

Розанова Ирина Вениаминовна

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

1.5.7. –генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в секторе функциональной генетики злаков ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук» (ИЦиГ СО РАН)

Научный руководитель: **Хлесткина Елена Константиновна**
доктор биологических наук, профессор РАН, директор ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР), г. Санкт Петербург

Официальные оппоненты: **Карлов Геннадий Ильич**
доктор биологических наук, академик РАН, директор ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии», г. Москва

Дементьева Наталия Викторовна
кандидат биологических наук, зав. лабораторией молекулярной генетики Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных - филиала ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», г. Санкт-Петербург

Ведущее Учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН», г. Москва

Защита диссертации состоится _____ 2023 года на утреннем заседании Диссертационного совета 24.1.239.01 на базе ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН» в конференц-зале Института по адресу: 630090, г. Новосибирск, проспект ак. Лаврентьева, 10, т. (383)363-49-06, факс (383) 333-12-78, e-mail: dissov@bionet.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИЦиГ СО РАН и на сайте Института <http://www.icgbio.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Хлебодарова Т.М.

Актуальность. Ячмень (*Hordeum vulgare* L.) является одной из важнейших сельскохозяйственных культур. По сведениям Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, площадь посевов ячменя составляет в мире 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 ее подходящей 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).

Гемибиотрофные 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 (Афанасенко, 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 изучение генетического разнообразия для выявления локусов 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.

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 PLS¹ 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, что подтверждено 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».

¹ PLS – Partial Least Squares, метод частичных наименьших квадратов

Положения, выносимые на защиту:

1. Устойчивость ячменя к темно-бурой пятнистости, вызываемой патогеном *Cochliobolus sativus*, ассоциируется с районом 15.1-18.8 сМ в хромосоме 3Н, который маркируется четырьмя SNP: JHI-Hv50k-2016-156842, -156820, -156999 и -157182.
2. Устойчивость ячменя к сетчатой пятнистости, вызываемой патогеном *Pyrrenophora teres f. teres*, ассоциируется с районом хромосомы 3Н, локализованным в позиции 52.6 сМ, который маркирован SNP JHI-Hv50k-2016-183207, и с районом хромосомы 6Н, локализованным 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, SBB5, 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 286 источников. Работа изложена на 181 странице, содержит 23 таблицы, 27 рисунков и 3 приложения.

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 кар-

тах ячменя, подбор SNP, разработка на их основе ПЦР-маркеров и валидация этих маркеров на независимых выборках были проведены автором. SNP-локус JHI-Hv50k-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).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Для исследования использовали основную выборку из 94 сортообразцов ярового ячменя, включавшую 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 (далее – Сибирская коллекция ячменя/Сибирский генофонд ячменя). Для валидации диагностических маркеров, разработанных на основе результатов ассоциативного анализа, использовали три независимые выборки: (i) 22 сорта, контрастных по устойчивости к изоляту Ch3 *C. sativus*, (ii) 102 сорта, контрастные по устойчивости к *P. teres* и (iii) 11 дигаплоидных линий от скрещивания сорта CI 5791, несущего устойчивость к *P. teres* по хромосоме 6Н и восприимчивого сорта Harrington.

Изоляты патогенов и оценка устойчивости к болезням. Для исследуемых патогенов *Cochliobolus sativus* и *Pyrenophora teres* f. *teres* были выбраны изоляты различного происхождения (Табл. 1).

Таблица 1. Происхождение изолятов *C. sativus* и *P. teres* f. *teres*, использованных в работе.

Название патогена	Болезнь, вызываемая патогеном	Название изолята	Происхождение
<i>Cochliobolus sativus</i>	Темно-бурая пятнистость	Ch3	Ленинградская область
		Kr2	Краснодарский край
		O 18.2	Ленинградская область
<i>Cochliobolus sativus</i>	Корневые гнили	O 18.2	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

Лабораторная оценка ювенильной устойчивости 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 B.J. (1999) и Tekauz A. (1985) с модификациями.

Выделение ДНК из растений проводили с помощью набора для выделения ДНК DNeasy Plant mini Kit (Qiagen, США), либо по методике Plaschke et al. (1995) с модификациями.

Генотипирование коллекции. Образцы сибирской коллекции были генотипированы с использованием SNP-чипа «Barley 50 K Illumina Infinium iSELECT» на базе компании Traitgenetics GmbH (Гатерслебен, Германия). Дополнительная информация о локусах, к которым были разработаны олигонуклеотидные зонды данного SNP-чипа, была извлечена из ресурса BARLEYMAP (<http://floresta.eead.csic.es/barleymap>) (Cantalapiedra et al., 2015).

Популяционная структура. Анализ популяционной структуры (Q) был проведен с помощью программного пакета STRUCTURE v 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), основываясь на данных генотипирования образцов ячменя с помощью 13 659 маркеров. Чтобы сократить расчетное время программы, был выбран каждый второй маркер из 27 319, прошедших контроль качества.

Анализ ассоциации «маркер-признак» проводили при помощи GWAS и PLS (Hulland, 1999).

GWAS был проведен с помощью программного пакета TASSEL 5.0. Для построения графиков Manhattan Plots был использован скрипт в программном пакете R, предоставленный в рамках Первой Международной Школы-конференции ВИР по количественной генетике (Санкт-Петербург, 2018). Для анализа были исследованы такие статистические модели, как GLM – обобщённая линейная модель без учета популяционной структуры, GLM+Q – анализ с учетом популяционной структуры, GLM+PCA – анализ с учетом главных компонент и MLM+K – смешанная линейная модель с учетом матрицы родства. Достоверность ассоциаций оценивали с помощью поправки Бонферрони (Hommel, 1988) и критерия Бенжамина-Хохберга (Benjamini, Hochberg 1995). Результаты считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

PLS-анализ проводился отдельно для каждой болезни при помощи пакета PAST 2.17 (Hammer, Harper 2006). Первым шагом было проведение анализа главных компонент (PCA) по данным устойчивости сортов ко всем изолятам одновременно (Табл. 1). Совокупность главных компонент по данным устойчивости ко всем изолятам для каждой болезни отдельно представляли собой первый фенотипический блок для PLS-анализа. Второй блок для PLS-анализа, генотипический, составили главные компоненты, рассчитанные через матрицу расстояний между сортами по данным генотипирования. В результате проведения PLS-анализа были получены пары фенотипических и генотипических бикомпонент, максимально коварирующих друг с другом.

Первая фенотипическая бикомпонента с максимальной ковариацией была взята в качестве фенотипического признака для проведения GWAS анализа. Выявленные маркеры отражали совокупную устойчивость к исследуемым изолятам патогена.

Валидирование маркеров на независимых выборках было осуществлено с помощью KASP-анализа. В лаборатории LGC Genomics, Великобритания (<http://www.lgcgroup.com>) было проведено генотипирование 124 сортов и 11 дигаплоидных линий с использованием 17 KASP-маркеров. Анализ результатов KASP проводился при использовании программ SNP-Viewer и Microsoft Excel.

Статистическую обработку данных проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена, для расчетов использовали программу STATISTICA. Диагностическую эффективность и процент встречаемости аллелей в маркерных локусах 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.

Алель-специфичный маркер к локусу JHI-Hv50k-2016-156999 представляет собой пару олигонуклеотидных праймеров, подобранных к SNP, амплифицирующих один из аллельных вариантов. Разработан при использовании программного пакета UGENE и тестировался с помощью ПЦР на ДНК образцов ячменя из независимой выборки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ структуры популяции изучаемой выборки ячменя. Генотипирование проведено с помощью 44040 SNP, из которых полиморфными оказались 39140 локусов. Для 27319 минорная частота аллеля превышала 10%. Из них каждый второй маркер был использован для анализа популяционной структуры изучаемой выборки ячменя. В результате проведенного анализа по 13659 маркеров изучаемая выборка разделилась на четыре группы, содержащие 17, 29, 20 и 34 % образцов. Группа III содержит наибольший процент (67%) сортов сибирской селекции. Группы I, II и IV содержат 31%, 30% и 39% таких сортов соответственно. Оптимальное количество субпопуляций было определено программой STRUCTURE v 2.3.4 как $k = 4$ (Рис. 1).

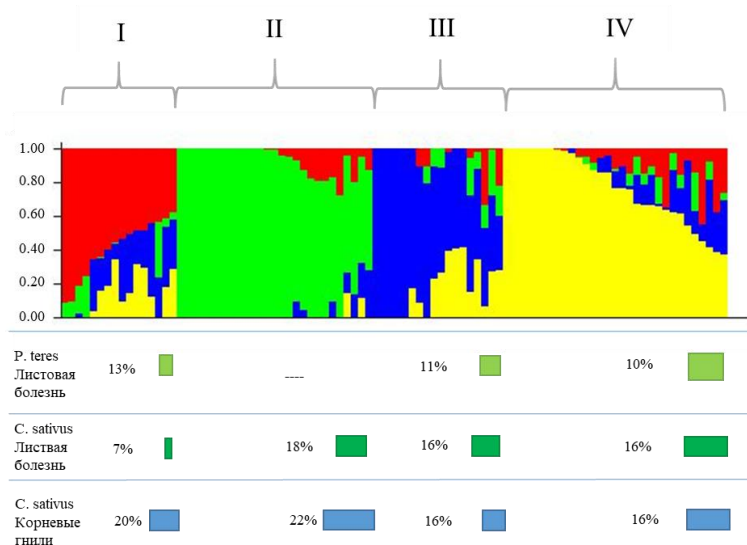


Рисунок 1. Популяционная структура изучаемой выборки ячменя была оценена используя алгоритм Байеса в программе STRUCTURE на основе изменчивости в 13 659 SNP-локусах. Римские цифры I-IV соответствуют определенным субпопуляциям.

Внизу показан процент устойчивых сортов ячменя для каждой группы в каждом исследовании.

Фитопатологическая оценка исследуемой выборки ячменя показала, что устойчивыми к сетчатой пятнистости в группе I являются 13% образцов, в группе II устойчивых образцов выявлено не было, в группах III и IV устойчивыми были 11% и 10% образцов соответственно. Устойчивыми к темно-бурой пятнистости в группе I оказались 7% образцов, в группе II – 18%, в группах III и IV – по 16%. К корневым гнилям проявили устойчивость в группе I – 20% сортов, в группе II – 22%, в группах III и IV – по 16% (Рис. 1.).

При этом четыре сортообразца оказались устойчивыми ко всем четырем изолятам *P. teres*, и четыре – устойчивыми к трем из четырех изолятов (Табл. 2). Два сорта были устойчивыми ко всем изолятам *C. sativus*, причём устойчивость проявлялась как к темно-бурой пятнистости, так и к корневым гнилям. Семь генотипов оказались устойчивыми ко всем трем изолятам при заражении темно-бурой пятнистостью, однако не проявили устойчивость к корневым гнилям (Табл. 3).

Таблица 2. Образцы, устойчивые к двум или нескольким изолятам *P. teres*.

Название сорта	<i>P.teres</i>			
	P3.4.0	S.10	K.12	A2.6.0
Винер	-	+	+	-
Северный	-	+	+	-
Нарымчанин	-	-	+	+
Омский 85	-	-	+	+
Белогорский	+	-	+	-
Местный (Дагестан)	+	-	-	+
Паллидум 394	+	-	-	+
Приекульский 14	-	+	-	+
Кедр	+	+	+	-
Алей	+	+	-	+
Алтан-Булаг	+	-	+	+
Местный (Приморский край)	+	-	+	+
Омский голозерный 2	+	+	+	+
Алаг-Эрд-Эне	+	+	+	+
Линия 259/528	+	+	+	+
Омский 13709	+	+	+	+

Таблица 3. Образцы, устойчивые к двум или нескольким изолятам *C. sativus*.

Название сорта	<i>C. sativus</i>			
	Kr2 (т/б пятнистость)	Ch3 (т/б пятнистость)	O2.18 (т/б пятнистость)	O2.18 (Корневые гнили)
Танай	+	+	-	-
Биом	-	+	+	-
Золотник	-	+	+	-
Медикум	-	-	+	+
Кедр	+	-	+	-
Бархатный	+	-	+	-
Г-21219	+	+	+	-
Омский голозерный 2	+	+	+	-
Северный	+	+	+	-
Сигнал	+	+	+	-
Светик	+	+	+	-
Мутант 68	+	+	+	-
В-1	+	+	+	-
Ворсинский 2	-	+	+	+
Г-21671	+	-	+	+
Символ	+	-	+	+
Алей	+	+	+	+
Колчан	+	+	+	+

Полногеномный анализ ассоциаций.

GWAS был проведен с использованием данных генотипирования 94 образцов ячменя с помощью 27 319 SNP-маркеров и данных их фенотипической оценки на устойчивость к заболеваниям.

Было выявлено пять геномных районов на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 7Н, ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости, вызываемой патогеном *C. sativus*. Все выявленные районы соответствуют расположению ранее описанных локусов устойчивости (Рис. 2).

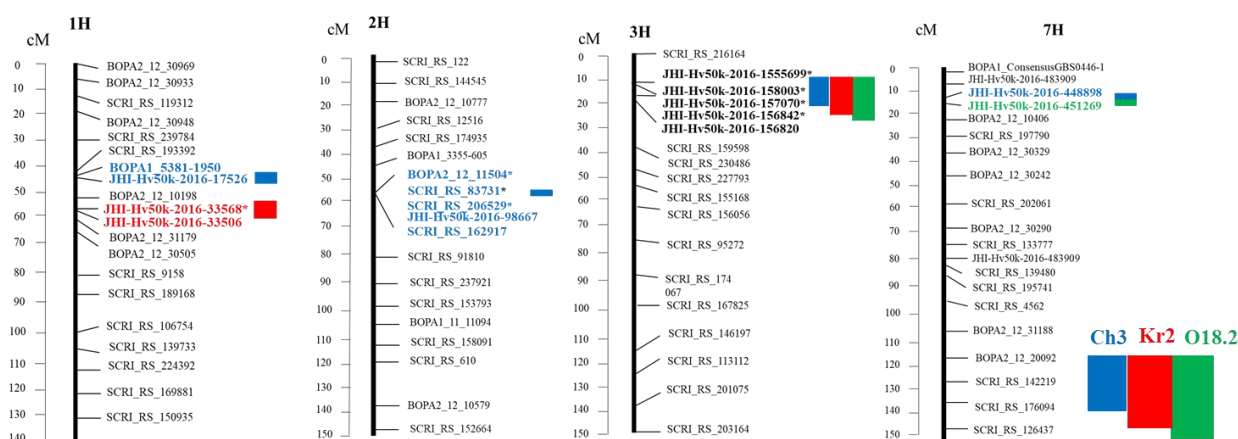


Рисунок 2. Локализация хромосомных районов, ассоциированных с устойчивостью к темно-бурой пятнистости, на карте «Mogex / Varke iSelect map» (<http://bioinf.hutton.ac.uk/iselect/app/>), выявленных в настоящей работе. Прямоугольниками разного цвета отмечены локусы, ассоциированные с устойчивостью к разным изолятам: синий – Ch3, красный – Kr2, зеленый – O18.2. * - SNP размещены на основе сопоставления физической и генетической позиций на хромосоме.

При ассоциативном картировании было выявлено шесть локусов на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 6Н, с высокой значимостью ($p < 0.05$) ассоциированных с устойчивостью к четырем изолятам *P. teres* на стадии проростков (Рис. 3). Все шесть районов на хромосомах 1Н, 2Н, 3Н и 6Н соответствовали расположению ранее описанных локусов, связанных с устойчивостью.

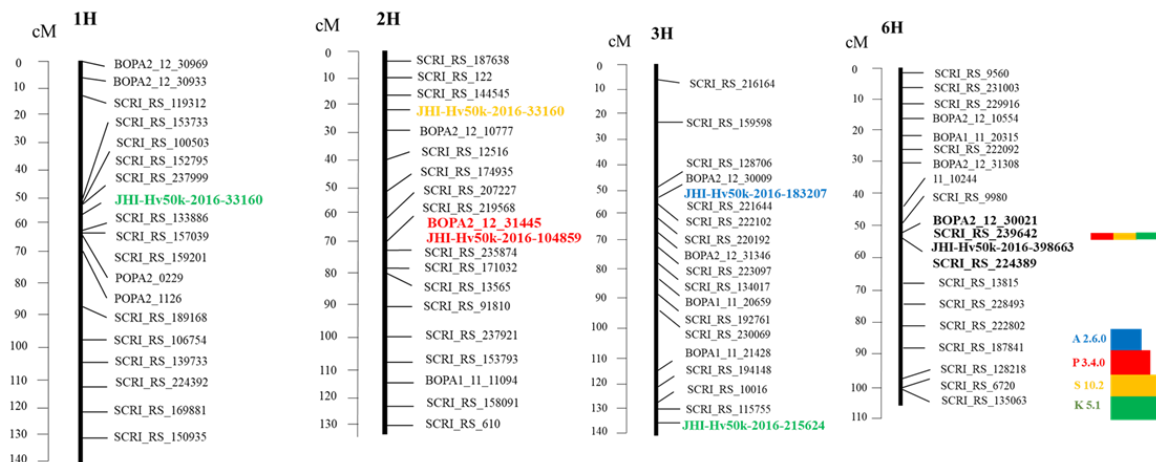


Рисунок 3. Локализация хромосомных районов, ассоциированных с устойчивостью к сетчатой пятнистости, на карте «Mogex / Varke iSelect map» (<http://bioinf.hutton.ac.uk/iselect/app/>), выявленных в настоящей работе. Разными цветами (текст/прямоугольники) отмечены локусы, ассоциированные с устойчивостью к разным изолятам: синий – А 2.6.0, красный – Р 3.4.0, оранжевый – S 10.2, зеленый – К 5.1.

Не было выявлено значимых SNP, ассоциированных с устойчивостью к корневым гнилям. Также не было выявлено значимой корреляции между устойчивостью к темно-бурой пятнистости и к корневым гнилям, что может указывать на разные генетические механизмы, отвечающие за устойчивость к этим двум разным болезням ячменя, вызываемым патогеном *C. sativus*.

PLS анализ. Для того, чтобы выявить общие локусы в геноме, ассоциированные с устойчивостью ячменя к различным изолятам патогена, данные по фенотипу и генотипу были преобразованы с помощью PLS анализа. В итоге были получены фенотипические и генотипические бикомпоненты, максимально соответствующие друг другу, которые отражают высокий уровень количественной устойчивости к трем исследуемым изолятам.

На графике корреляции бикомпонент по устойчивости к возбудителю темно-бурой пятнистости *C. sativus* на одном конце корреляционной кривой группируются восемь устойчивых сортов и линий, а на другом конце 30 восприимчивых (Рис. 4а). Корреляционный график бикомпонент, полученных с помощью PLS анализа данных по устойчивости к *P. teres* также показал разделение на разные группы: с одного края расположены 11 устойчивых сортов и линий, с другого края – 31 восприимчивых (Рис. 4б). При PLS анализе данных устойчивости к корневым гнилям также выявлено две группы: 13 устойчивых сортов и 45 восприимчивых сортов и линий (Рис. 4в).

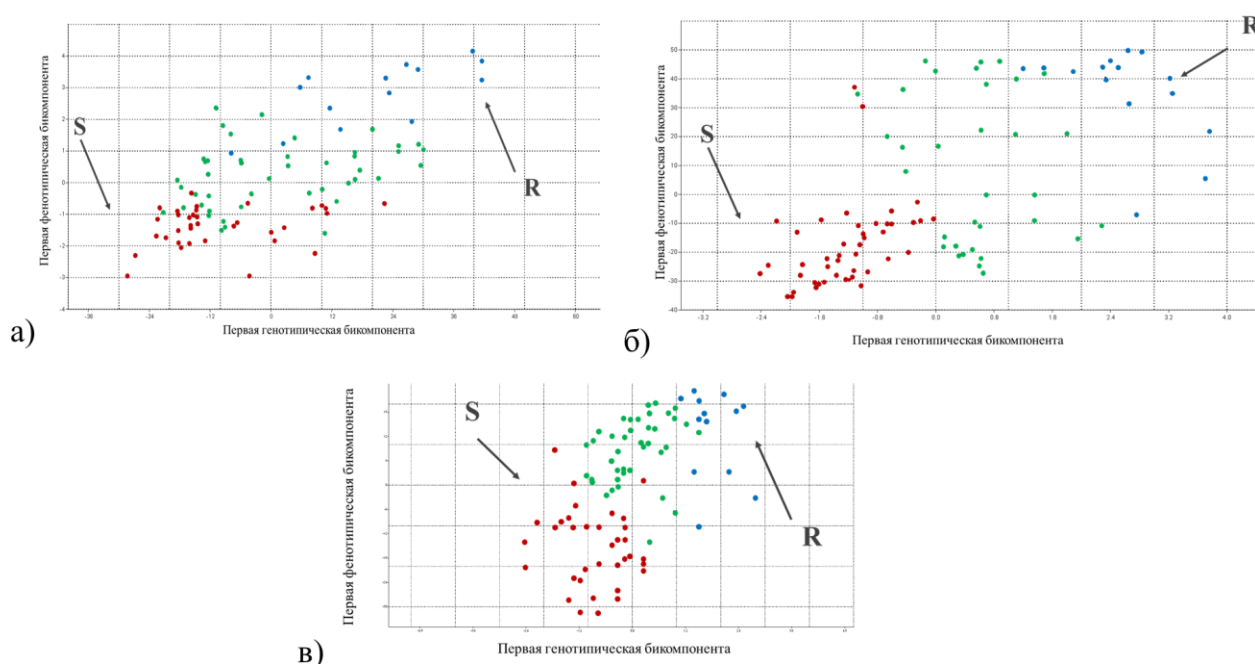


Рисунок 4. Графики первых бикомпонент, полученных с помощью PLS анализа по генотипическим и фенотипическим данным. Красным цветом показаны сорта, проявившие восприимчивость ко всем исследуемым изолятам (S), синим – устойчивые (R), зеленым – сорта, проявившие разный тип восприимчивости к изолятам. В экспериментах по изучению устойчивости ячменя к а) возбудителю темно-бурой пятнистости *C. sativus* устойчивыми оказались восемь сортов/линий: В-1, Бархатный, Биом, Г-21219, Колчан, Омский голозерный 2, Светик, Северный; б) возбудителю сетчатой пятнистости *P. teres* – одиннадцать сортов/линий были устойчивыми: №259/528, Алаг-Эрд-Эне, Алтан-Булаг, Белогорский, Кедр, Местный Приморский, Нарымчанин, Омский 13709, Омский голозерный 2, Паллидум 394, Северный; в) к изоляту O2.18 возбудителя корневых гнилей *C. sativus* выявилось тринадцать устойчивых сортов, среди которых Brodyole, Алей, Виконт, Ворсинский 2, Донецкий 8, Ильмень, Колчан, Медикум, Саша, Символ, Славянский, Челябинский 70, Норд 112412.

Применение полногеномного анализа ассоциаций к данным фенотипической бикомпоненты.

Полученный с помощью PLS-анализа вектор значений фенотипических данных (бикомпонента) был использован как фенотипический признак при полногеномном анализе ассоциаций. Выявленные в данном случае ассоциации должны отражать совокупную устойчивость ко всем взятым в анализ PLS изолятам.

С помощью этого подхода было обнаружено 3 геномных района и 35 SNP, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости *C. sativus*. Из них 27 SNP совпадали с локусами, выявленными в нашей работе ранее. Дополнительно выявились семь SNP на хромосоме 2Н (58.36-59.49 сМ) и один SNP на хромосоме 7Н (11.54 сМ). Ранее обнаруженный нами локус на хромосоме 1Н не проявился, что позволяет предположить, что он является расоспецифичным, в отличие от остальных обнаруженных локусов.

GWAS не выявил значимых маркеров, ассоциированных с устойчивостью к *P. teres*, при использовании первой фенотипической бикомпоненты. Также не было выявлено значимых маркеров, ассоциированных с устойчивостью к корневым гнилям, вызываемым *C. sativus*.

Разработка и валидация диагностических ДНК-маркеров.

Из 66 кандидатных SNP были выбраны 14, потенциально подходящих для разработки на их основе диагностических ПЦР-маркеров, десять из которых ассоциировались с устойчивостью к темно-бурой пятнистости и четыре – к сетчатой пятнистости. SNP маркеры были конвертированы в маркеры KASP и проверены на независимых выборках сортообразцов ячменя (Табл. 4, 5).

Из десяти маркеров, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю темно-бурой пятнистости, четыре маркера JHI-Hv50k-2016-156842, JHI-Hv50k-2016-156820, JHI-Hv50k-2016-157182 и JHI-Hv50k-2016-156999 рекомендованы в качестве диагностических (Табл. 4).

Для того, чтобы определить, какой маркер будет оптимальным для дальнейших селекционных программ, рассматривались такие статистические 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. 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-Hv50k-2016-156820 и JHI-Hv50k-2016-157182) с высоким процентом предсказания устойчивых сортов и диагностической эффективностью (Табл. 4). Коэффициенты корреляции Спирмена для них составили, соответственно, $R = -0,73 (p < 0,05)$ и $R = 0,43 (p < 0,05)$.

Таблица 4. Результаты KASP-генотипирования 22 образцов ячменя независимой выборки с помощью разработанных SNP-маркеров, ассоциированных с устойчивостью к изоляту *Ch3 C. 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%

* маркеры, рекомендованные для использования в селекционных программах.

На основе локуса JHI-Hv50k-2016-156999 (хромосома 3Н, 18,83 сМ) был разработан аллель-специфичный ПЦР-маркер (для экономичного варианта анализа; патент RU2740404). Результаты генотипирования образцов независимой выборки с разработанными KASP- и ПЦР-маркерами к этому локусу представлены на рисунке 5.

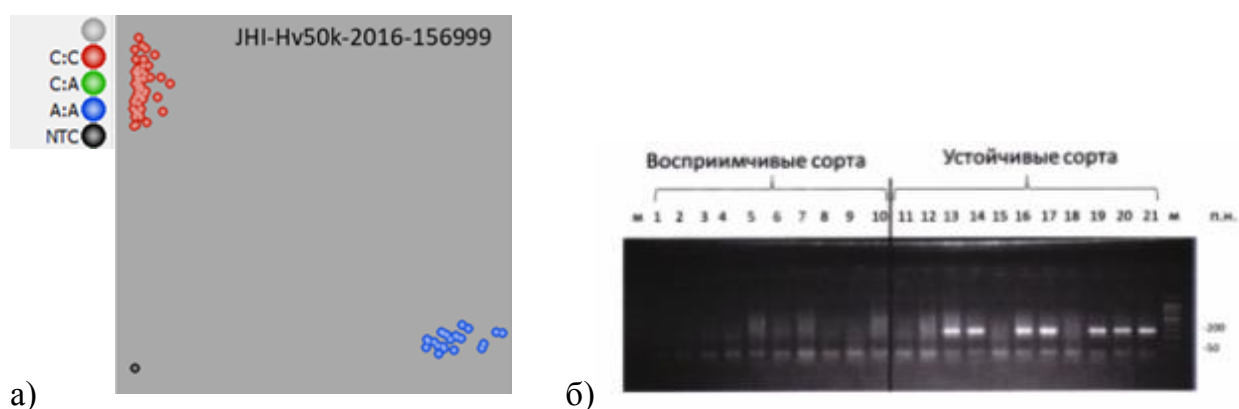


Рисунок 5. Пример результатов использования диагностических ДНК-маркеров, разработанных на основе SNP JHI-Hv50k-2016-156999: (а) График с осями X и Y, показывающий распределение аллелей KASP-маркера по исследуемым генотипам. Красные точки указывают на наличие С:С, синий, соответственно, А:А, зеленые точки показывают присутствие гетерозиготы, NTC – контрольный образец без добавления ДНК (б) аллель-специфичный маркер (патент RU2740404).

Из 4 маркеров, ассоциированных с устойчивостью к возбудителю сетчатой пятнистости, два (JHI-Hv50k-2016-183207 и JHI-Hv50k-2016-398663) рекомендованы в качестве диагностических (Табл. 5).

Таблица 5. 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 альтернативного аллеля среди восприимчивых образцов независимой выборки	Диагностическая эффективность
На независимой выборке, состоящей из 102 образцов ячменя, контрастных по устойчивости								
JHI-Hv50k-2016-398663	6Н	54.89	ТТ СС СТ	32 15 -	36%	40 11 -	78%	43%
JHI-Hv50k-2016-183207*	3Н	52.6	ТТ АА ТА	44 5 1	84%	10 38 1	73%	82%
JHI-Hv50k-2016-169338	3Н	51.20	АА GG GA	4 16 31	8%	11 19 19	36%	27%
JHI-Hv50k-2016-104859	2Н	72.59	АА GG AG	30 21 -	40%	43 8 -	85%	63%
На независимой выборке, состоящей из 11 дигаплоидных рекомбинантных линий от скрещивания сорта CI 5791, несущего locus устойчивости в хромосоме 6Н и восприимчивого сорта Harrington.								
JHI-Hv50k-2016-398663*	6Н	54.89	ТТ СС СТ	0 5 -	100%	6 0 -	100%	100%
JHI-Hv50k-2016-183207	3Н	52.6	ТТ АА ТА	0 5 -	100%	3 3 -	50%	72%
JHI-Hv50k-2016-169338	3Н	51.20	АА GG GA	2 0 3	0%	3 0 3	50%	27%
JHI-Hv50k-2016-104859	2Н	72.59	АА GG AG	5 0 -	0%	6 0 -	100%	54%

* маркеры, рекомендованные для использования в селекционных программах.

Маркер JHI-Hv50k-2016-398663 (хромосома 6Н, позиция 54.89 сМ) не показал себя как диагностический на независимой выборке, состоящей из 102 контрастных по устойчивости сортообразцов ячменя ($R = -0,12, p > 0,05$). 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 ($R = -0,87, p < 0,05$). 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 ($R = -0.5, p < 0,05$). Этот маркер может быть рекомендован для отбора носителей локуса устойчивости в хромосоме 3Н.

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 хромосомный 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 работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. Afanasenko O., **Rozanova I.**, Gofman A., Lashina N., Novokazi F., Mironenko N., Baranova O., Zubkovich A. (2022). Validation of molecular markers of barley net blotch resistance loci on chromosome 3H for marker-assisted selection. *Agriculture*, 12(4), 439;
2. **Rozanova I. V.**, Lashina N. M., Efimov V. M., Afanasenko O. S., Khlestkina E. K. (2020). The in-silico development of DNA markers for breeding of spring barley varieties that are resistant to spot blotch in Russia. *Agriculture*, 10(11), 505;
3. **Розанова И. В.**, Хлесткина Е. К. (2020). NGS-секвенирование в селекционно-генетических исследованиях ячменя. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 24(4), 348-355;
4. **Rozanova I. V.**, Lashina N. M., Mustafin Z. S., Gorobets S. A., Efimov V. M., Afanasenko O. S., Khlestkina E. K. (2019). SNPs associated with barley resistance to isolates of *Pyrenophora teres f. teres*. *BMC Genomics*, 20(S3), 292;
5. **Вукова(Розанова) И. В.**, Lashina N. M., Efimov V. M., Afanasenko O. S., Khlestkina E. K. (2017). Identification of 50 K Illumina-chip SNPs associated with resistance to spot blotch in barley. *BMC Plant Biology*, 17(S2), 250

Патенты:

Розанова И.В., Шоева О.Ю., Хлесткина Е.К. ДНК-маркер для селекции сортов ярового ячменя, устойчивых к темно-бурой пятнистости. Патент на изобретение 2740404 С1, 14.01.2021. Заявка № 2020120776 от 16.06.2020.