

*На правах рукописи*

**ШАЙДАЮК ЕКАТЕРИНА ЛЬВОВНА**

**СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *PUSSINIA TRITICINA*  
НА ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЕ В РОССИИ**

**Шифр и наименование специальности  
03.02.12 - микология**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург, 2020

Работа выполнена в Федеральном Государственном Бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

**Научный руководитель:**

**Гультяева Елена Ивановна**

доктор биологических наук, доцент,  
ведущий научный сотрудник лаборатории микологии  
и фитопатологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ  
защиты растений»

**Официальные оппоненты:**

**Плотникова Людмила Яковлевна**

доктор биологических наук,  
профессор кафедры агрономии, селекции и  
семеноводства ФГБОУ ВО «Омский государственный  
аграрный университет имени П.А. Столыпина»

**Сколотнева Екатерина Сергеевна**

кандидат биологических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории  
молекулярной фитопатологии ФГБНУ «Федеральный  
исследовательский центр Институт цитологии и  
генетики Сибирского отделения Российской академии  
наук»

**Ведущее учреждение:**

ФГБОУ ВО «Московский государственный  
университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится 14 мая 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.015.01 на базе Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений по адресу: 196608, Санкт-Петербург-Пушкин, шоссе Подбельского, д. 3,  
факс: 470-51-10; E-mail: info@vizr.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЗР и на сайте vizrspb.ru Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений

Автореферат разослан « » \_\_\_\_\_ 2020 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор биологических наук

Гусева Ольга Геннадьевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность.** Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf.) – одна из древнейших продовольственных культур. В Российской Федерации она возделывается в Поволжье, Зауралье, Западной Сибири и на Северном Кавказе (Розова, Зиборов, 2015; Гончаров, Курашов, 2018; Романенко и др., 2018). Благодаря диетическим и питательным свойствам муки ей отдают предпочтение в макаронном производстве и некоторых других пищевых отраслях.

Одним из факторов, определяющих недобор урожая твердой пшеницы, является поражение болезнями. Бурая ржавчина – распространенное заболевание твердой пшеницы во всех регионах выращивания (Fernandez, Knox, 2012). Вызывает его биотрофный патоген *Puccinia triticina* Erikss., который поражает также мягкую пшеницу, другие виды *Triticum* L., *Aegilops* L. и злаковые травы. До недавнего времени считалось, что вид *T. durum* более устойчив к бурой ржавчине по сравнению с *T. aestivum* (Вавилов, 1964; Дорофеев и др., 1987). Актуальность для твердой пшеницы заболевание приобрело в 2000 годах, когда в ряде стран поразились ранее устойчивые к бурой ржавчине сорта (Huerta-Espino, Roelfs, 1989; Singh et al., 2004; Martinez et al., 2005; Ordoñez, Kolmer, 2007; Huerta-Espino et al., 2009; Goyeau et al. 2012). Эпифитотийное развитие болезни наблюдали в регионах выращивания *T. durum* в Северной и Южной Америке, в Западной Европе и Средиземноморье (Singh et al., 2004; Martinez et al., 2005; Goyeau et al., 2006). Степень развития бурой ржавчины на твердой пшенице в России варьирует по годам и регионам (Евдокимов, 2006; Розова и др., 2015; Беляева и др., 2018; Юсов и др., 2018).

Популяции возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице охарактеризованы по признаку вирулентности и полиморфизму микросателлитных локусов во многих странах (Martinez et al., 2005; Ordoñez, Kolmer, 2007; Mantovani et al., 2010; Goyeau et al., 2012; Kosman et al., 2014). В России исследования популяций *P. triticina* на твердой пшенице по признаку вирулентности проводились ограниченно на Дагестанской опытной станции ВИР в 1970-1980 гг. (Дмитриев и др., 1976; Берлянд-Кожевников и др., 1978; Михайлова, Метревели, 1986). Сведения о вирулентности патогена в других регионах РФ, где выращивается твердая пшеница, отсутствуют.

**Степень разработанности темы.** Анализ литературы, посвященной данной проблеме, показал высокую актуальность популяционно-генетических исследований *P. triticina* на твердой пшенице за рубежом (Goyeau et al., 2012; Bhardwaj et al., 2013; Liu et al., 2014; Kolmer, 2015; Kolmer et al., 2019). Перманентный анализ позволил выявить патотипы с новыми аллелями вирулентности (Bhardwaj et al., 2013; Kolmer, 2015). Охарактеризована комплексная динамика изменчивости популяций *P. triticina* на твердой пшенице по вирулентности и микросателлитным локусам. Исследованы микроэволюционные процессы в популяциях патогена с использованием анализа нуклеотидной последовательности интрон-содержащих участков гена РНК-полимеразы (RPB2) и информативных для рода *Puccinia* SSR-локусов (Liu et al., 2014), а также метода геномного генотипирования (секвенирование ДНК ассоциированной с сайтами рестрикции (RADseq)) (Kolmer et al., 2019).

Очевидный прогресс в расширении посевных площадей твердой пшеницы в России (Гончаров, Курашов, 2018) предопределяет актуальность проведения популяционных исследований *P. triticina*.

**Цель работы** – охарактеризовать генетическую структуру популяций возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице по признаку вирулентности и микросателлитным маркерам.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие задачи:

- 1) Изучить структуру популяций возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице в географически отдаленных регионах России по признаку вирулентности.
- 2) Оценить полиморфизм микросателлитных локусов у изолятов *P. triticina* широкого географического происхождения.
- 3) Сравнить структуру российских популяций *P. triticina* на твердой пшенице со структурой на мягкой пшенице.
- 4) Оценить устойчивость образцов твердой пшеницы к популяциям *P. triticina* с твердой и мягкой пшеницы.
- 5) Охарактеризовать молекулярно-генетическую структуру популяций *P. triticina* на твердой пшенице в России.

### **Научная новизна исследований**

Впервые в России с привлечением анализа вирулентности и молекулярных маркеров изучена структура популяций *P. triticina* на твердой пшенице.

Охарактеризованы вирулентность и расовый состав популяций патогена в географически отдаленных регионах РФ. Выявлены отличия северокавказских образцов популяций патогена от волжских, уральских и западносибирских.

Изучен полиморфизм микросателлитных локусов у изолятов *P. triticina* из географически отдаленных регионов РФ. С использованием молекулярных маркеров установлена дифференциация российских популяций возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице на европейскую и азиатскую.

Выявлены различия по вирулентности у изолятов *P. triticina* на твердой и мягкой пшенице. Устойчивость образцов твердой пшеницы при инокуляции изолятами патогена с твердой и мягкой пшеницы существенно варьирует. Популяции патогена с *T. durum* более вирулентны для сортов и линий твердой пшеницы, чем популяции с *T. aestivum*.

### **Теоретическая значимость работы**

Результаты комплексных исследований привнесли новые знания в популяционную биологию биотрофного гриба *P. triticina*. Подобные исследования на твердой пшенице в России ранее не проводились. Сравнительный анализ структуры популяций патогена на твердой и мягкой пшенице позволил уточнить микроэволюционные процессы, происходящие в популяциях *P. triticina* (полиморфизм, ареалы, генетический дрейф, происхождение).

### **Практическая значимость работы**

Результаты исследований популяций *P. triticina* могут быть использованы в селекции на устойчивость твердой пшеницы к бурой ржавчине. Информация о вирулентности патогена в географически отдаленных регионах России предполагает рациональное размещение новых генетически защищенных сортов.

### **Методология и методы исследований**

Методологическая основа исследований базируется на разработанных в ВИЗР подходах изучения популяций фитопатогенных грибов (Левитин и др., 2019). Методически

работа включает традиционные фитопатологические методы исследований популяций и дополнена использованием молекулярных маркеров.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Популяции *P. triticina* различаются по частотам вирулентности и фенотипическому составу в зонах выращивания озимой (Северо-Кавказский регион) и яровой (Поволжье, Южный Урал, Западная Сибирь) твердой пшеницы в России. Высоким сходством по вирулентности характеризуются северокавказские образцы популяций – краснодарские, дагестанские и ростовские, и азиатские – челябинские, омские и алтайские. По признаку вирулентности российские популяции возбудителя бурой ржавчины подразделяются на европейские и азиатские.

2. С помощью микросателлитных маркеров подтверждена дифференциация российских популяций *P. triticina* на твердой пшенице на европейские и азиатские. С использованием SSR- маркеров интенсивный генный поток определен внутри европейских и азиатских популяций, на что указывает большое число общих генотипов. Между географически отдаленными европейской и азиатской популяциями выявлен умеренный генный поток.

3. Популяции *P. triticina* на твердой пшенице существенно отличаются по составу аллелей вирулентности от изолятов, собранных на мягкой пшенице. Сорты твердой пшеницы при инокуляции в фазе проростков сильнее поражаются изолятами патогена с твердой пшеницы, чем с мягкой.

### **Степень достоверности и апробация результатов работы**

Работа проводилась в лаборатории микологии и фитопатологии ФГБНУ «Всероссийский НИИ защиты растений». Популяционные исследования патогена по признаку вирулентности и микросателлитным маркерам выполнены по Гос. заданиям ВИЗР и в рамках проектов РНФ №14-26-00067 и №19-76-30005.

Достоверность результатов исследований подтверждается статистической обработкой полученных данных, широким обсуждением их на научных мероприятиях и в печатных работах.

Основные результаты работы представлены на 6 российских и международных конференциях: IV Всероссийский съезд по защите растений (Санкт-Петербург, 9-11 сентября 2019 г.), VIII Congress on Plant Protection (Zlatibor, Serbia, 25-29 ноября 2019 г.), IV (XII) Международная ботаническая конференция молодых учёных в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 22-28 апреля 2018 г.), «Микология и альгология России. XX - XXI век: смена парадигм» (Москва (МГУ), 17-19 ноября 2018 г.), Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Развитие научного наследия Н.И. Вавилова по генетическим ресурсам его последователями» (Дербент, 26-29 июня 2017 г.), 4 съезд микологов России (Москва, 2-14 апреля 2017 г.).

**Личный вклад автора.** Диссертационная работа является результатом исследований 2017-2019 гг., выполненных лично автором. Автор принимал участие на всех этапах работы. Ему принадлежат формулирование проблемы, постановка цели и задач, планирование и проведение экспериментов и интерпретация полученных данных.

**Публикации по теме диссертации.** По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, и международных баз данных, 6 – материалы и тезисы конференций.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 114 страницах, содержит 17 рисунков и 28 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, 5 глав с изложением экспериментального материала, содержащих описание объектов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений и двух приложений. Список цитированной литературы включает 175 источников, в том числе 97 иностранных работ.

**Благодарности.** Выражаю искреннюю благодарность моему научному руководителю Гульятеевой Елене Ивановне за помощь на всех этапах выполнения и написания диссертации. Глубоко признательна всему коллективу лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР. Большое спасибо проф. Е. Косману (Institute for Cereal Crops Improvement, Tel Aviv University) за огромную помощь в статистической обработке данных. Особая благодарность – И.А. Казарцеву за помощь в проведении SSR-анализа и магистранту ЛГУ им. Пушкина Д.Р. Яковлевой, принимавшей участие на разных этапах работы.

Автор выражает глубокую благодарность К.М. Абдуллаеву, В.С. Юсову, П.Н. Мальчикову, М.А. Розовой, Н.В. Шишкину, Е.Р. Шрейдер, Е.Е. Радченко, И. В. Грушевой, А. Кохметовой, Ж.Н. Худокормовой, И.Б. Абловой и всем другим коллегам из ВИР, ДОС ВИР, КОС ВИР, НЦЗ им. П.П. Лукьяненко, ЧНИИСХ, ОмГАУ, Самарского НИИСХ, СФНЦА РАН, АНЦ «Донской», ФБНУ ФАНЦА, ИЦиГ за помощь в сборе инфекционного материала.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **ВВЕДЕНИЕ**

Во введении обоснована актуальность темы. Представлены цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы.

#### **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

В обзоре литературы обсуждаются биологические особенности *P. triticina* и представлена характеристика твердой пшеницы (*T. durum*) как растения-хозяина для возбудителя бурой ржавчины. Описаны основные достижения в популяционных исследованиях *P. triticina* на твердой пшенице за рубежом и в России.

#### **Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

**2.1 Материал исследований.** Инфекционный материал собран на твердой пшенице в 2017-2019 гг. в четырех агроклиматических регионах РФ: Северо-Кавказский, Средневолжский, Уральский, Западно-Сибирский. В Северо-Кавказском регионе сборы проводили на коллекционных посевах озимой твердой пшеницы на Дагестанской опытной станции ВИР (2017-2019 гг.), Кубанской опытной станции ВИР (2017-2019 гг.), в Национальном центре зерна им. П.П. Лукьяненко (2019 г.) и Аграрном научном центре «Донской» (2018-2019 гг.). В Средневолжском регионе материал был собран на посевах яровой твердой пшеницы в Самарском НИИ сельского хозяйства им. Тулайкова (2017-2019 гг.) и в Чувашской сельскохозяйственной академии (2018 г.); в Уральском регионе – в ФГУП «Троицкое» (2018 г.) и в Челябинском НИИ сельского хозяйства (2019 г.); в Западно-Сибирском регионе – в Федеральном Алтайском научном центре агробиотехнологий (2017 г.), в Омском аграрном научном центре и Омском аграрном университете им. Столыпина (2018 г.). Кроме того в исследования включили образцы *P. triticina* из Южного Казахстана, собранные на селекционном участке в Алма-атинской области в 2018 г. Число изученных изолятов представлено в таблице 1.

Таблица 1. Происхождение изолятов *Puccinia triticina* с твердой пшеницы

Регион	Место сбора	Год	Количество образцов популяций	Изучено изолятов в анализе	
				вирулентность	SSR
Северо-Кавказский (СК)	Дагестан	2017	12	75	7
		2018	12	60	13
		2019	8	42	6
	Краснодарский край	2017	1	8	3
		2018	21	65	5
		2019	14	51	7
	Ростовская обл.	2018	4	32	7
		2019	2	10	4
		2017	3	17	4
Средневожский (СВ)	Самарская обл.	2018	2	18	9
		2019	6	28	6
		2018	2	10	4
Уральский (У)	Чувашия	2018	2	10	4
	Челябинская обл.	2018	6	21	9
		2019	1	7	5
Западно-Сибирский (ЗС)	Алтайский край	2017	1	5	4
	Омская обл.	2018	4	25	12

В 2017-2018 гг. провели сравнительный анализ вирулентности и фенотипического состава популяций патогена на *T. durum* и *T. aestivum*. Сборы инфекционного материала на двух видах пшеницы были сделаны в идентичных точках.

Исследовали устойчивость к бурой ржавчине 21 образца яровой твердой пшеницы, присланных из Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ) в 2017 г.

## 2.2 Методы изучения структуры популяций *Puccinia triticina*

**2.2.1 Анализ вирулентности.** Выделение и размножение монопустульных изолятов проводили с использованием 10-14-дневных проростков восприимчивых сортов твердой и мягкой пшеницы, в сосудах с почвой. При анализе вирулентности *P. triticina* использовали 38 почти изогенных линий Thatcher (Tc) и сортов с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr30*, *Lr32*, *Lr33*, *Lr34*, *Lr41(=39)*, *Lr42*, *Lr44*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr50*, *Lr51*, *Lr52 (=W)*, *Lr53*, *Lr57* и *Lr64*.

Тип реакции учитывали через 10-12 дней после заражения по балловой шкале E.V. Mains и H. S. Jackson (1926), где: 0 – отсутствие симптомов; 0; – некрозы без пустул; 1 – очень мелкие пустулы, окруженные некрозом; 2 – пустулы среднего размера, окруженные некрозом или хлорозом; 3 – пустулы среднего размера без некроза, 4 – крупные пустулы без некроза, X – пустулы на одном и том же листе разных типов, присутствуют хлорозы и некрозы. Растения с типом реакции 0–2 относили к устойчивым, 3–4 и X – к восприимчивым.

Фенотипы определяли на 20 TcLr-линиях. Для обозначения фенотипов TcLr-линии разделили на пять групп (по четыре линии в каждой): I – *Lr1*, *Lr2a*, TcLr2c, *Lr3a*; II – *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*; III – *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*, IV – *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14a*, *Lr14b*; V – *Lr15*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*. Первые три группы аналогичны международному набору, предложенному D. Long и J. Kolmer (1989), другие две включают линии, эффективные для дифференциации российских популяций *P. triticina* (Гультяева, 2018).

**2.2.2 Микросателлитный анализ.** Для проведения SSR анализа использовали изоляты патогена, предварительно охарактеризованные по признаку вирулентности. Выделение ДНК из спорового материала гриба проводили согласно методике A. Justesen с соавторами (2002). Для деструкции спор использовали гомогенизатор FastPrep®-24. Для

молекулярных исследований отобрали 11 SSR-маркеров: PtSSR50, PtSSR55, PtSSR61, PtSSR68, PtSSR91, PtSSR92, PtSSR151A, PtSSR152, PtSSR158 (Szabo, Kolmer, 2007), RB8, RB26 (Duan et al., 2003). Прямые праймеры всех маркеров были помечены флуоресцентными красителями FAM, TAMRA и HEX. Амплификацию проводили с использованием термоциклера C1000 BioRad. Генетический анализатор ABI Prism 3500 XL (ABI-Hitachi, Япония) использовали для проведения SSR анализа. Размер аллелей определяли с помощью программы STRand Analysis Software.

**2.2.3 Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов анализа вирулентности проводили в пакете программ VirulenceAnalysisTool (VAT) (Kosman et al., 2008). Определяли буквенный код фенотипов (pac), частоты вирулентности и фенотипов, индексы разнообразия и генетических дистанций. Для оценки внутрипопуляционного разнообразия *P. triticina* использовали индекс Нея (Nei Diversity, Hs), Шеннона (Sh) и индекс Космана (Kosman diversity within, KWm). Первый указывает на разнообразие популяций по частотам аллелей, второй – по фенотипическому составу и третий – по обоим параметрам (Kosman et al., 2008). Для оценки степени различий между популяциями использовали индекс Нея (Nei distance, N\_d), характеризующий генетическое расстояние по частотам аллелей (Nei, 1972), индекс Роджерса (Rogers distance, R) – по фенотипическому составу, индекс Космана (Kosman distance, KBm) – по частотам вирулентности и фенотипическому составу (Kosman et al., 2008). Кроме того использовали индекс генетических дистанций Fst, широко применяемый в популяционных исследованиях. Вычисление Fst проводили с использованием алгоритма AMOVA в пакете программ GenAlEx.

Для характеристики разнообразия коллекций *P. triticina* по микросателлитным локусам использовали общепринятые в генетико-популяционных исследованиях показатели: среднее число аллелей (Na), число эффективных аллелей (Ne), ожидаемая (He) и наблюдаемая (Ho) гетерозиготность, индекс фиксации (F) и индекс Шеннона (I). Различия между коллекциями изолятов определяли с помощью индексов Нея (Nei genetic distance, N\_d), Космана (KBm) и Fst. Статистическая обработка результатов SSR анализа выполнена с помощью пакета программ GenAlEx 6.5 (за исключением индекса KBm). Группировка популяций в кластеры выполнена с использованием алгоритма UPGMA (метод нахождения ближайшего соседа) (Evanno et al., 2005) в программе NTSYSpc 2.2 и с помощью опции Principal Coordinates (PCoA) в пакете программ GenAlEx.

**2.3 Фитопатологические методы изучения устойчивости сортов твердой пшеницы.** Устойчивость образцов твердой пшеницы оценивали в фазе проростков. 10-14-дневные растения опрыскивали водной суспензией спор с добавлением детергента Твин-80 и помещали во влажную камеру в темноту на 10-12 ч. После этого растения переносили на светоустановку и инкубировали при температуре 20-23 °С и фотопериоде 14 ч день / 10 ч ночь. Для инокуляции использовали 9 тест-изолятов патогена с твердой и 10 – с мягкой пшеницы. Изоляты различались между собой по географическому происхождению и по вирулентности. Учет типа реакции на заражение проводили на 10-14 день после инокуляции по описанной выше шкале E.V. Mains и H. S. Jackson.

**2.4 Использование ДНК-маркеров для идентификации Lr-генов у образцов твердой пшеницы.** Выделение ДНК из 4-7-дневных проростков пшеницы проводили по методике предложенной Edwards et al. (1991) в модификации Дорохова и Клоке (1997). Амплификация

ДНК выполнена по протоколам, предложенным авторами праймеров; при необходимости проведена модификация условий. В работе использовали маркеры генов *Lr1*, *Lr3a*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34* и *Lr37*.

### Глава 3. СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ *Puccinia triticina* НА ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЕ ПО ПРИЗНАКУ ВИРУЛЕНТНОСТИ

Определение степени сходства по фенотипическому составу между споровыми образцами популяций, собранными в различных географических точках, позволяет судить о том, принадлежат ли они к одной или разным генеральным популяциям (Мироненко, 2010). В данных исследованиях использовали материал *P. triticina*, собранный в Северо-Кавказском, Средневолжском, Уральском и Западно-Сибирском регионах, т.е. во всех агроклиматических зонах РФ, где возделывается твердая пшеница.

#### 3.1 Вирулентность и фенотипический состав *Puccinia triticina* в Северо-Кавказском регионе

Изучение дагестанской коллекции *P. triticina*. Все изоляты были авирулентными к линиям с генами *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr41*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr52*, *Lr53* и вирулентными к *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr18*, *Lr30*, *Lr32*, *Lr33*, *Lr34*, *Lr44*, *Lr48*, *Lr49*, *Lr64*. Варьирование по вирулентности отмечено на линиях *TcLr17*, *TcLr20*, *TcLr23* и *TcLr26* (табл. 2). Большинство изученных изолятов были авирулентны к линии *TcLr17*. Вирулентность выявлена у изолятов, выделенных с сорта *Арегі* в 2018 г и с образца к-35051 – в 2019 г. Частоты вирулентности к линиям *TcLr26* и *TcLr23* были высокими во все годы исследований (79%-100%). Авирулентность к линии *TcLr26* отмечена у изолятов на линии *Audin 93* в 2017 г.; к линии *TcLr23* – на образце к-48210 в 2019 г. Более высокое варьирование частот вирулентности наблюдали на линии *TcLr20* (0%-50%). В 2017 г. вирулентными к ней были изоляты с сортов *Tottebianca* и *Cuney Vildizi*; в 2018 г. – с образцов к-61650, к-20114, к-57212; в 2019 г. – с образцов к-48210, к-54946, к-34991, к-35051.

Таблица 2 – Частоты вирулентности *Puccinia triticina* в Северо-Кавказском регионе (%)

Линии с генами <i>Lr</i>	Дагестан			Краснодарский край				Ростовская обл.			Северо-Кавказский регион	
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	Среднее	2018	2019	Среднее		
<i>2a, 2b, 2c, 9, 15, 16, 19, 24, 28, 29, 41, 45, 47, 51, 52, 53</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>17</i>	0	7	12	6	0	8	9	6	0	0	7	
<i>20</i>	15	30	38	28	0	49	9	19	0	50	25	
<i>23</i>	100	100	88	96	100	79	92	90	100	100	95	
<i>26</i>	93	100	100	97	100	100	100	100	100	100	98	
<i>1, 3a, 3bg, 3ka, 10, 11, 14a, 14b, 18, 30, 32, 33, 34, 44, 48, 49, 64</i>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Изучено изолятов	75	60	42	177	8	65	51	124	32	10	42	343

В дагестанской субпопуляции определено четыре фенотипа вирулентности (MCRKG, MCRKH, MCTKG, MBRKG). Фенотипы MCRKH и MCRKG, различающиеся между собой по вирулентности к *Lr20*, были наиболее представленными (табл. 3). Фенотип MBRKG, отличающийся от них авирулентностью к *Lr26*, отмечен только в 2017 г., а фенотип MCTKG, вирулентный к *Lr17*, – в 2018 и 2019 гг.

Таблица 3 – Частоты фенотипов *Puccinia triticina* в Северо-Кавказском регионе (%)

Фенотипы	Авирулентность к линиям Thatcher с генами <i>Lr</i>	Дагестан				Краснодарский край				Ростовская обл.			Северо-Кавказский регион
		2017	2018	2019	Среднее	2017	2018	2019	Среднее	2018	2019	Среднее	
MCRKG	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 17, 19,20, 24	78	63	50	<b>64</b>	100	43	84	<b>76</b>	100	50	<b>75</b>	<b>71</b>
MCRKH	2a, 2b, 2c, 9, 15, 16,17, 19, 24	15	30	38	<b>28</b>	0	41	8	<b>16</b>	0	50	<b>25</b>	<b>23</b>
MCTKG	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19,20, 24	0	7	12	<b>6</b>	0	8	8	<b>5</b>	0	0	<b>0</b>	<b>4</b>
MCTKH	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24	0	0	0	<b>0</b>	0	8	0	<b>3</b>	0	0	<b>0</b>	<b>1</b>
MBRKG	2a, 2b, 2c, 9, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26	7	0	0	<b>2</b>	0	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0,7</b>

*Изучение краснодарской коллекции P. triticina.* Вирулентность краснодарских изолятов была сходна с дагестанскими (табл. 2). Варьирование частот вирулентности отмечено на линиях с генами *Lr17*, *Lr20* и *Lr23*. Вирулентность к *Lr17* наблюдали в 2018 г. у изолятов с сорта Харьковская 909, а в 2019 г. – с образца к-55594. Вирулентность к *Lr20* была выше в 2018 г. и слабо представлена в 2019 г. Вирулентные изоляты в 2018 г. отмечены на 8 образцах твердой пшеницы (Леукурум 21, Рамоникум 2587, Харьковская 909, BGR5962, BGR5354, BGR5725, Roclug и к-51858), а в 2019 г. – на одном. Авирулентность к *Lr23* в 2018 г. определена у изолятов на трех образцах твердой пшеницы (к-44461, к-38091, Харьковская 909), а в 2019 г. – на одном (к-55608).

Четыре фенотипа вирулентности выявлены в краснодарской субпопуляции (MCRKG, MCRKH, MCTKH, MCTKG) (табл. 3). Фенотип MCRKG был общим для трех лет исследований (частота 43-100%), фенотип MCTKH выявлен только в 2018 г. (частота 8%).

*Изучение ростовской коллекции P. triticina.* Ростовская субпопуляция была сходна по вирулентности с дагестанской и краснодарской (табл. 2). Варьирование по вирулентности отмечено только на линии *TcLr20* в 2019 г.: изоляты с сорта Шулындрипка были авирулентными к этой линии, а с сорта Марат – вирулентными.

Два фенотипа (MCRKH, MCRKG), различающиеся по вирулентности к *Lr20*, выявлены в ростовской субпопуляции *P. triticina* (табл. 3). Эти фенотипы были общими с обнаруженными в дагестанской и краснодарской субпопуляциях.

Всего в северокавказской популяции определено пять фенотипов вирулентности (MCRKG, MCRKH, MCTKG, MCTKH, MBRKG). Два из них, MCRKG и MCRKH, были общими для изученных северокавказских субпопуляций. Среднее число аллелей вирулентности в трех северокавказских образцах популяций было сходным (10,2-10,4). Согласно индексам Нея, Шеннона, Космана внутривидовое разнообразие краснодарской и дагестанской коллекций *P. triticina* было несколько выше ( $H_s=0,03$ ;  $Sh=0,17-0,19$ ;  $KW_m=0,03-0,04$ ), чем ростовской ( $H_s=0,01$ ;  $Sh=0,1$ ;  $KW_m=0,01$ ). В целом объединенная северокавказская популяция характеризовалась умеренным внутривидовым разнообразием ( $H_s=0,03$ ;  $Sh=0,15$ ;  $KW_m=0,03$ ). Значения индексов генетических дистанций Нея, Роджерса и Космана указывали на высокое сходство между всеми северокавказскими субпопуляциями *P. triticina* ( $N_d=0,001-0,002$ ;  $R=0,06-0,25$ ;  $KW_m=0,01-0,02$ ).

### 3.2 Вирулентность и фенотипический состав *Puccinia triticina* в Средневолжском регионе

Вирулентность волжских изолятов была сходна с северокавказскими (табл. 4), за исключением вирулентности к линиям *TcLr44* и *TcLr17*. В отличие от северокавказских, все

волжские изоляты характеризовались авирулентностью к линии *TcLr44*. Частота вирулентности к линии *TcLr17* в волжской популяции была существенно выше (98% и 7% соответственно) (табл. 4, 2). Авирулентность к *Lr17* выявлена только в 2018 г. на одной линии ISD-22. Варьирование по вирулентности отмечено на линиях с генами *Lr20* и *Lr26*. В 2019 г. изоляты со всех проанализированных сортов (за исключением сорта Триада) были вирулентными к линии *TcLr26*, и авирулентными к *TcLr20*.

В Средневолжском регионе выявлено четыре фенотипа вирулентности (табл. 5).

Таблица 4 – Частоты вирулентности *Puccinia triticina* в Средневолжском регионе (%)

Линии с генами <i>Lr</i>	Самарская обл.			Чувашия	<i>Среднее Поволжье</i>	
	2017	2018	2019	Ср.		2018
2a, 2b, 2c, 9, 15, 16, 19, 24, 28, 29, 41, 44, 45, 47, 51, 52, 53	0	0	0	<b>0</b>	0	<b>0</b>
17	100	89	100	<b>96</b>	100	<b>98</b>
20	53	0	18	<b>24</b>	0	<b>19</b>
26	100	100	82	<b>94</b>	100	<b>98</b>
1, 3a, 3bg, 3ka, 11, 14a, 14b, 18, 23, 30, 32, 33, 34, 48, 49, 64	100	100	100	<b>100</b>	100	<b>100</b>
Изучено изолятов	17	18	28	<b>63</b>	10	<b>73</b>

Таблица 5 – Частоты фенотипов *Puccinia triticina* в Средневолжском регионе (%)

Фенотипы	Авирулентность к линиям Thatcher с генами <i>Lr</i>	Самарская обл.			Чувашия	<i>Среднее Поволжье</i>	
		2017	2018	2019	Среднее		2018
МВТКН	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24, 26	0	0	18	<b>6</b>	0	<b>7</b>
МСРКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 17, 19, 20, 24	0	11	0	<b>4</b>	0	<b>3</b>
МСТКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 20, 24	47	89	82	<b>73</b>	100	<b>78</b>
МСТКН	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24	53	0	0	<b>18</b>	0	<b>12</b>

Число аллелей вирулентности в средневолжской популяции патогена было несколько выше (11), чем в северокавказской (10,3). Значения индексов внутривидового разнообразия для средневолжской популяции *P. triticina* были на сходном уровне с северокавказской популяцией ( $H_s=0,02$ ;  $H_h=0,17$ ;  $KW_m=0,03$ ).

### 3.3 Вирулентность и фенотипический состав *Puccinia triticina* в Уральском регионе

Вирулентность уральской популяции была сходна с волжской (табл. 6). Все челябинские изоляты были авирулентны к линии *TcLr44* и вирулентны к *TcLr17*. Варьирование по вирулентности отмечено на линиях с генами *Lr20*, *Lr23* и *Lr26*. Частота изолятов, авирулентных к *TcLr26* в челябинской популяции была выше (61%), чем в других изученных. В 2017 году они выявлены на трех из шести включенных в исследования сортах (Duranego, Дамсинская юбилейная, Харьковская). Изоляты с этих сортов были авирулентными также к линии *TcLr23*.

Таблица 6 – Частоты вирулентности *Puccinia triticina* в Уральском и Западно-Сибирском регионах (%)

Линии с генами <i>Lr</i>	Челябинская обл.		Урал	Алтай	Омск	<i>Западная Сибирь</i>
	2018	2019		2017	2018	
2a, 2b, 2c, 9, 15, 16, 19, 24, 28, 29, 41, 44, 45, 47, 51, 52, 53	0	0	<b>0</b>	0	0	<b>0</b>
20	48	0	<b>36</b>	100	20	<b>33</b>
23	43	71	<b>57</b>	100	52	<b>60</b>
26	62	57	<b>61</b>	100	76	<b>80</b>
1, 3a, 3bg, 3ka, 11, 14a, 14b, 17, 18, 30, 32, 33, 34, 44, 48, 49, 64	100	100	<b>100</b>	100	100	<b>100</b>
Изучено изолятов	21	7	<b>28</b>	5	25	<b>30</b>

В челябинской популяции *P. triticina* идентифицировано три фенотипа (МСТКГ, МСТКН, МВТКГ) (табл. 7). Два из них (МСТКГ, МСТКН) были общими с уральской, северокавказской и средневожской популяциями, при этом их частоты существенно различались между популяциями (табл. 3,5).

Таблица 7 – Частоты фенотипов *Puccinia triticina* в Уральском и Западно-Сибирском регионах (%)

Фенотипы	Авирулентность к линиям Thatcher с генами <i>Lr</i>	Челябинская обл.		Урал	Алтай 2017	Омск 2018	Западная Сибирь
		2018	2019				
МВТКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 20, 24, 26	38	43	39	0	24	20
МСТКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 20, 24	14	57	25	0	56	47
МСТКН	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24	48	0	36	100	20	33

Число аллелей вирулентности в уральской популяции *P. triticina* было сходно со средневожской (11). Значения индексов внутривидового разнообразия для челябинской популяции ( $H_s=0,05$ ;  $H_d=0,33$ ;  $KW_m=0,07$ ) были несколько выше, чем для других изученных.

### 3.4 Вирулентность и фенотипический состав *Puccinia triticina* в Западно-Сибирском регионе

Вирулентность западносибирских изолятов была близка с уральскими (табл. 6). Варьирование по вирулентности отмечено в омской субпопуляции на линиях *TcLr20*, *TcLr23* и *TcLr26*. В алтайской популяции на этих линиях вирулентность составляла 100%.

Омские изоляты патогена были представлены тремя фенотипами (МВТКГ, МСТКГ, МСТКН), алтайские – одним (МСТКН). Фенотипический состав западносибирской популяции сходен с уральской (табл. 7).

Число аллелей вирулентности в западносибирской популяции было на уровне средневожской и уральской (11). Значения генетических индексов указывали на умеренное разнообразие западносибирской популяции *P. triticina* ( $H_s=0,04$ ;  $H_d=0,31$ ;  $KW_m=0,05$ ).

### 3.5 Динамика фенотипического состава *Puccinia triticina* в Южном Казахстане

Авирулентность южно-казахстанских изолятов наблюдали на линиях с генами *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr19*, *Lr24*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr41*, *Lr45*, *Lr47*, *Lr51*, *Lr52* и *Lr53*. Варьирование частот вирулентности отмечено на линиях *TcLr20* и *TcLr44*. Частота вирулентности к линиям *TcLr20* и *Lr44* составляла 40%. В казахстанской популяции определены два фенотипа – МСРКГ и МСРКН (частота 60% и 40%). Среднее число аллелей вирулентности для казахстанской популяции составляло 10,4; индекс Нея ( $H_s$ ) – 0,02; Шеннона ( $H_d$ ) – 0,22; Космана ( $KW_m$ ) – 0,04. По фенотипическому составу *P. triticina* и вирулентности казахстанская популяция была сходна с российской северокавказской.

### 3.6 Структура популяций *Puccinia triticina* на твердой пшенице по признаку вирулентности в 2017-2019 годах (обобщение)

Всего изучено 494 монопустульных изолята. Региональные популяции существенно различались между собой по вирулентности к линиям *TcLr17* и *TcLr44* (рис. 1). Частоты вирулентности к линии *TcLr17* в северокавказской популяции были существенно ниже, чем в вожских, уральских и западносибирских, а к линии *TcLr44* – выше. Частоты вирулентности к *TcLr20*, *TcLr23* и *TcLr26* спонтанно варьировали во всех популяциях. На линиях *TcLr23* и *TcLr26* во всех популяциях они были выше, чем на линии *TcLr20*.

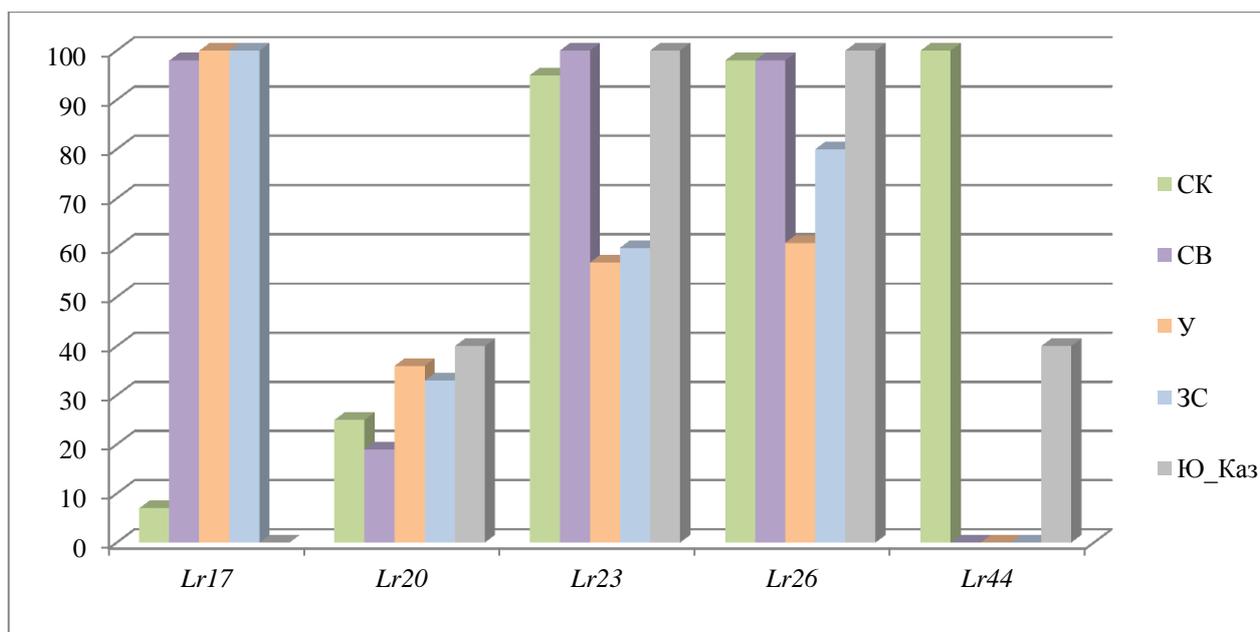


Рисунок 1 – Частоты вирулентности к линиям Thatcher с генами *Lr* в региональных популяциях *P. triticina* на твердой пшенице (%)

Популяции *P. triticina*: СК – северокавказская, СВ – средневожская, У – уральская, ЗС – западносибирская, Ю\_Каз – южно-казахстанская.

В географически отдаленных регионах РФ на твердой пшенице выявлено 7 фенотипов *P. triticina* (табл. 8). Фенотип МСТКГ отмечен во всех российских популяциях. Частота его была ниже на Северном Кавказе и выше на Урале и в Западной Сибири (25 и 47%). Фенотипы МВТКГ и МСТКН были приурочены к азиатским регионам (Уральскому и Западно-Сибирскому). Фенотип МСРКГ доминировал на Северном Кавказе и в Южном Казахстане, и единично отмечен в Поволжье. Фенотип МСРКН доминирующий в Поволжье (78%), был умеренно представлен в Северо-Кавказском регионе России (23%) и в Южном Казахстане (40%).

Таблица 8 – Частоты фенотипов вирулентности в популяциях *Puccinia triticina* на твердой пшенице (%)

Фенотипы	Авирулентность к линиям Thatcher с генами <i>Lr</i>	Частоты фенотипов по регионам				
		СК	СВ	У	ЗС	Ю_Каз
МВТКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 20, 24, 26	0	0	39	20	0
МСТКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19,20, 24	4	12	25	47	0
МСТКН	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24	1	0	36	33	0
МВТКН	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 19, 24, 26	0	7	0	0	0
МСРКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15 16, 17, 19,20, 24	71	3	0	0	60
МСРКН	2a, 2b, 2c, 9, 15, 16,17, 19, 24	23	78	0	0	40
МВРКГ	2a, 2b, 2c, 9, 15, 16, 17, 19, 20, 24, 26	0,7	0	0	0	0

Согласно всем индексам генетических дистанций, изученные изоляты объединились в 2 группы. Первая группа включала северокавказские (дагестанские, краснодарские, ростовские) и южно-казахстанские изоляты; вторая – уральские и западносибирские. Волжские изоляты умеренно отличались от обеих этих групп (рис. 2).

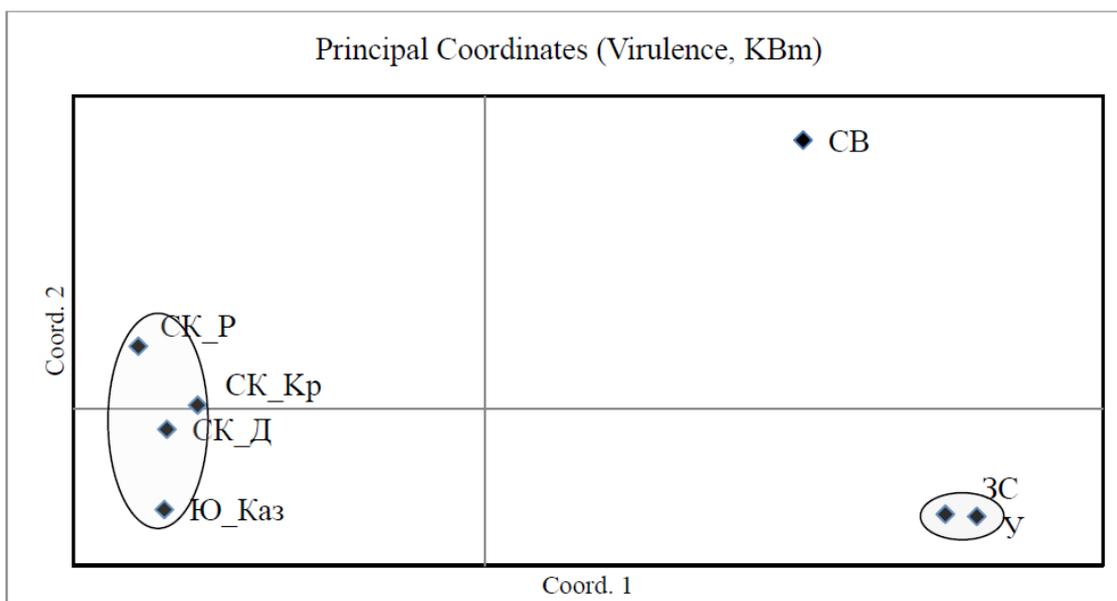


Рисунок 2 – Многомерная диаграмма генетического сходства между популяциями *P. triticiina* на твердой пшенице по признаку вирулентности (по индексу KBm)

СК\_Д – Дагестан, СК\_Кр – Краснодарский край, СК\_Р – Ростовская обл., СВ – Средневолжский регион, ЗС – Западно-Сибирский регион, У – Уральский регион, Ю\_Каз – Южный Казахстан.

### 3.7 Сравнительный анализ вирулентности и фенотипического состава *Puccinia triticiina* на мягкой и твердой пшенице

Популяции *P. triticiina* с мягкой пшеницы были собраны в 2017-2018 гг. в тех же местах, где собирали инфекционный материал с твердой. Всего изучено 89 изолятов из Северо-Кавказского, 36 – Средневолжского, 26 – Уральского, 43 – Западно-Сибирского регионов и 14 изолятов из Южного Казахстана. Изоляты с мягкой пшеницы имели значительно большее число аллелей вирулентности (12,5-16) по сравнению с изолятами с твердой пшеницы (10-11). Общие фенотипы на твердой и мягкой пшенице не выявлены, что указывает на различия в составе популяций патогена на *T. durum* и *T. aestivum*.

## Глава 4. ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ *PUCCINIA TRITICINA* НА ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЕ ПО МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ ЛОКУСАМ

В процессе изучения вирулентности российских популяций *P. triticiina* на твердой пшенице в 2017-2019 гг. была создана коллекция изолятов для проведения микросателлитного анализа. Она включала 113 монопустульных изолятов патогена из всех изученных регионов (табл. 1, 9).

При проведении микросателлитного анализа использовали 11 маркеров, и оценили полиморфизм по 16 аллелям. Число аллелей в изученных локусах варьировало от 1 до 2. Аллельное разнообразие ( $N_a$ ,  $N_e$ ) по SSR локусам было низким во всех выборках изолятов ( $N_a=1,17-1,33$ ;  $N_e=1,07-1,23$ ). Уровень наблюдаемой гетерозиготности ( $H_o$ ) был выше уровня ожидаемой ( $H_e$ ), что подтверждается отрицательными значениями индекса фиксации ( $F_{is}$ ) (табл. 9).

Всего идентифицировано 12 SSR генотипов, среди них четыре (I, II, IV, VI) были наиболее распространенными. Генотип II определен во всех коллекциях *P. triticiina*, за исключением омской и казахстанской. Генотип I доминировал в северокавказских популяциях (64-73%) и был умеренно представлен в самарской (10%). Генотип IX был общим для западносибирской и уральской популяций; генотип III – для дагестанской и

казахстанской; генотип VII – для краснодарской и челябинской. Генотип VIII отмечен в уральской коллекции, где он доминировал в сравнении с другими генотипами (49%), а генотипы X, XI, XII – дагестанской, самарской и омской коллекциях соответственно.

Таблица 9– Показатели разнообразия популяций *P. triticina* по SSR маркерам

Показатель	Образцы популяции <i>P. triticina</i>									
	СК Д	СК Кр	СК Р	СВ С	СВ Ч	У Ч	ЗС О	ЗС А	Ю Каз	
Число изолятов	26	15	11	19	4	14	12	4	8	
Число генотипов	5	3	3	5	5	6	4	2	4	
Генотипы и их частоты	I-73%	I-67%	I-64%	I-10%	II-25%	II-7%	IV-32%	II-25%	III-12%	
	II-15%	II-27%	II-27%	II-32%	IV-75%	IV-7%	IX-25%	IX-75%	IV-25%	
	III-4%	VII-7%	VI-9%	IV-47%		IX-29%	VI-25%		V-50%	
	IV-4%			VI-5%		VI-7%	XII-8%		VI-12%	
	X-4%			XI-5%		VII-7%				
					VIII-43%					
Число уникальных генотипов	1	0	0	1	0	1	1	0	1	
Ср. число аллелей на локус ( $N_a$ )	1,25	1,17	1,17	1,25	1,17	1,25	1,33	1,17	1,33	
Число эффективных аллелей ( $N_e$ )	1,09	1,08	1,07	1,12	1,15	1,17	1,19	1,12	1,23	
Индекс Шеннона ( $I$ )	0,08	0,07	0,07	0,11	0,11	0,15	0,16	0,1	0,19	
Наблюдаемая гетерозиготность $H_o$	0,08	0,06	0,06	0,1	0,12	0,11	0,11	0,06	0,19	
Ожидаемая гетерозиготность, $H_E$	0,05	0,05	0,04	0,07	0,08	0,1	0,11	0,07	0,13	
Индекс фиксации ( $F_{is}$ )	-0,04	0,25	-0,26	-0,26	-0,6	-0,03	-0,02	0,2	-0,22	

Образцы популяций: СК – северокавказская (СК\_Д - дагестанская, СК\_Кр – краснодарская, СК\_Р - ростовская); СВ –средневожская (СВ\_С – самарская, СВ\_Ч -чувашская); У- уральская (У\_Ч челябинская); ЗС- западносибирская ЗС\_О – омская, ЗС\_А – алтайская); Ю\_Каз – южно-казахстанская.

На UPGMA-дендрограмме, построенной по индексу  $K_{Bm}$ , изоляты *P. triticina* объединились в две группы (рис. 3). В одну из них вошли все западносибирские и уральские изоляты. В другой группе изоляты распределились в две подгруппы. В первую вошли все северокавказские изоляты, а во вторую – все волжские. Южно-казахстанские изоляты умеренно отличались от обеих этих подгрупп.

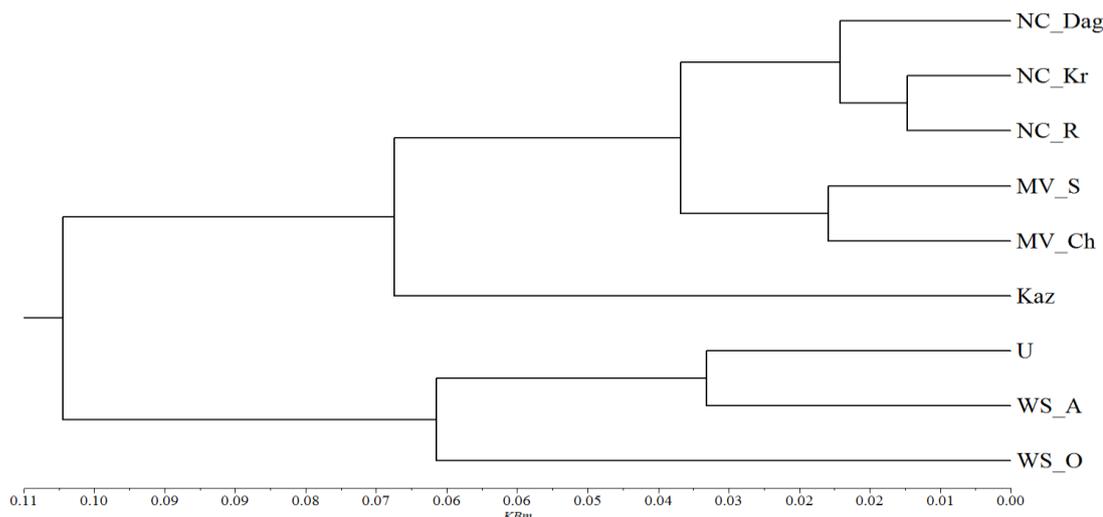


Рисунок 3 – UPGMA-дендрограмма генетического сходства изолятов *Puccinia triticina* по микросателлитным маркерам (индекс Космана,  $K_{Bm}$ )

NC\_D – Дагестан, NC\_Kr – Краснодарский край, NC\_R – Ростовская обл., MV – Средневожский регион, WS – Западно-Сибирский регион, U – Уральский регион

Согласно тесту Мантеля, структура изученных популяций *P. triticina* по микросателлитным маркерам и вирулентности коррелировала умеренно ( $r=0.61$ ). Очевидно, это связано с более близким родством средневожских и северокавказских изолятов по микросателлитным маркерам, чем по признаку вирулентности (рис. 2-3). При этом высокая корреляция выявлена между результатами изучения азиатских и северокавказских популяций, полученными с помощью анализа вирулентности патогена и молекулярных маркеров.

С использованием SSR маркеров впервые показано разделение российских популяций *P. triticina* на твердой пшенице по географическому происхождению на европейские (включающие северокавказские и волжские) и азиатские (включающие западносибирские и южно-уральские популяции). Высокое число общих генотипов в европейских и азиатских популяциях указывает на интенсивный генный поток на данных территориях. Различия между азиатскими и европейскими популяциями по микросателлитным маркерам предполагают разное происхождение инфекции в этих регионах.

## **Глава 5. ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОБРАЗЦОВ ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ**

Анализ вирулентности выявил существенные различия в составе популяций *P. triticina* на твердой и мягкой пшеницах. В связи с этим, представляло интерес оценить устойчивость сортов твердой пшеницы к популяциям патогена, собранных с *T. aestivum* и *T. durum*. В иммунологических исследованиях использовали 21 образец *T. durum*, полученный из Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ).

### **5.1 Исследования устойчивости образцов твердой пшеницы в фазе проростков**

Для инокуляции образцов твердой пшеницы использовали 19 изолятов *P. triticina*, 9 из которых были выделены с твердой пшеницы и 10 – с мягкой. Изоляты различались между собой по вирулентности и географическому происхождению (дагестанские, краснодарские, ростовские, самарские, омские, ленинградские, казахстанские). Все тест-изоляты были авирулентными к линиям Thatcher с генами *Lr24* и *Lr29* и вирулентными к линиям с генами *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr18* и *Lr30*. Между собой изоляты различались по вирулентности к линиям *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr9*, *TcLr15*, *TcLr16*, *TcLr17*, *TcLr19*, *TcLr20*, *TcLr23*, *TcLr26* и *TcLr44*. Изоляты с мягкой пшеницы характеризовались большим числом аллелей вирулентности по сравнению с изолятами с твердой пшеницы.

Устойчивость образцов твердой пшеницы существенно варьировала при заражении изолятами с *T. durum* и *T. aestivum* (рис. 4). Большинство из них (67%) были восприимчивы к изолятам с *T. durum*. Только два сорта (Kargala 228 и Kargala 238) показали устойчивый тип реакции ко всем изолятам с твердой пшеницы (балл 1, 2). Линии Gordieforme 264, Gordieforme 2383, Leukurum 1429-10, Gordieforme 1591-21 были устойчивы к самарским изолятам и восприимчивы ко всем другим с твердой пшеницы. Линия Leukurum 1506-36 была устойчива при инокуляции самарскими, омскими и казахстанскими изолятами и восприимчива к северокавказским (группа R, S на рис. 4).

Значимо меньшее число восприимчивых линий (29%) выявлено при инокуляции образцов изолятами патогена с мягкой пшеницы (рис. 4). В эту группу вошли линии Gordieforme 2383, Line 19003, Line 19029, Line 9-25-016, Gordieforme 69-08-2 и Gordieforme 05-12-7. Число образцов, устойчивых к изолятам с мягкой пшеницы, было выше (19%). К ним относятся Kargala 228, Gordieforme 178-05-2, Gordieforme 04-76-5, Gordieforme 1591-21.

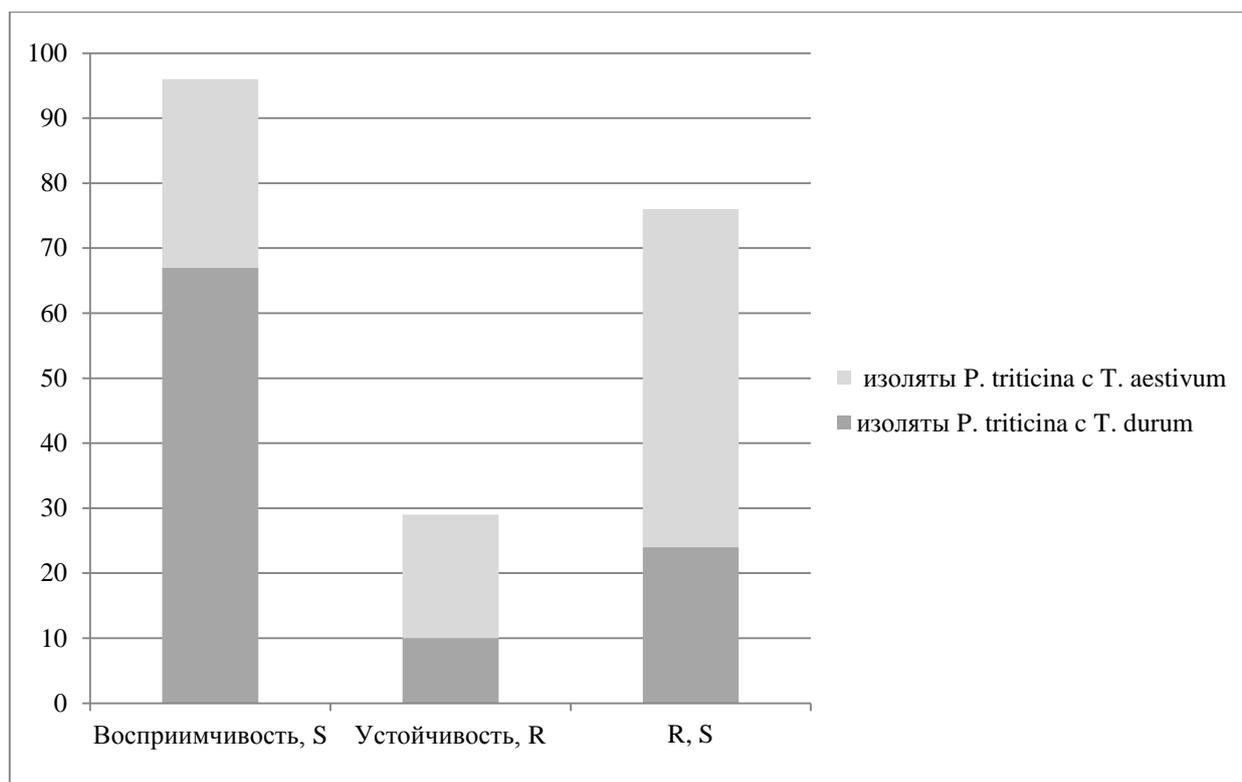


Рисунок 4 – Реакция образцов твердой пшеницы к изолятам *Puccinia triticina* с твердой и мягкой пшеницы

Для других образцов отмечено варьирование по устойчивости (R, S). Образцы Kargala 238, Gordieforme 264, Gordieforme 829, Gordieforme 864, Gordieforme 881, Gordieforme 05-42-12, Leukurum 1429-10, Leukurum 1506-36 и Annushka были устойчивы к более вирулентным волжским, западносибирским, северо-западным и казахстанским изолятам *P. triticina* и восприимчивы к менее вирулентным северокавказским (дагестанским и краснодарским). Сорт Каргала был устойчив ко всем западносибирским изолятам, а Luch 25 – к волжским и северо-западным. В целом группа образцов с варьирующим типом реакции (R,S) при инокуляции тест-изолятами с мягкой пшеницы составила 52% (рис. 4).

Проведенный анализ устойчивости образцов яровой твердой пшеницы показал, что изоляты с *T. durum* характеризуются более высокой вирулентностью к сортам и линиям твердой пшеницы, чем изоляты с *T. aestivum*. Это указывает на то, что в иммунологических исследованиях сортов твердой пшеницы следует использовать популяции возбудителя бурой ржавчины с *T. durum*.

### 5.2 Идентификация генов устойчивости у образцов твердой пшеницы

Результаты фитопатологического теста указывают на отсутствие у 21 изученного образца твердой пшеницы КАСИБ генов *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24* и *Lr26*. С использованием молекулярных маркеров у данных образцов не выявлено ни одного из 10 идентифицируемых генов (*Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34* и *Lr37*). Для генов *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24* результаты молекулярного анализа согласуются с фитопатологическим тестированием.

## Глава 6. ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ *PUSCINIA TRITICINA* НА ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЕ В РОССИИ

Впервые в России с привлечением анализа вирулентности и микросателлитных маркеров изучена структура популяций биотрофного патогена *P. triticina* на твердой пшенице. Охарактеризован внутривидовой полиморфизм патогена в географически отдаленных регионах РФ и уточнены ареалы обитания популяций.

Российские изоляты *P. triticina* на твердой пшенице отличались по вирулентности от изолятов из других стран. Изоляты *P. triticina* на твердой пшенице в Западной Европе, Северной и Южной Америке характеризовались меньшей вирулентностью. В отличие от российских изолятов, все они были авирулентны к линиям с генами *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr3bg*, *Lr11*, *Lr17* и *Lr26* (Ordóñez, Kolmer, 2007; Goyeau et al., 2012). Согласно фенотипической аббревиатуре, большинство из них относилось к группе ВВВ- (авирулентность к *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*). Наряду с маловирулентными фенотипами группы ВВВ-, в Италии выявлены фенотипы DCB-, FGB-, FBB, вирулентные к *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr16* и *Lr20* (Mantovani et al., 2010), а в Израиле – MG-, MH- вирулентные к *Lr1*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr16* и *Lr30* (Kosman et al., 2014).

Современная дербентская популяция *P. triticina* на твердой пшенице отличается от популяций гриба, изученных в 1970-1980 годах. В середине 1970 годов все изоляты с *T. durum* характеризовались авирулентностью к линиям с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a* и *Lr17* (Дмитриев и др., 1976). В 1980 годах авирулентность к *TcLr1* и *TcLr2a* сохранялась, но при этом возросли частоты вирулентности к линиям *TcLr3a*, *TcLr3ka*, *TcLr10*, *TcLr14*, *TcLr16*, *TcLr17* и *TcLr18* (Михайлова, Метревели, 1976; Михайлова, 2006). В наших экспериментах, все изученные дербентские изоляты характеризовались авирулентностью к *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr16* и *Lr17* и вирулентностью к *Lr1*. Для мягкой пшеницы повышение вирулентности к *Lr1* в российских популяциях отмечается с начала 2010 годов (Гультяева, 2018), не исключено, что эта тенденция распространяется и для популяций патогена на твердой пшенице.

В данных исследованиях южно-казахстанские изоляты *P. triticina* отличались по вирулентности от североказахстанских из Акмолинской области, которые были изучены нами в 2014 году (Гультяева, Ахметова, Шайдаюк, Аристова, 2016). Все североказахстанские изоляты были авирулентны к линиям *TcLr1*, *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr15*, *TcLr16*, *TcLr18* и *TcLr26*, и вирулентны к *TcLr17*. Южно-казахстанские изоляты были вирулентны к *TcLr1*, *TcLr18* и *TcLr26*, и авирулентны к *TcLr17*. Возможным объяснением этому может быть использование разных методических подходов при проведении анализа вирулентности. В данной работе заражали интактные растения, выращенные в почве, а при изучении североказахстанских популяций – отрезки листьев, метаболизм которых поддерживался в растворе бензимидазола. При этом выявлена высокая степень сходства между двумя коллекциями казахстанских изолятов с помощью микросателлитных маркеров.

Для определения ареалов популяций *P. triticina* на твердой пшенице необходимо было исследовать изоляты гриба с обширной территории. В нашей работе изучены образцы популяций из трех точек Северо-Кавказского региона (Дагестан, Краснодарский край, Ростовская область), где для выращивания рекомендована озимая твердая пшеница. Образцы популяций из других зон (Среднее Поволжье, Южный Урал, Западная Сибирь) были представлены сборами с яровой твердой пшеницы. Таким образом, обеспечивалась широкая представленность инфекционного материала *P. triticina* (урединиообразцов), полученных из основных ареалов возделывания озимой и яровой твердой пшеницы.

Популяции возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице характеризовались слабым внутривидовым разнообразием по признаку вирулентности и микросателлитным локусам, в сравнении с популяциями на мягкой пшенице. Значения индексов, характеризующих генетические расстояния между популяциями, также были существенно ниже, чем для популяций патогена, обитающих на мягкой пшенице. Это согласуется с результатами большинства популяционно-генетических исследований, проведенных в других странах (Ordoñez, Kolmer, 2007 а,б; Mantovani et al., 2010; Goyeau et al., 2012; Kosman et al., 2014).

В нашей работе существенное влияние растения-хозяина – сортов твердой пшеницы на изменчивость популяций *P. triticina* не выявлено. Вероятно, это обусловлено низким разнообразием сортов твердой пшеницы по *Lr*-генам, в сравнении с мягкой пшеницей (Одинцова и др., 1982, 1989).

Впервые с использованием признака вирулентности и микросателлитных маркеров подтверждена дифференциация популяций *P. triticina* в России на азиатские и европейские. В изученных популяциях выявлены как общие SSR генотипы, так и характерные только для определенных территорий. Наличие общих SSR генотипов в северокавказских, волжских, уральских и западносибирских образцах популяций указывает на возможный генный поток между ними.

Поражение сортов твердой пшеницы изолятами *P. triticina* с *T. aestivum* указывает на возможность перезаражения данных видов. Более позднее поражение твердой пшеницы, по сравнению с мягкой, указывает на то, что, скорее всего, изоляты с *T. aestivum* могут являться источником инфекции для *T. durum*.

Условия Северокавказского региона благоприятны для сохранения и поддержания высокого разнообразия патогена в естественных ценозах. В Северо-Кавказском регионе резерваторами для возбудителей всех видов ржавчины могут служить дикорастущие злаки. В.М. Берлянд-Кожевников с соавторами (1978) и Л.А. Михайлова (1996) при анализе клонов *P. triticina* с пырея в Дагестане определили их высокое разнообразие по вирулентности. Были найдены генотипы, авирулентные ко всем *TcLr*-линиям; маловирулентные, сходные по вирулентности с выявленными на твердой пшенице, и генотипы, широко представленные на мягкой пшенице. Таким образом, дикорастущие злаки могут представлять первичный источник инфекции для твердой пшеницы в областях Северо-Кавказского региона. При этом не исключается и перезаражение *T. durum* маловирулентными изолятами с *T. aestivum*. Подтверждением этому является заражение ряда образцов твердой пшеницы менее вирулентными северокавказскими изолятами с *T. aestivum* и устойчивость их к более вирулентным западносибирским.

Занос возбудителя бурой ржавчины в Западную Сибирь и Среднее Поволжье может происходить воздушными потоками из южных регионов (Рейтер, 1984; Михайлова, 2006; Сюков, 1917). На твердой пшенице бурая ржавчина в Западной Сибири и на Урале проявляется позднее, чем на мягкой, и, как правило, ее развитие значительно меньше. В Западной Сибири, на Урале и в Поволжье на мягкой пшенице доминируют высоковирулентные и нетипичные для твердой пшеницы фенотипы (Kolmer et al., 2015; Гультяева, 2018). Наряду с ними отмечаются фенотипы, сходные по вирулентности с изолятами на *T. durum*, но частоты их очень низки (Гультяева, 2018). Потенциально они могут служить источником для заражения твердой пшеницы.

В проведенных исследованиях оба типа маркеров (вирулентность и SSR) были результативными для оценки структуры популяций *P. triticina*. По микросателлитным маркерам сходство волжских популяций *P. triticina* с северокавказскими было выше, чем в анализе вирулентности. Полученные сведения о структуре популяций на твердой пшенице согласуются с результатами исследований популяций *P. triticina* на мягкой пшенице (Михайлова, 1996; Гультяева, 2018).

Иммунологический анализ яровых образцов твердой пшеницы выявил их различие по устойчивости к инфекционному материалу с твердой и мягкой пшеницы. Изоляты с *T. durum* характеризовались более высокой вирулентностью к сортам твердой пшеницы, чем изоляты с мягкой пшеницы, что следует учитывать в иммунологических исследованиях.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате мониторинга вирулентности популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы на твердой пшенице в Северо-Кавказском, Средневолжском, Уральском и Западно-Сибирском регионах РФ в 2017-2019 гг. охарактеризованы частоты вирулентности, фенотипический состав и структура распределения фенотипов гриба. Всего изучено 494 монопустульных изолята *P. triticina*. Региональные популяции существенно различаются между собой по вирулентности к линиям *TcLr17* и *TcLr44*. В северокавказских популяциях частоты вирулентности к *TcLr17* существенно ниже, чем в волжских, уральских и западносибирских, а к линии *TcLr44* – выше.

В изученной коллекции *P. triticina* определено семь фенотипов вирулентности. Фенотип МСТКГ отмечен во всех российских популяциях, фенотипы MBTKG и МСТКН – только в азиатской (уральская, западносибирская), фенотипы MCRKG и MCRKH – в европейской (северокавказская, волжская) и южно-казахстанской. Фенотип MBRKG уникален для дагестанской популяции, а фенотип MBTKH – для волжской.

По признаку вирулентности изученные популяции *P. triticina* объединены нами в две группы. В одну из них входят все северокавказские (дагестанские, краснодарские, ростовские) и южно-казахстанские популяции. Другую группу составляют уральские и западносибирские популяции. Волжская популяция умеренно отличаются от обеих этих групп.

Охарактеризован полиморфизм микросателлитных локусов у изолятов *P. triticina* на твердой пшенице из географически отдаленных регионов. Идентифицировано 12 SSR генотипов, среди которых выявлены общие для всех регионов, характерные только для определенных регионов и уникальные, отмеченные лишь в одной из популяций. В микросателлитном анализе изученные коллекции изолятов *P. triticina* распределены в две кластерные группы. В одну из них вошли западносибирские и уральские изоляты, в другую – северокавказские, волжские и южно-казахстанские. Наличие высокого числа общих генотипов внутри европейской и внутри азиатской популяций указывает на интенсивный генный поток на данных территориях.

Охарактеризована устойчивость 21 перспективного образца яровой твердой пшеницы при инокуляции изолятами с твердой и мягкой пшеницы. Изоляты с *T. durum* характеризовались широким спектром вирулентности к сортам твердой пшеницы, в сравнении с изолятами с мягкой пшеницы. При инокуляции изолятами с твердой пшеницы 2 образца (10%) показали устойчивый тип реакции, 14 образцов (67%) характеризовались восприимчивостью; у пяти образцов (24%) тип реакции варьировал в зависимости от изолята гриба. При инокуляции изолятами с мягкой пшеницы 4 образца (19%) были устойчивы, 6

(29%) восприимчивы, у 11 (52%) образцов тип реакции варьировал. С использованием молекулярных маркеров показано, что изученные образцы твердой пшеницы не содержат идентифицируемые гены устойчивости *Lr1*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr24*, *Lr26*, *Lr34* и *Lr37*. Результаты фитопатологического теста указывают на отсутствие у этих образцов генов *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr15*, *Lr16* и *Lr17*.

Популяции возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице существенно отличаются от популяций гриба на мягкой пшенице. Они характеризуются более низким внутривидовым разнообразием по признаку вирулентности и микросателлитным локусам. Число аллелей вирулентности у изолятов *P. triticina* на *T. durum* было существенно меньше (10-11), чем у изолятов гриба на *T. aestivum* (12,5-16). Выявлены различия в фенотипическом составе патогена на твердой и мягкой пшенице.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК и международных баз данных

**Шайдаюк Е.Л.** Сравнительный анализ популяций *Puccinia triticina* на твердой и мягкой пшенице / **Е.Л. Шайдаюк**, Е.И. Гульятеева, П.Н. Мальчиков, М. А. Розова, Н.И. Коробейников // Микология и фитопатология. – 2019. – Т. 53(3). – С. 170-176. DOI: 10.1134/S0026364819030115

**Шайдаюк Е.Л.** Популяционные исследования возбудителя бурой ржавчины на твердой пшенице в Омской области / **Е.Л. Шайдаюк**, В.С. Юсов, Е.И. Гульятеева // Известия Санкт-Петербургского государственного Аграрного Университета. – 2019. – Т. 1(54). – С. 64-69. DOI: 10.24411/2078-1318-2019-11064

**Шайдаюк Е.Л.** Характеристика вирулентности возбудителя бурой ржавчины на сортах озимой твердой пшеницы в условиях Ростовской области / **Е.Л. Шайдаюк**, Е.И. Гульятеева, Н.В. Шишкин, Т.Г. Дерова, Д.Р. Яковлева, Н.П. Иличкина // Зерновое хозяйство России. – 2019. – Т. 1(61). – С. 56-61. DOI: 10.31367/2079-8725-2019-61-1-56-61

Гульятеева Е.И. Молекулярно-генетический полиморфизм *Puccinia triticina* в Южном Дагестане – центре совместной эволюции возбудителя бурой ржавчины и пшеницы / Е.И. Гульятеева, И.А. Казарцев, **Е.Л. Шайдаюк** // Генетика. – 2019. – Т. 55(4). – С. 390-397. DOI: 10.1134/S0016675819040040 (WoS, Q4)

Gulyaeva, E. Evaluation of resistance of spring durum wheat germplasm from Russia and Kazakhstan to fungal foliar pathogens / E. Gulyaeva, V. Yusov, M. Rosova, P. Mal'chikov, **E. Shaydayuk**, N. Kovalenko, R. Wanyera, A. Morgounov, G. Yskakova, A. Rsaliyev // Cereal Research Communications. – 2020. – V. 48. DOI: 10.1007/s42976-019-00009-9 (WoS, Q4)

Gulyaeva E.I. Microsatellite analysis of *Puccinia triticina* from *Triticum* and *Aegilops* hosts // E.I. Gulyaeva, **E.L. Shaydayuk**, A.I. Kazartsev, A. Akhmetova, E. Kosman // Australasian Plant Pathology. – 2018. – V. 47(2). – P. 163-170. DOI: 10.1007/s13313-018-0542-3 (WoS, Q3)

### Материалы конференций

**Шайдаюк Е.Л.** Фитосанитарное состояние зерновых культур на Северо-Западе России / **Е.Л. Шайдаюк**, Е.И. Гульятеева, Н.П. Шипилова // Материалы VIII конгресса по защите растений. Интегрированная защита растений для устойчивого растениеводства и лесного хозяйства. – Златибор, Сербия, 2019. – С. 175-176.

**Шайдаюк Е.Л.** Грибные болезни зерновых культур в Северо-Западном регионе России в 2016-2018 гг. / Е.Л. Шайдаюк, Е.И. Гульятеева // IV Всероссийский съезд по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». Сборник тезисов докладов. – Санкт-Петербург: ФГБНУ ВИЗР, 2019. – С. 58.

**Шайдаюк Е.Л.** Молекулярно-генетическая структура популяций *Puccinia triticina* на твердой пшенице в России / **Е.Л. Шайдаюк** // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Микология и альгология в России. XX-XXI век: смена парадигм». – Москва: МГУ, 2018. – С. 237.

**Шайдаюк Е.Л.** Характеристика популяций *Puccinia triticina* на твердой пшенице / **Е.Л. Шайдаюк**, Д.Р. Яковлева // Материалы IV (XII) Международной ботанической конференции молодых учёных в Санкт-Петербурге. – 2018. – С. 222-223.

**Шайдаюк Е.Л.** Грибные болезни пшеницы на Северо-Западе России / **Е.Л. Шайдаюк**, Е.И. Гульятеева, Н.П. Шипилова // Современная микология в России. Т. 6. Материалы 4-го съезда микологов России. – Москва: Национальная академия микологии, 2017. – С. 107-109.

**Шайдаюк Е.Л.** Характеристика дербентской популяции *Puccinia triticina* по вирулентности / **Е.Л. Шайдаюк**, Е.И. Гульятеева, К.М. Абдуллаев // Материалы докладов, сообщений Всероссийской научно-практической конференции «Развитие научного наследия Н.И. Вавилова по генетическим ресурсам его последователями». – Дербент: ДООС ВИР, ДГАУ им. М.М. Джамбулатова, 2017. – С. 323-327.



