

УДК 632.4:582.284.21

СТРУКТУРА РОССИЙСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ГРИБА *Puccinia triticina* ERIKS**Е.И. Гультяева, Е.Л. Шайдаюк, И.А. Казарцев, М.К. Аристова***Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург*

Проведен анализ структуры популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы, собранных на территории РФ в 2011–2014 гг., по признакам вирулентности. Показана высокая эффективность гена *Lr24*. В западносибирских и уральских популяциях обнаружено нарастание численности изолятов, вирулентных к линиям пшеницы с геном *Lr9*. В 2013 г. впервые отмечено их появление в популяции ЦЧР, что может привести к поражению сортов, защищенных геном *Lr9*. Вирулентность к сортам пшеницы с геном *Lr19* была высокой в Поволжье, но реже встречалась в других регионах. Сохраняется тенденция нарастания частоты вирулентности к линиям *Lr1* в европейских популяциях. С использованием международного набора из 20 линий-дифференциаторов среди изученных 1232 монопустульных изолятов идентифицировано 113 фенотипов. Наиболее представлены расы TGTKT и THTKT. Отмечено высокое сходство по представленности фенотипов в западносибирских и уральских популяциях. Степень отличий от них северо-западных и центральных популяций была выше, чем у центрально-черноземных и волжских. Популяции из Ростовской области, Краснодарского и Ставропольского краев имели большее сходство с европейскими и азиатскими, чем с дагестанскими. Существенные отличия от всех изученных имела северо-западная популяция из Калининградской области. Для изучения полиморфизма российских популяций по SSR-маркерам отобрано 185 монопустульных изолятов и проведена экстракция их ДНК. Оценена эффективность предложенных 23 SSR-маркеров для анализа российских популяций и отобрано 20 наиболее полиморфных. Отработаны методические подходы для проведения SSR-анализа с использованием генетического анализатора ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония).

Ключевые слова: бурая ржавчина, мягкая пшеница, вирулентность, *Lr*-гены, SSR-маркеры.

В результате эволюции популяций происходит изменение их генетического состава. Оценка полиморфизма популяций является одним из «инструментов» для изучения микроэволюционного процесса, позволяет охарактеризовать внутривидовую и межвидовую дифференциацию и выявить дискретные изменения. Популяционные исследования бурой ржавчины на территории б. СССР проводятся в ВИЗР с 1980-х годов. В 1981–1993 гг. с помощью оригинального набора тестеров вирулентности Л.А. Михайловой [2006] показано существование европейской популяции гриба *Puccinia triticina* Eriks., занимающей территорию от северо-западной части РФ до Поволжья, и популяций Западной Азии (Урал, Казахстан, Западная Сибирь), Кавказа (Грузия, Азербайджан, Дагестан, Северная Осетия, Чечено-Ингушетия), Дальнего Востока. Поволжье являлось пограничной зоной, где наблюдалось совмещение азиатской и европейской популяций гриба [Михайлова, Васильев, 1985; Михайлова, 1995]. Сходные данные, свидетельствующие об изолированности кавказской популяции от европейской, получены также Г.К. Сорокиной с соавторами [1990].

По данным Т.В. Павловой и Л.А. Михайловой [1996], вероятность миграции спор с территории Северного Кавказа в Казахстан крайне мала, поскольку проникновению воздушных потоков препятствует циклон, действующий между Каспийским и Аральским морями, и антициклон, спускающийся с севера по Западной Сибири.

С 2001 г. исследования по вирулентности продолжены с использованием международного набора линий-дифференциаторов, представленного почти изогенными *Lr*-линиями Thatcher [Long, Kolmer, 1989]. В 2001–2010 гг. показано высокое фенотипическое сходство между западносибирскими и уральскими популяциями, а также между популяциями ЦЧР, Поволжья и Центрального регионов. Популяции Краснодарского и Ставропольского краев и северо-западные имели сходство с другими европейскими популяциями, но в отдельные годы, например в 2007 г., выделились в отдельные группы [Гультяева, Баранова,

2010; Gulyaeva et al., 2012; Lind, Gulyaeva, 2007].

С середины 1990-х годов популяционные исследования гриба *P. triticina* Eriks. дополнены молекулярными технологиями. В 2007 году структура российских популяций гриба охарактеризована с использованием RAPD и УП-ПЦП-маркеров [Gulyaeva et al., 2010, 2012]. В 2000-х годах в США для генотипирования изолятов *P. triticina* подобраны селективно-нейтральные SSR-маркеры [Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007]. Преимуществом этой группы маркеров служит высокий уровень регистрируемого полиморфизма, высокая воспроизводимость результатов и техническая простота экспериментов, в отличие, например, от AFLP-анализа. С их использованием J. Kolmer с соавторами [2015] охарактеризовали полиморфизм популяций *P. triticina* из пяти регионов РФ – Северокавказского, Западносибирского, Волго-Вятского и Средневолжского в 2006–2010 гг. В этой работе не выявлено дифференциации между российскими географическими популяциями, но показано наличие двух кластеров изолятов, распространенных по всей территории. Показана клональная репродукция гриба на территории России и предполагается единый источник инфекции для европейской части и Западной Сибири, предположительно находящийся в европейской или кавказской частях России. Российские популяции *P. triticina* характеризовались высокими различиями по SSR-маркерам с популяциями Таджикистана, Киргизстана, Узбекистана, Армении, Грузии и Азербайджана и были более сходны с южно- и североказахстанскими [Kolmer et al., 1915].

В последние годы отмечается очевидный прогресс в создании и внедрении в производство ржавчиноустойчивых сортов пшеницы в России [Гультяева, Садовая, 2014], что обуславливает изменения в структуре популяций по вирулентности и молекулярным маркерам. Цель настоящей работы – анализ структуры российских популяций гриба *P. triticina* по вирулентности в 2011–2014 гг., создание коллекции изолятов для SSR-анализа и отработка методических подходов его проведения.

Материал и методы

Инфекционный материал был представлен листьями пшеницы с урединиепустулами, собранными на производственных посевах и ГСУ в 2011–2014 гг. в 9 регионах РФ: Северо-Западном (Псковская, Новгородская, Ленинградская, Калининградская, Костромская обл.); Центральном (Брянская, Смоленская, Владимирская, Белгородская, Курская, Липецкая обл.), Волго-Вятском (Чувашия, Нижегородская обл., Пермский край); Нижневолжском (Саратовская обл.); Средневолжском (Самарская обл.); Северо-Кавказском (Краснодарский, Ставропольский края, Дагестан); Уральском (Курганская, Челябинская обл., Башкортостан) и Западно-Сибирском (Омская, Новосибирская, Тюменская обл., Алтайский край).

Для получения монопустульных изолятов и изучения структуры популяций *P. triticina* использованы методы лабораторного культивирования патогена [Михайлова и др., 2003]. Тип реакции определяли по шкале E.B. Mains, H.S. Jackson [1926]. Всего изучено 1232 монопустульных изолята.

Для тестирования вирулентности использовали набор почти моногенных линий пшеницы. Все изоляты охарактеризованы по признаку вирулентности. Для обозначения фенотипов использована буквенная номенклатура, основанная на определении вирулентности к группам из пяти *Lr*-линий: 1 – *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*; 2 – *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*; 3 – *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*; 4 – *Lr19*, *Lr20*, *Lr14a*, *Lr18*; 5 – *Lr2b*, *Lr3bg*, *Lr14b*, *Lr15*. [Long, Kolmer, 1989].

Для определения буквенного кода фенотипов, вычисления индексов внутривидового разнообразия и различий между популяциями по вирулентности использовали пакет программ Virulence Analysis Tool (VAT) [Kosman et al., 2008]. Для оценки внутривидового разнообразия использовали индекс Нея H_s , характеризующий гетерогенность популяции по частотам вирулентности; нормализованный индекс Шеннона Sh , характеризующий разнообразие популяций по фенотипическому составу, и индекс Космана KW_m , оценивающий общую изменчивость попу-

ляций по вирулентности и фенотипическому составу. Для оценки различий между популяциями – индекс Космана (KW_m), вычисление которого основано на анализе структуры по вирулентности и по фенотипическому составу [Kosman, Leonard, 2007].

Для SSR-анализа отобрано 185 монопустульных изолятов *P. triticina*, полученных в 2006–2014 гг. из 9 агроэкологических регионов РФ, Казахстана и Китая. Эта коллекция была представлена 35 изолятами из Поволжья (Волго-Вятский (Чувашия, Нижегородская обл.), Средневолжский (Самарская обл.), Нижневолжский (Саратовская обл.) регионы); 25 изолятами с Северо-Запада (Новгородская, Псковская, Ленинградская, Калининградская) и Ярославской обл.; 24 изолятами с Северного Кавказа (Краснодарский, Ставропольский края, Дагестан); 34 изолятами из Западной Сибири (Омская, Кемеровская, Томская, Тюменская, Новосибирская обл., Алтайский край); 20 изолятами с Урала (Курганская, Челябинская обл., Башкортостан); 31 изолятом из центрально-европейских регионов (Смоленская, Владимирская обл.), Центрально-Черноземный (Тамбовская, Воронежская, Липецкая, Курская обл.), а также 15 изолятами из Северного и Южного Казахстана и 1 изолятом из Китая.

Выделение ДНК из спорового материала гриба проводили согласно методике A. Justesen и соавторов [2002]. Для отработки методических подходов проведения SSR-анализа протестировано 23 микросателлитных маркера, предложенных для оценки полиморфизма изолятов гриба *P. triticina* на Североамериканском континенте [Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007]. Первоначально амплифицированные пробы проанализированы с использованием 1.5% агарозного геля и 6% полиакриламидного геля. Выявлена низкая их разрешающая способность для оценки полиморфизма используемых маркеров. В связи с этим для определения размера SSR-аллелей был использован генетический анализатор ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония), в отличие от исследований Cereal Diseases Laboratory (США), где используется анализатор LI-COR (Lincoln, NE) 4200 или 4300.

Результаты и обсуждение

Среди использованных для анализа вирулентности двадцати *TcLr*-линий восемнадцать показали вариабельность по типу инфекции при инокуляции *P. triticina* (табл.1). Все тестируемые изоляты были авирулентны на линии *TcLr24* и вирулентны к *TcLr14a*. Изоляты, вирулентные к линии *TcLr9*, встречались в уральской и западносибирской популяциях (42% и 38% соответственно). В первую очередь это обусловлено высокой концентрацией сортов с геном *Lr9* в данных регионах. С 2013 г. вирулентность к линии с геном *Lr9* отмечена и в европейских популяциях (ЦЧР), что может привести к потере эффективности гена *Lr9* и поражению сортов – его носителей Немчиновская 24, Немчиновская 17 и Сплав.

Изоляты, вирулентные к линии *TcLr19*, преимущественно встречались в популяциях, собранных с сортов, защищенных этим геном – Л-503, Волгоуральская, Экада 70. Доминирование источников инфекционного материала с геном *Lr19* при анализе популяций Нижневолжского, Волго-Вятского регионов и ЦЧР обусловило более высокие показатели частот вирулентности к *Lr19* в этих регионах. В инокулюме, собранном с других сортов (без гена *Lr19*), подобные изоляты отсутствовали, либо выявлялись в единичных количествах.

Как и в предыдущий период, частоты изолятов, вирулентных к линиям *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *TcLr11*, *TcLr12b*, *TcLr3bg*, *TcLr16*, *TcLr17*, *TcLr18*, *TcLr30*, были высокими во всех популяциях и достигали 80–100%. Исключе-

ние составляли северо-западные популяции из Калининградской области, в которых вирулентность к генам *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka* составляла 14–19% (табл.1).

На линиях *TcLr1*, *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr15*, *TcLr20* и *TcLr26* наблюдался высокий (от 38 до 100%) полиморфизм по вирулентности. Сохраняется тенденция возрастания частот изолятов, вирулентных к *TcLr1*, наблюдаемая с начала 2000-х годов. Если в период 1980–1995 гг. российские европейские, кавказские и азиатские популяции дифференцировались по вирулентности к линии с данным геном [Михайлова, 2006], то в настоящее время частота вирулентности к *TcLr1* высока практически во всех регионах. Исключение составляли северо-кавказские популяции из Дагестана, где средняя частота вирулентности к гену *Lr1* не превышала 54%. Вирулентность к генам *TcLr2a*, *TcLr2b* была ниже в популяциях Северо-Западного, Центрального регионов и в северокавказской популяции из Дагестана. Вирулентность к генам *TcLr15*, *TcLr20*, *TcLr26* колебалась по регионам и годам исследований.

В результате анализа вирулентности 1232 монопустульных изолятов выявлено 113 фенотипов. Среди них 67 фенотипов были оригинальными и встречались в одном регионе, 22 фенотипа – в двух, 12 – в трех. Доминирующие и представленные более чем в четырех регионах фенотипы показаны в табл. 2. Как и в предыдущие годы, наибольшее распространение имели фенотипы TGTKT и THTKT, различающиеся между собой по вирулентности к *TcLr26*.

Таблица 1. Вирулентность популяций *P. triticina* в регионах России в 2011- 2014 гг. (%)

Линия с Lr-геном	Популяции гриба *										
	СЗ-К	СЗ	Ц	ЦЧР	ВВ	СВ	НВ	У	СК	СК-Д	ЗС
1	100	81 ± 2.6	100	93 ± 1.7	76 ± 4.0	100	60 ± 11	93 ± 2.4	90 ± 3.4	54 ± 7.5	98 ± 0.9
2a	19 ± 8.6	12 ± 2.1	9 ± 6.1	58 ± 3.3	65 ± 4.4	70 ± 5.4	60 ± 11	89 ± 3.0	67 ± 5.2	25 ± 6.5	95 ± 1.3
2b	24 ± 9.3	25 ± 2.8	9 ± 6.1	81 ± 2.6	81 ± 3.7	77 ± 5	100	97 ± 1.6	94 ± 2.8	48 ± 7.5	97 ± 1
2c	71 ± 9.9	37 ± 3.2	100	88 ± 2.2	92 ± 2.5	90 ± 3.5	100	99 ± 0.9	100	100	100
3a	14 ± 7.6	97 ± 1.2	100	99 ± 0.6	100	100	100	100	100	100	100
3bg	19 ± 8.6	98 ± 1.0	100	99 ± 0.6	100	100	100	100	100	100	100
3ka	19 ± 8.6	97 ± 0.9	100	100	100	100	100	100	100	100	100
9	0	0	0	1 ± 0.8	0	0	0	42 ± 4.7	0	0	38 ± 3.0
11	100	100	100	100	100	100	100	97 ± 1.6	99 ± 1.2	100	99 ± 0.6
14a	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
14b	100	100	100	100	100	100	100	90 ± 3.0	100	100	98.6 ± 0.7
15	95 ± 4.6	56 ± 3.3	9 ± 6.1	72 ± 3.0	78 ± 3.8	93 ± 3	60 ± 11	91 ± 2.8	90 ± 3.4	25 ± 6.5	96 ± 1.1
16	100	100	100	99 ± 0.6	100	100	100	98 ± 1.3	98 ± 1.7	95 ± 3.1	100
17	100	100	100	100	100	100	100	96 ± 1.8	100	100	97 ± 1
18	100	100	100	95 ± 1.5	100	100	100	80 ± 4.0	100	100	94 ± 1.4
19	0	0	0	14 ± 2.3	36 ± 4.5	70 ± 3	0	1 ± 0.9	1,2 ± 1.7	0	1 ± 0.5
20	86 ± 7.6	77 ± 2.7	77 ± 8.9	82 ± 2.6	56 ± 4.6	52 ± 5.9	60 ± 11	64 ± 4.6	72 ± 5	32 ± 7	75 ± 2.5
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	9 ± 6.4	64 ± 3.2	59 ± 10.5	55 ± 3.3	37 ± 4.5	39 ± 5.8	100	16 ± 3.5	67 ± 5.1	41 ± 7.4	14 ± 2
30	100	99 ± 0.4	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*СЗ-К – Северо-Западный, Калининградская обл., СЗ – Северо-Западный, Ц – Центральный, ЦЧР – Центрально-Черноземный, ВВ – Волго-Вятский, СВ – Средневолжский, НВ – Нижневолжский, У – Уральский, СК – Северо-Кавказский, СК-Д – Северо-Кавказский, Дагестан, ЗС – Западно-Сибирский.

Таблица 2. Широко представленные и доминирующие фенотипы *P. triticina* в России в 2011-2014 гг.

Фенотипы	Авирулентность на TcLr-линиях	СЗ-К	СЗ	Ц	ЦЧР	ВВ	СВ	НВ	У	СК	СК-Д	ЗС
TGTKT	9, 19, 24, 26	9	5	9	18	17	35		18	26	11	50
THTKT	9, 24, 19		2		16	14	3	60	3	24		6
THTFT	9, 24, 19, 20		2		2		18		3	15	2	2
TGTFT	9, 19, 20, 24, 26		1		3		8		10		11	2
FHTFS	1, 2a, 9, 15, 24, 19, 20		1		1	5		40		6	7	
TGTTT	9, 24, 26				4	13	3			1		
PGTFJ	2a, 2b, 9, 15, 19, 20, 24		2	23			3					1
RHTFK	2a, 2b, 9, 19, 20, 24				1	2	4			2		
RHTKJ	2a, 2b, 9, 15, 19, 24		6	59	1						2	
RHTKK	2a, 2b, 9, 19, 24		1		4	1	4					
RHTKT	2a, 9, 19, 24		4		2					15		1
MHTKK	2a, 2b, 2c, 9, 19, 24		23		7	4						
NGKKF	2a, 2b, 2c, 3a, 3bg, 3ka, 9, 19, 24, 26	38*										

* выделением показана частота доминантного фенотипа.

Сохраняется тенденция снижения численности фенотипов группы F– (авирулентность на линиях TcLr1, TcLr2a), которые до 2003 года доминировали во всех европейских популяциях [Гультияева и др., 2009]. Их фактически заменили фенотипы группы P– авирулентные на линии TcLr2a. Эта группа фенотипов имела высокую представленность во многих российских популяциях (34% от общего количества фенотипов).

Показатели внутривидовой популяционной разнообразия по вирулентности представлены в таблице 3. Более высоким внутривидовой популяционной разнообразием характеризовались популяции Северо-Западного, Центрально-Черноземного, Уральского и Западно-Сибирского регионов. Это обусловлено наличием в анализе инфекционного материала не только с производственных посевов, но и ГСУ, и экспериментальных полей. Разнообразие центральных и нижневолжских популяций было ниже за счет ограниченного количества инфекционного материала, из этих регионов. В

целом, в 2011–2014 гг. не выявлено значимых ежегодных изменений в доминирующем фенотипическом составе региональных популяций. При этом практически ежегодно в них выявлялись единичные оригинальные фенотипы, которые, как правило, не закреплялись и не отмечались в последующий период.

Определение степени сходства по фенотипическому составу спорных образцов популяций, собранных в различных географических точках, позволяет судить о том, принадлежат ли они к одной или разным генеральным популяциям, и в результате определить ареалы популяций. Появление в популяции фенотипов, характерных для другой популяции, может явиться результатом миграции спор [Михайлова, 2006]. Как и в предыдущий период, определенное межпопуляционное сходство наблюдалось для большинства европейских популяций, за исключением северо-западной из Калининградской области. Согласно индексу Космана (KGst) северо-западные и центральные

Таблица 3. Разнообразие российских популяций *P. triticina* по вирулентности

Показатели	СЗ-К	СЗ	Ц	ЦЧР	ВВ	СВ	НВ	У	СК	СК-Д	ЗС
Число изолятов, n	21	249	22	222	115	71	20	108	82	29	293
Число фенотипов, ph	7	35	4	44	15	15	2	30	13	14	31
Частота доминантного фенотипа, %	38	23	59	18	17	35	60	18	26	16	50
Частота оригинальных фенотипов	3	12	0	16	1	1	0	13	1	3	17
Среднее число аллелей вирулентности	11	13	13	15	15	15	15	15	15	13	16
Simple richness (ph/n)	0.33	0.14	0.18	0.2	0.13	0.21	0.10	0.28	0.16	0.48	0.11
Evenness, E*	0.83	0.8	0.9	0.82	0.87	0.8	0.97	0.83	0.79	0.92	0.58
Индексы разнообразия:											
Нея (Hs)	0.12	0.14	0.07	0.14	0.15	0.11	0.1	0.12	0.09	0.14	0.08
Шеннона (Sh)	0.53	0.52	0.35	0.57	0.5	0.50	0.23	0.6	0.45	0.64	0.36
Космана (KWm)	0.15	0.20	0.09	0.19	0.23	0.16	0.16	0.16	0.12	0.22	0.11
ADWm**	0.12	0.14	0.07	0.14	0.15	0.11	0.1	0.12	0.09	0.14	0.08

* – равномерность распределения фенотипов;

** - average dissimilarity within (Dice dissimilarity).

популяции имели большие отличия от азиатских (западносибирских и уральских) по сравнению с поволжскими и центрально-черноземными (табл. 4). Северо-кавказские популяции из Краснодарского, Ставропольского краев и Ростовской области характеризовались более высоким сходством с европейскими и азиатскими по сравнению с популяцией из Дагестана. Данный факт согласуется с ранее выдвинутым предположением Л.А. Михайловой [1995] и Г.К. Сорокиной [1990] о принадлежности их к европейской группе популяций.

Таблица 4. Различия между российскими популяциями *P. triticina* в 2011–2014 гг.

Регионы	Индекс Космана KGst									
	СЗ-К	СЗ	Ц	ЦЧР	ВВ	СВ	НВ	У	СК	СК-Д
СЗ	0.14									
Ц	0.17	0.05								
ЦЧР	0.15	0.05	0.07							
ВВ	0.17	0.07	0.09	0.02						
СВ	0.15	0.07	0.09	0.02	0.02					
НВ	0.22	0.08	0.09	0.04	0.05	0.05				
У	0.19	0.13	0.14	0.05	0.05	0.04	0.08			
СК	0.17	0.08	0.09	0.02	0.02	0.02	0.03	0.04		
СК-Д	0.18	0.05	0.04	0.06	0.05	0.06	0.06	0.1	0.06	
ЗС	0.19	0.13	0.14	0.05	0.05	0.04	0.08	0.01	0.04	0.11

В целом, в 2011–2014 гг. выявлены некоторые изменения в структуре российских популяций по сравнению с предыдущим десятилетием. Основные различия западносибирской и уральской популяций связаны с появлением и нарастанием численности изолятов, вирулентных к *TcLr9*, что в первую очередь обусловлено увеличением посевных площадей, занятых сортами с этим геном. Отмечено появление данных изолятов в европейских популяциях, что может привести к утрате устойчивости сортов Немчиновская 24 и Немчиновская 17, несущих ген *Lr9* и выращиваемых в Центральном регионе. Наблюдается снижение частоты изолятов, вирулентных к *TcLr19* в европейских регионах РФ. Сохраняется тенденция возрастания частоты изолятов, вирулентных к *TcLr1* во всех регионах России. Отмечается увеличение сходства европейских популяций с западно-азиатскими. Оно было выше с популяциями ЦЧР, Поволжья и Северного Кавказа (Ростовская обл., Краснодарский и Ставропольский края) и ниже с дагестанскими, северо-западными и центральными. Северокавказские популяции из Ростовской области, Краснодарского

и Ставропольского краев имели более высокое сходство с центральноевропейскими и азиатскими по сравнению с дагестанскими. Как и ранее, частота встречаемости изолятов авирулентных к *TcLr1* в дагестанской популяции была выше, чем во всех других популяциях. Существенным отличием от всех изученных характеризовалась северо-западная популяция из Калининградской области.

Полученные результаты согласуются с результатами других исследователей. Л.Г. Тырышкиным и соавторами [2014] показана значительная схожесть структуры средневожской популяции *P. triticina* со структурой популяций с Северного Кавказа и Северо-Западного региона России в 2011–2012 гг.

Для проведения SSR-анализа отобрано 169 монопустьных изолятов, которые были представлены 60 фенотипами: широко распространенными и редкими оригинальными. Дополнительно для сравнения в анализ было включено 15 изолятов из Казахстана и 1 – из Китая. Для выявления влияния растения-хозяина на полиморфизм популяций по SSR-маркерам в анализ включены изоляты, имеющие общее происхождение (место сбора), но собранные с разных сортов пшеницы, а также с одного сорта, выращиваемого в нескольких регионах (например, с сорта Инна, выращиваемого в Северо-Западном и Центральном-Черноземном регионах; с сорта Эстер в Северо-западном и Волго-Вятском регионах и др.). Согласно UPGMA дендрограмме (NTSYSpc, Version 2.2) генетического родства по вирулентности изоляты кластеризовались в 4 группы: 1) западносибирские, уральские, казахстанские; 2) поволжские и центрально-европейские (Центральный регион и ЦЧР); 3) северокавказские; 4) северо-западные (рис.). Таким образом, структура изолятов, отобранных для SSR-анализа, коррелировала с результатами исследований 2011–2014 гг. и предыдущим десятилетием и в ней прослеживалась географическая дифференциация.

Для проведения SSR-анализа оценена эффективность 23 микросателлитных маркеров [Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007] и оценен полиморфизм подготовленной коллекции гриба *P. triticina*. Среди 23 SSR-маркеров не все оказались результативными для анализа российских популяций. Маркер PtSSR3 не выявлялся ни у одного из 185 проанализированных изолятов. С другими 22 маркерами в агарозном геле наблюдали характерные продукты амплификации. Однако, ни в концентрированном агарозном геле (3%), ни полиакриламидном (ПААГ, 6%) гелях не выяв-

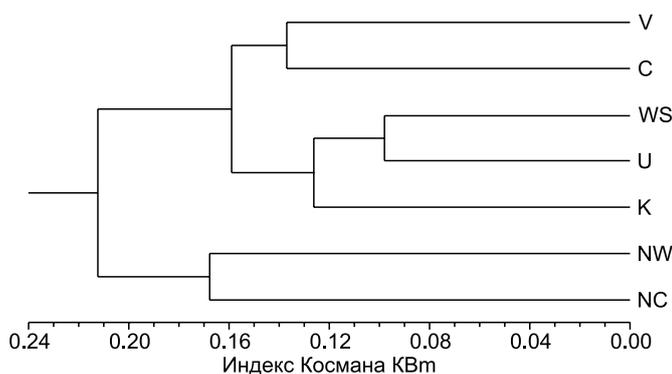


Рисунок. UPGMA дендрограмма генетического родства изолятов *P. triticina* для SSR-анализа по вирулентности.

V – Поволжье (Волго-Вятский, Средневолжский, Нижневолжский регионы), С – Центральный (Центральный, Центрально-Черноземный), WS – Западно-Сибирский, U – Уральский, NW – Северо-Западный, NC – Северо-Кавказский, К – Казахстан

лялись различия в размерах идентифицируемых аллелей. В связи с этим, для выявления полиморфизма в размерах SSR-аллелей был использован генетический анализатор ABI Prism 3500 (ABI-Hitachi, Япония). В подобных исследованиях Cereal Diseases Laboratory (США) [Ordoñez, Kolmer, 2007; Kolmer et al., 2015] для этого использовался анализатор LI-COR (Lincoln, NE) 4200 или 4300. Были отработаны методические подходы, касающиеся подготовки проб и условий проведения SSR-анализа. Все маркеры были протестированы с использованием ограниченной коллекции изолятов и получены результаты по размерам идентифицируемых аллелей, которые согласовывались с представленными в литературе данными [Duan et al., 2003; Ordoñez, Kolmer, 2007; Szabo, Kolmer, 2007]. С использованием отобранных маркеров будет охарактеризована коллекция изолятов *P. triticina* по SSR-полиморфизму 2006–2014 гг. и оценена корреляция в структуре по вирулентности и молекулярным маркерам.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 14-04-00464_а».

Plant Protection News, 2015, 3(85), p. 5 – 10

STRUCTURE OF RUSSIAN POPULATIONS OF *Puccinia triticina*

E.I. Gulyaeva, E.L. Shaidayuk, I.A. Kazartsev, M.K. Aristova

All-Russian Institute of Plant Protection, St Petersburg, Russia

The analysis of population structure by virulence characters of the activator of wheat brown rust *Puccinia triticina* Eriks. collected in the territory of the Russian Federation in 2011–2014 is carried out. High efficiency of Lr24 gene is shown. The increase of number of isolates virulent to wheat lines bearing Lr9 gene is revealed in the West Siberian and Ural populations. In 2013 their appearance in Central Chernozem populations is for the first time noted that can lead to defeat of the grades protected by Lr9 gene. The virulence to wheat grades bearing Lr19 gene was high in the Volga region, but met in other regions less often. The tendency of frequency increase of virulence to the Lr1 lines in the European populations remains stable. The use of an international set of 20 line-differentiators has revealed 113 phenotypes among the 1232 monopustular isolates studied. TGTKT and THTKT races are the most presented. High similarity of West Siberian and Ural populations by phenotype representation is noted. Northwestern and Central European populations have higher, than Central Chernozem and Volga populations, differences from West Siberian and Ural populations. Populations from the Rostov Region, the Krasnodar and Stavropol Territories have higher, than Dagestan population, similarity with European and Asian populations. Populations from the Kaliningrad region has essential differences from all other studied populations. 185 monopustular isolates were selected for polymorphism studying in the Russian populations by SSR markers, and DNA extraction was carried out. Efficiency of the offered 23 SSR markers for the analysis of the Russian populations was estimated, and 20 most polymorphic populations were selected. Methodical approaches were developed for carrying out the SSR analysis with use of the genetic ABI Prism 3500 analyzer (ABI-Hitachi, Japan).

Keywords: brown rust, soft wheat, virulence, Lr-gene, SSR marker.

Библиографический список (References)

- Гультьева Е.И. Тенденции изменчивости популяций *Puccinia triticina* под влиянием выращиваемых сортов пшеницы и эффективность Lr-генов в основных зернопроизводящих регионах РФ / Е.И. Гультьева, О.А. Баранова // Технология создания и использования сортов и гибридов с групповой и комплексной устойчивостью к вредным организмам в защите растений. СПб. РАСХН, Отделение защиты растений, ГНУ ВНИИЗР, 2010. С. 26–48.
- Гультьева Е.И. Вирулентность и структура популяций *Puccinia triticina* в Российской Федерации в 2007 году / Е.И. Гультьева, О.А. Баранова, А.П. Дмитриев // Вестник защиты растений. 2009. N 4. С. 333–338.
- Гультьева Е.И. Селекция на устойчивость к бурой ржавчине в России / Е.И. Гультьева, А.С. Садовая // Защита и карантин растений. 2014. N 10. С. 242–246.
- Михайлова Л.А. Структура популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы. III Оценка степени сходства популяций на территории СНГ в 1988–1990 гг. / Л.А. Михайлова // Микология и фитопатология. 1995. Т. 29. N 3. С. 45–51.
- Михайлова Л.А. Генетика взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы / Л.А. Михайлова. Под ред. акад. РАСХН М.М. Левитина // СПб. ВИЗР, 2006. 80 с.
- Михайлова Л.А. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob.ex Desm.f.sp.*tritici*. / Л.А. Михайлова, Е.И. Гультьева, Н.В. Мироненко // СПб РАСХН, ВНИИЗР, Инновац. центр защиты растений, 2003. 24 с.
- Михайлова Л.А. Ареалы популяций возбудителя листовой ржавчины пшеницы / Л.А. Михайлова, С.В. Васильев // Микология и фитопатология. 1985. Т.19. N 2. С.158–63.
- Сорокина Г. К. Использование эффективных Lr-генов в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине (Методические рекомендации) / Г. К. Сорокина, Л. А. Смирнова, В.К. Лангаева и др. ВНИИФ, ВАСХНИЛ.М., 1990. 31 с.
- Тырышкин Л.Г. Сравнительная характеристика вирулентности *Puccinia triticina* Rob. ex Desm. syn.: *Puccinia triticina* Erikss. в Среднем Поволжье / Л.Г. Тырышкин, В.Г. Захаров, В.В. Сюков // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014. Т. 18. N 2. С. 373–377.
- Duan X. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. / X. Duan, J. Enjalbert, D. Vautrin, C. Solignac, T. Giraut // Mol. Ecol. Notes. 2003. Vol.3. P. 65–67.
- Gulyaeva E. Population structure of *Puccinia triticina* in Russia during 2007, as assessed by virulence and molecular markers / E. Gulyaeva, E. Kosman, A. Dmitriev, O. Baranova // Abstracts of oral and poster presentations of 8th International wheat conference, June 1–4. 2010. St. Petersburg, Russia. P. 258–259.

- Gulyaeva E.I. Regional diversity of Russian populations of *Puccinia triticina* in 2007/ E.I. Gulyaeva, A.P. Dmitriev, E. Kosman // Canadian J. Plant Pathology. 2012. Vol. 34. N 2. P.213–224.
- Justesen A.F. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers / A. F. Justesen, C. J. Ridout, M. S. Hovmøller // Plant Pathology. 2002. Vol. 51. P. 13–23.
- Kolmer J.A. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype / J. A. Kolmer, M. G. Kabdulova, M. A. Mustafina, N.S. Zhemchuzhina, V. Dubovoy // Plant Pathology. 2015. Vol.64. N 2. P. 328–336.
- Kosman E. Virulence Analysis Tool (VAT). / E. Kosman, A. Dinooor, A. Herrmann, G.A Schachtel. // User Manual, 2008. <http://www.tau.ac.il/lifesci/departments/plants/members/kosman/VAT.html>
- Kosman E. Conceptual analysis of methods applied to assessment of diversity within and distance between populations with asexual or mixed mode of reproduction / E. Kosman, K. J. Leonard // New Phytol. 2007. Vol.174. P. 683–696.
- Lind V. Virulence of *Puccinia triticina* on winter wheat in Germany and the European regions of Russian Federation / V. Lind, E. Gulyaeva // J. Phytopathology. 2007. Vol. 155. N 1. P. 13–21.
- Long D.L. North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f.sp. *tritici* / D.L. Long, J. A. Kolmer // Phytopathology. 1989. Vol.79. P. 525–529.
- Mains E.B. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat; *Puccinia triticina* Erikss. / E.B. Mains, H. S. Jackson // Phytopathology. 1926. Vol.16. P. 89–120.
- Ordoñez, M. E. Simple sequence repeat diversity of a worldwide collection of *Puccinia triticina* from durum wheat / M. E. Ordoñez, J. A. Kolmer // Phytopathology. 2007. Vol. 97. P. 574–583.
- Szabo L.S. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina* / L.S. Szabo, J. A. Kolmer // Mol. Ecol. Notes. 2007. Vol.7. P. 708–710.

Translation of Russian References

- Gulyaeva E.I., A.S. Sadovaya. Selection for resistance to brown rust in Russia. Zashchita i karantin rastenii. 2014. N 10. P. 242–246. (In Russian).
- Gulyaeva E.I., O.A. Baranova Tendencies of *Puccinia triticina* population variability under the influence of grown-up wheat grades, and efficiency of Lr-genes in the main grain producing regions of Russian Federation. In: Tekhnologiya sozdaniya i ispol'zovaniya sortov i gibridov s gruppovoi i kompleksnoi ustoychivost'yu k vrednym organizmam v zashchite rastenii. St. Petersburg. RASKhN, VIZR, 2010. P. 26–48. (In Russian).
- Gulyaeva E.I., O.A. Baranova, A.P. Dmitriev. Virulence and *Puccinia triticina* population structure in the Russian Federation in 2007. Vestnik zashchity rastenii. 2009. N 4. P. 333–338. (In Russian).
- Mikhailova L.A. Genetics of relationship of brown rust activator and wheat. Ed. M.M. Levitin. St. Petersburg. VIZR, 2006. 80 p. (In Russian).
- Mikhailova L.A. Population structure of wheat brown rust activator. III. Assessment of population similarity degree in the territory of CIS countries in 1988–1990. Mikologiya i fitopatologiya. 1995. T. 29. N 3. P. 45–51. (In Russian).
- Mikhailova L.A., E.I. Gulyaeva, N.V. Mironenko. Research methods for genetic diversity of populations of the activator of wheat brown rust *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. St. Petersburg. RASKhN, VIZR, 2003. 24 p. (In Russian).
- Mikhailova L.A., S.V. Vasil'ev. Areas of populations of wheat leaf rust activator of. Mikologiya i fitopatologiya. 1985. V.19. N 2. P. 158–63. (In Russian).
- Sorokina G. K., L. A. Smirnova, V.K. Langavaya et al. Use of effective Lr-genes in selection of wheat for resistance to brown rust (Methodical recommendations). VNIIF, VASKhNIL. M., 1990. 31 p. (In Russian).
- Tyryshkin L.G., V.G. Zakharov, V.V. Syukov. Comparative characteristics of virulence of *Puccinia triticina* Rob. ex Desm. syn.: *Puccinia triticina* Erikss. in Middle Volga region. Vavilovskii zhurnal genetiki i selektsii. 2014. T. 18. N 2. P. 373–377. (In Russian).

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург – Пушкин, Российская Федерация
 *Гулыяева Елена Ивановна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: gullena@rambler.ru
 Шайдаюк Екатерина Львовна. Младший научный сотрудник
 Казарцев Игорь Александрович. Научный сотрудник, кандидат биологических наук
 Аристова Мария Константиновна. Лаборант-исследователь.

* Ответственный за переписку

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo shosse, 3, 196608, St Petersburg – Pushkin, Russian Federation
 *Gulyaeva Elena Ivanovna, Leading Researcher, PhD in Biology, e-mail: gullena@rambler.ru
 Shaidayuk Ekaterina L'vovna, Junior Researcher
 Kazartsev Igor Aleksandrovich, Researcher, PhD in Biology
 Aristova Mariya Konstantinovna. Laboratorian Researcher

* Responsible for correspondence