III	2.1	R
Линия 1	4.5	S
Линия 1285	3.4	S
Маныч 459	3.4	S

Маяк	4.5	S
Медикум	2.1	R
Мелнус	3.3	S
Мерит 57	2.9	S
Местный (Дагестан)	5	S
Местный (Прим. кр)	3.9	S
Местный (Эфиопия)	3.7	S
Местный (Якутия)	3.8	S
Московский 121	4.4	S
Мутант Винер(а)	4.2	S
Мутант 68	3	S
Нарымчанин	3.1	S
Никита	3.9	S
Новосибирский 80	3.1	S
Норд 112412	2.5	R
Носовский 11	4.8	S
Нутанс 970	4.2	S
Обской	3.5	S
Омский 13709	3.6	S
Омский 85	2.2	R
Омский голозер. 1	3.6	S
Омский голозер. 2	2.8	MR
Оренбургск. кормовой	4.2	S
Оскар	3.4	S
Отбор Туал	3.5	S
Паллидум 394	4.3	S
Прикульский 14	4.3	S
Рейд	3	S
Саша	1.5	R
Светик	3	S
Северный	2.6	MR
Сигнал	3.4	S
Символ	2.2	R
Славянский	2.3	R
Соболек	3.4	S
Сымбат	2.7	S
Таганай	3.3	S
Талан	4	S
Танай	3.3	S
Тарский 1	4	S
Татум	3.8	S
Темп	2.3	R
Челябинск 70	1.6	R
Harrington	4.9	S

Доп таблица 6. Результаты генотипирования в TraitGenetics и для ПЦР-анализа маркера JHI-Nv50k-2016-156999 с геномной ДНК исследуемой коллекции.

№	Название сорта	TraitGenetics (аллель)	ПЦР с заявляе- мым маркером	Совпадение (точность работы маркера)
1	Г-19951	C	C	+
2	Г-19980	A	A	+
3	Авалон	C	C	+
4	Норд 112412	C	C	+
5	Мелиус	C	C	+
6	Мерит 57	A	A	+
7	АС 0760258	C	C	+
8	Татум	C	C	+
9	Г-21038	C	C	+
10	Г-21671	C	C	+
11	Биом	A	A	+
12	Танай	A	A	+
13	Талан	A	A	+
14	Г-21219	A	A	+
15	Jngve	A	A	+
16	Виконт	A	A	+
17	Саша	C	C	+
18	Ворсинский 2	A	A	+
19	Золотник	C	C	+
20	Алей	A	A	+
21	Арна	C	C	+
22	Сымбат	C	C	+
23	Голозер. 1	C	C	+
24	Омский голозер. 2	A	A	+
25	Омский голозер. 1	C	C	+

26	Abyssinia	C	C	+
27	Местный (Дагестан)	C	C	+
28	Местный (Эфиопия)	C	C	+
29	Алаг-Эрд-Эне	C	C	+
30	Оскар	C	C	+
31	Арчекас	C	C	+
32	Мутант Винер(а)	C	C	+
33	Линия 1285	C	C	+
34	Линия 1	C	C	+
35	Отбор Туал	C	C	+
36	Рейд	C	C	+
37	Лиман III	C	C	+
38	Ача	C	C	+
39	Таганай	C	C	+
40	Обской	A	A	+
41	Сигнал	A	A	+
42	Светик	A	A	+
43	Омский 85	A	A	+
44	Мутант 68	C	C	+
45	Зерноградский 86	C	C	+
46	Северный	A	A	+
47	№ 259/528	C	C	+
48	Никита	C	C	+
49	Brodyole	C	C	+
50	Символ	C	C	+
51	Гранал	C	C	+
52	Крымчак 55	C	C	+

53	Выбор	С	С	+
54	Винер	С	С	+
55	Славянский	С	С	+
56	Челябинск. 70	С	С	+
57	Маяк	С	С	+
58	Агул	С	С	+
59	Паллидум 394	С	С	+
60	Белогорский	С	С	+
61	Местный (Якутия)	А	А	+
62	Заларинец	А	А	+
63	Местный (Прим. кр)	А	А	+
64	Тарский 1	С	С	+
65	Алтан-Булаг	С	С	+
66	Московский 121	С	С	+
67	Омский 13709	С	С	+
68	Л-421	С	С	+
69	Курьер	С	С	+
70	Оренбургск. кормовой	С	С	+
71	Носовский 11	С	С	+
72	Красноярский 1	С	С	+
73	Импульс	С	С	+
74	Маньч 459	С	С	+
75	Безенчукский 2	С	С	+
76	Кедр	А	А	+
77	Темп	С	С	+
78	Добрый	С	С	+
79	Прикульский 14	С	С	+

80	Нарымчанин	С	С	+
81	Бархатный	С	С	+
82	Медикум	С	С	+
83	Wial	С	С	+
84	Анна	С	С	+
85	Баган	С	С	+
86	Алын-Буя	С	С	+
87	Колчан	А	А	+
88	Новосибирский 80	А	А	+
89	В-1	А	А	+
90	Соболек	С	А	-
91	Емеля	С	С	+
92	Красноярский 91	С	С	+
93	Нутанс 970	С	С	+
94	Донецкий 8	С	С	+