

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА РОССИЙСКИХ И КАЗАХСТАНСКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ *Puccinia triticina* Erikss. ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ И SSR МАРКЕРАМ*

Е.И. ГУЛЬТЯЕВА¹, Е.Л. ШАЙДАЮК¹, В.П. ШАМАНИН², А.К. АХМЕТОВА³,
В.А. ТЮНИН⁴, Е.Р. ШРЕЙДЕР⁴, И.В. КАШИНА⁵, Л.А. ЕРОШЕНКО⁶,
Г.А. СЕРЕДА⁷, А.И. МОРГУНОВ³

Буряя ржавчина (возбудитель *Puccinia triticina* Erikss.) — экономически значимое заболевание яровой пшеницы в западно-азиатских регионах России и Северном Казахстане. Для успешной селекции на устойчивость к инфекции необходима информация об эффективности генов *Lr* пшеницы, влиянии новых сортов на изменчивость патогена по вирулентности, а также о степени изоляции популяций друг от друга. До настоящего времени в популяционных исследованиях *P. triticina* не использовали единообразный инфекционный материал (его собирали с разного набора сортов в каждом регионе), в связи с чем на результаты оценки вирулентности существенно влияло селективное действие растения-хозяина. Мы впервые сравнили структуру популяций гриба *P. triticina* на западе азиатской части России и в Северном Казахстане по вирулентности и молекулярным маркерам, используя в качестве источника инфекционного материала единый набор образцов пшеницы сезона 2016 года, которые испытываются в этих регионах в рамках программы Казахстанско-Сибирской сети улучшения яровой пшеницы (КАСИБ). Для анализа вирулентности использовали 91 монопустульный изолят, в том числе 13 челябинских, 28 омских, 6 курганских, 16 акмолинских, 16 павлодарских и 12 карагандинских. С помощью 20 почти изогенных *Lr*-линий Thatcher (*TcLr*) нами описаны 11 фенотипов вирулентности. Сходный фенотипический состав патогена был выявлен на сортах Дуэт, Терция, Омская 35, Памяти Азиева, Саратовская 29, Чебаркульская 3 и линии Эритросперум 85-08. На сорте Астана 2 и линиях Лютеценс 1003, Лютеценс 6/04-4 российские изоляты гриба отличались от казахстанских по вирулентности для *TcLr11*, а на линиях ГVK 2074/4 и Лютеценс 715 — авирулентностью в отношении *TcLr18*. Более существенные различия по спектру вирулентности между региональными популяциями отмечались на менее поражаемой линии Лютеценс 34/08-19 и сорте Родник. Все изученные изоляты *P. triticina* были авирулентны для *TcLr19*, *TcLr24* и вирулентны для *TcLr3a*, *TcLr3bg*, *TcLr3ka*, *TcLr14a*, *TcLr14b*, *TcLr16*, *TcLr17*, *TcLr30*. На линиях *Tc* с генами *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr18*, *Lr20*, *Lr26* наблюдали варьирование по частоте вирулентности. Вирулентность для *TcLr9* выявили в популяциях патогена, собранных с образцов пшеницы с этим геном (Дуэт, Терция, Чебаркульская 3, Лютеценс 34/08-19). Индексы генетических расстояний по *M. Nei* (*Nei D*) и F_{ST} (аналог F_{ST} для бинарных данных в AMOVA) подтвердили различия в дифференциации популяций по вирулентности. Значения *Nei D* указывали на высокое сходство между большинством североказахстанских и российских популяций, за исключением челябинской и карагандинской. По индексу F_{ST} высоким сходством обладали омская, курганская и североказахстанские популяции. Челябинская популяция была близка с курганской и отличалась от других изученных. С использованием 12 SSR маркеров были охарактеризованы 46 изолятов и выявлены 9 генотипов. В результате обнаружен 21 полиморфный аллель. Значения индексов *Nei D* и F_{ST} указывали на умеренные различия между челябинской и карагандинской популяциями и высокое сходство между другими изученными. В целом проведенные исследования свидетельствуют о высоком сходстве популяций бурой ржавчины в западно-азиатских регионах России и Северном Казахстане, что подтверждает предположение о существовании единой популяции гриба в изученных областях. Для предотвращения эпифитотий *P. triticina* на сопредельной территории России и Казахстана необходимо постоянное обновление сортимента пшеницы, расширение его генетического разнообразия и применение стратегии мозаичного размещения сортов с соблюдением оптимальных площадей, занятых генетически однородными сортами.

Ключевые слова: *Puccinia triticina* Erikss., буряя ржавчина, мягкая пшеница, популяции, вирулентность, *Lr*-гены, SSR маркеры.

Яровая пшеница — основная зерновая культура в условиях Западной Сибири, Урала и Северного Казахстана. К числу наиболее распространенных и вредоносных заболеваний, лимитирующих урожай зерна пшеницы в этих регионах, относится буряя ржавчина (возбудитель *Puccinia*

* Молекулярно-генетические исследования патогена выполнены при финансовой поддержке РНФ, проект № 14-26-00067. Идентификация генов устойчивости у пшеницы с использованием ПЦР маркеров проведена в рамках проекта РНФ № 16-16-10005.

tritricina Erikss.) (1-3). При ее эпифитотийном развитии потери урожая пшеницы могут достигать 15-30 % (4).

Большинство производственных сортов, выращиваемых в Западной Сибири, на Урале и в Северном Казахстане, в разной степени восприимчивы к бурой ржавчине (2, 3). Челночная селекция в рамках созданной СИММУТ (International Maize and Wheat Improvement Center) Казахстанско-Сибирской сети по улучшению яровой пшеницы (КАСИБ) позволяет привлекать мировые генетические ресурсы для повышения эффективности реализуемых селекционных программ, в том числе по устойчивости сортов к бурой ржавчине (1, 5).

Стратегии генетической защиты пшеницы основаны на создании и внедрении в производство сортов, иммунных к бурой ржавчине, для чего, в свою очередь, необходимо располагать данными об эффективности генов устойчивости к ее возбудителю (*Lr*-генов), изменению вирулентности популяций патогена под влиянием новых сортов, степени изоляции популяций и возможного потока генов между ними. Частота генов вирулентности рассматривается как важнейший критерий при изучении структуры популяции патогена, однако не всегда адекватно характеризует ее (7, 8), поскольку концентрирование генов вирулентности в популяции гриба напрямую обусловлено селективным давлением возделываемых сортов пшеницы. Несмотря на это, большинство популяционных исследований возбудителя бурой ржавчины в России и за рубежом выполнены на инфекционном материале, собранном с разного набора сортов в каждом регионе (9, 10).

Применение селективно нейтральных молекулярных маркеров для сравнения полиморфизмов ДНК патогена позволяет уточнить и дополнить результаты анализа вирулентности. Такие маркеры незаменимы при изучении путей миграции организмов, формирования единых эпидемиологических территорий и возникновения ареалов (7). Молекулярные маркеры (RAPD — random amplification of polymorphic DNA, AFLP — amplified fragment length polymorphism, SSR — simple sequence repeat) привлекаются для исследований *Puccinia tritricina* с середины 1990-х годов (11), при этом наибольшее применение получили микросателлитные маркеры. С их помощью охарактеризована структура популяций *P. tritricina* на Северо- и Южноамериканском континентах, в Западной Европе, в странах Ближнего Востока, Центральной Азии и Северного Кавказа (4, 8, 12).

Нами для анализа впервые был использован инфекционный материал, собранный с единого набора сортов пшеницы в нескольких географических точках, что позволило снизить селективное давление растения-хозяина на результаты оценки вирулентности. При этом было выявлено высокое сходство популяций возбудителя бурой ржавчины на Урале, в Западной Сибири и Северном Казахстане, что подтвердило предположение о существовании единой популяции гриба на этих территориях.

Цель работы — анализ генетической структуры популяций *Puccinia tritricina* в западно-азиатских регионах России и Северном Казахстане по вирулентности и микросателлитным локусам.

Методика. Образцы *Puccinia tritricina* Erikss. отбирали в 2016 году на растениях 15 сортов пшеницы, изучаемых по программе КАСИБ в условиях Челябинской, Омской, Курганской областей (Россия) и Акмолинской, Карагандинской, Павлодарской областей (Казахстан). Во всех этих регионах погодные условия в 2016 году были благоприятными для развития бурой ржавчины, пораженность сортов варьировала от 0 до 100 %.

Изоляты размножали методом лабораторного культивирования со-

гласно описанию (13). Вирулентность 91 монопустульного изолята (по 2-3 с каждого образца пшеницы) анализировали с использованием 20 почти изогенных линий Thatcher с генами *Lr* (*TcLr*). Для этого по 3 зерна каждой *TcLr*-линии высевали в почву. Проростки (10-14 сут, фаза 1-го листа) инокулировали суспензией спор патогена (10^6 /мл) и помещали в камеру искусственного климата Versatile Environmental Test Chamber MLR-352H («SANYO Electric Co., Ltd.», Япония) при температуре 22 °C и влажности 75 %. Результаты учитывали на 10-е сут по балльной шкале E.V. Mains и H.S. Jackson (14): 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 — разные типы пустул на одном листе, присутствуют хлорозы и некрозы (растения с типом реакции X относили к восприимчивым).

Фенотипы вирулентности классифицировали по североамериканской системе (15). Для этого 20 *TcLr*-линий разделили на пять наборов: 1-й — *TcLr1*, *TcLr2a*, *TcLr2c*, *TcLr3a*; 2-й — *TcLr9*, *TcLr16*, *TcLr24*, *TcLr26*; 3-й — *TcLr3ka*, *TcLr11*, *TcLr17*, *TcLr30*, 4-й — *TcLr2b*, *TcLr3bg*, *TcLr14a*, *TcLr14b*; 5-й — *TcLr15*, *TcLr18*, *TcLr19*, *TcLr20*. Буквенный код фенотипа определяли с помощью пакета программ VAT (Virulence Analysis Tool; <https://en-lifesci.tau.ac.il/profile/kosman/vat>). Индексы межпопуляционных различий по M. Nei (Nei D) и F_{ST} (аналог Fst для бинарных данных в AMOVA, analysis of molecular variance) вычисляли с помощью пакета программ GenAlEx (Genetic analysis in Excel 6.5; <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>).

SSR-анализ проводили для 46 монопустульных изолятов *P. triticina*, в том числе 7 челябинских, 5 курганских, 14 омских, 8 акмолинских, 8 павлодарских и 4 карагандинских (1-2 изолята с каждого изученного образца пшеницы). Процедура подготовки коллекции патогена была сходна с описанной J.A. Kolmer с соавт. (4). ДНК гриба выделяли по методике A.F. Justesen и соавт. (16). Определяли полиморфизм 12 микросателлитных локусов: PtSSR50, PtSSR55, PtSSR61, PtSSR91, PtSSR92, PtSSR151, PtSSR152, PtSSR158, PtSSR161, PtSSR164, PtSSR173, RB35. Используемые SSR маркеры подобраны для оценки генетической изменчивости гриба *P. triticina* (4, 8, 10, 12). Условия ПЦР и последовательности праймеров представлены в оригинальных работах (17, 18). Исследование выполняли на генетическом анализаторе ABI Prism 3500 («Applied Biosystems», США, «Hitachi», Япония). Размеры SSR аллелей определяли в программе GeneMapper 4.1. Для оценки влияния выращиваемых сортов на вирулентность патогена идентифицировали *Lr*-гены у образцов пшеницы — источников инфекционного материала. Использовали маркеры генов *Lr1* (WR003), *Lr9* (SCS5), *Lr10* (FI.2245/*Lr10-6/r2*), *Lr26* (SCM 9) и *Lr34* (L34DIN9/*Lr34Plus*) (19). Протоколы ПЦР и праймеры при маркировании сортов и линий соответствовали приведенным в оригинальных работах, процитированных A. Serfling с соавт. (19), реакцию проводили на амплификаторе C1000™ Thermal Cycler («Bio-Rad», США).

Статистическую обработку результатов SSR-анализа, включая расчет P , осуществляли с использованием пакета программ GenAlEx 6.5 (genetic analysis in Excel, 6.5; <http://biology.anu.edu.au/GenAlEx>). Внутрипопуляционную генетическую изменчивость гриба по микросателлитным локусам описывали следующими показателями: среднее число аллелей на локус (N_a), число эффективных аллелей (N_e), ожидаемая (H_e) и наблюдаемая (H_o) гетерозиготность, индекс фиксации (F) и индекс Шеннона (I). Генетические различия между популяциями оценивали индексами Nei D по M. Nei и F_{st} , которые рассчитывали с использованием алгоритма AMOVA

1. Сорты пшеницы — источники инфекционного материала *Puccinia triticina* Erikss. и идентифицированные на них фенотипы вирулентности и SSR генотипы патогена в разных географических популяциях (2016 год)

Образец	Россия						Казахстан					
	Челябинская область		Омская область		Курганская область		Акмолинская область		Павлодарская область		Карагандинская область	
	П, %	Ф/SSR	П, %	Ф/SSR	П, %	Ф/SSR	П, %	Ф/SSR	П, %	Ф/SSR	П, %	Ф/SSR
Астана 2	50S	—	40S	TGTTR/D	70S	TGTTR/D	90S	TGPTR/D	50S	TGPTR/G	45S	—
ГВК 2074/4	100S	—	80S	THTTM/D	70S	—	50S	—	20S	THTTR/B	10S	THTTR/A
Дуэт	50S	PQTKH/F	50S	PQTKH/F	—	—	—	—	—	—	—	—
Лютесценс 1003	20MS	—	100S	TGTTR/F	40S	—	90S	TGPTR	50S	TGPTR/G	30S	—
Лютесценс 34/08-19	10MR	—	5MR	—	20S	PQTKH/B	5S	TQTTR/B	20S	—	0	—
Лютесценс 6/04-4	50S	THTTR/B	10MR	THTTR/B	10S	—	5S	THPTR/B	20S	THPTR/B	0	—
Лютесценс 715	50S	—	100S	TGTTM/H	60S	—	70MS	TGTTR/B	50S	—	20S	TGTTR/C
Омская 35	50S	—	100S	TGTTR/F	70S	TGTTR/G	70S	TGTTTR/C	50S	—	—	—
Памяти Азиева	50S	—	100S	TGTTR/C	80S	TGTTR/C	90S	TGTTTR/C	40S	—	40S	—
Родник	20S	THTTR/A	100S	TGTTTR/A	30S	—	50S	TGTTTR/F	30S	MGTKH/B	10S	—
Саратовская 29	50S	—	100S	TGTTR/F	50S	—	100S	—	30S	TGTTR/F	70S	—
Степная 53	80S	—	80S	TGTTM/B	60S	—	50S	—	50S	TGTTM/B	5MS	TGPTR/C
Терция	20MS	—	40S	—	60S	TQPTR/B	90S	—	40S	TQPTR/D	—	—
Чебаркульская 3	50S	CQPKG/E	5S	CQPKG/E	60S	—	10S	CQPKG/E	20S	—	0	—
Эритросперум 85-08	50S	THTTR/B	5MR	THTTR/B	0	—	10S	—	10S	—	0	—

Примечание. П — пораженность, Ф/SSR — фенотип/SSR генотип. S — тип реакции 3-4 балла, MR — тип реакции 1-2 балла, MS — тип реакции X. Прочерки в таблице означают, что образцы не анализировали.

(GenAIEх) (для 999 пермутаций). Дендрограмму генетического сходства между региональными популяциями по вирулентности и микросателлитным локусам строили в пакете программ NTSYSpc 2.21 по индексам F_{RT} и F_{st} . Данные микросателлитного анализа и оценки вирулентности сравнивали с помощью теста Мантеля на основании расстояний между соответствующими матрицами для вирулентности и SSR маркеров (по индексам F_{st} и Nei D).

Результаты. По программе КАСИБ проводится ежегодное эколого-географическое изучение образцов пшеницы в условиях Западной Сибири, Урала и Казахстана. Это позволяет осуществить популяционные исследования возбудителя бурой ржавчины на обширной территории (свыше 1000 км) и едином наборе сортов, тем самым исключив фактор селективного давления растения-хозяина на результаты анализа вирулентности.

С использованием 20 *TcLr*-линий были выявлены 11 фенотипов вирулентности (табл. 1). Фенотипы, идентичные во всех пунктах изучения, обнаружили на сортах Дуэт (PQTKH, av.: *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr15*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*), Терция (TQPTR, av.: *TcLr18*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*), Омская 35 (TGTTR, av.: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*, *TcLr26*), Памяти Азиева (TGTTR), Саратовская 29 (TGTTR), Чебаркульская 3 (CQPKG, av.: *TcLr1*, *TcLr2a*, *TcLr2b*, *TcLr2c*, *TcLr11*, *TcLr15*, *TcLr19*, *TcLr20*, *TcLr24*, *TcLr26*) и на линии Эритросперум 85-08 (THTTR, av.: *TcLr9*, *TcLr19*, *TcLr24*). Российские и североказахстанские изоляты, полученные с образцов Астана 2, Лютесценс 1003 (TGPTR, TGTTR) и Лютесценс 6/04-4 (THPTR, THTTR), различались по вирулентности для *TcLr11*, а с линий ГВК 2074/4 (THTTM, THPTM) и Лютесценс 715 (TGPTM, TGTTM) — для *TcLr18*. Карагандинские изоляты (TGPTR) с сорта Степная 53 отличались от омских и павлодарских (TGTTM) с того же сорта вирулентностью для *TcLr18* и авирулентностью для *TcLr11*. Более существенные различия по спектру вирулентности между географическими популяциями наблюдали на линии Лютесценс 34/08-19 (PQTKH и TQTTR) и на сорте Родник (THTTR, MGTKH, TGTTR). Эти образцы существенно слабее поражались патогеном (Лютесценс 34/08-19 — от 0 до 20 %, Родник — от 10 до 50 %), чем другие изученные (см. табл. 1). Несмотря на некоторые различия между российскими и казахстанскими популяциями, собранными с некоторых образцов пшеницы, в целом мы не наблюдали существенных изменений в спектре вирулентности патогена, обнаруженного на изучаемом материале. Фенотип гриба, выявленный на сорте Чебаркульская 3 (CQPKG), характеризовался 10 аллелями вирулентности, что меньше их числа для фенотипов, идентифицированных на других образцах пшеницы, — от 12 (MGTKH) до 17 (THTTR).

С помощью ПЦР у образцов — источников инфекционного материала идентифицировали гены *Lr26* (ГВК 2074/4, Эритросперум 85-08), *Lr9* и *Lr10* (Дуэт), *Lr9* и *Lr34* (Лютесценс 34/08-19), *Lr26* и *Lr1* (Лютесценс 6/04-4), *Lr10* и *Lr34* (Омская 35), *Lr10* (Памяти Азиева, Саратовская 29, Степная 53), *Lr1* и *Lr10* (Родник), *Lr9* (Терция, Чебаркульская 3). Гены *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr26* и *Lr34* характеризуются как неэффективные в условиях Западной Сибири, Урала и Северного Казахстана (4, 6, 12). При этом их определенные сочетания могут способствовать повышению полевой устойчивости пшеницы (19), что в нашем эксперименте наблюдалось у линии Лютесценс 34/08-19 с генами *Lr9* и *Lr34* (см. табл. 1).

Высокую эффективность в отношении российских и казахстанских популяций патогена (табл. 2) повсеместно имели гены *Lr19* и *Lr24*, тогда

как *Lr3a*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr16*, *Lr17* и *Lr30* были абсолютно неэффективными.

2. Частота (%) изолятов *Puccinia triticina* Erikss., вирулентных для разных TcLr-линий пшеницы, в изученных географических популяциях (2016 год)

Линия Thatcher с Lr-геном	Россия			Казахстан		
	1	2	3	4	5	6
TcLr19, TcLr24	0	0	0	0	0	0
TcLr1	76,9	92,9	100	93,8	100	100
TcLr2a	46,2	85,7	80,0	93,8	87,5	100
TcLr2b	76,9	92,9	80,0	93,8	87,5	100
TcLr2c	76,9	92,9	100	93,8	87,5	100
TcLr9	23,8	14,3	40,0	18,8	12,5	0
TcLr11	76,9	92,9	80,0	50,0	50,0	62,5
TcLr15	46,2	85,7	80,0	93,8	87,5	100
TcLr18	100	78,6	100	100	87,5	100
TcLr20	76,9	92,9	100	93,8	100	100
TcLr26	46,2	21,4	0	12,5	25	25
TcLr3a, TcLr3bg, TcLr3ka, TcLr14a, TcLr14b, TcLr16, TcLr17, TcLr30	100	100	100	100	100	100
Число изолятов	13	28	6	16	16	12

Примечание. 1 — Челябинская область, 2 — Омская область, 3 — Курганская область, 4 — Шортандинская область, 5 — Павлодарская область, 6 — Карагандинская область.

При тестировании на линиях TcLr1, TcLr2a, TcLr2b, TcLr2c, TcLr9, TcLr15, TcLr18, TcLr20, TcLr26 частота вирулентности у изолятов варьировала. Вирулентность для линии с Lr9 выявили в субпопуляциях, собранных на образцах пшеницы с этим геном — Дуэт, Терция, Чебаркульская 3, Лютесценс 34/08-19, с Lr26 — в субпопуляциях с линий ГVK 2074/4, Лютесценс 6/04-4 и Эритроспермум 85-08, несущих ген Lr26. В целом различия между региональными популяциями по частоте проявления вирулентности в отношении линий TcLr9 и TcLr26 определялись представленностью инфекционного материала с растений пшеницы, несущих эти гены. Все изоляты, вирулентные для линий с Lr9, характеризовались авирулентностью для линий с Lr26. Это позволяет предположить, что сочетание генов Lr9 и Lr26 может обеспечить эффективную защиту растений пшеницы от бурой ржавчины, как это наблюдается для комбинации генов Lr19 + Lr26, Lr19 + Lr37 и Lr19 + Lr25 (20). Авирулентность для TcLr20 выявили только у образцов, собранных с сорта Чебаркульская 3. Определенные различия между российскими и казахстанскими популяциями наблюдали по вирулентности для TcLr11: в случае Lr11 вирулентность существенно чаще проявлялась в российских популяциях.



Рис. 1. UPGMA-дендрограмма генетических расстояний между популяциями *Puccinia triticina* Erikss. по вирулентности (А) и SSR маркерам (Б) (по индексу F_{st}).

По индексу Nei D большинство российских и казахстанских популяций характеризовалось высоким сходством (Nei D = 0,02-0,7). Исключо-

чение составили челябинская и карагандинская ($Nei D = 0,12$). Индекс F_{ST} указывал на высокое родство между омскими, курганскими и казахстанскими популяциями. Челябинские популяции были сходны с курганскими и отличались от других изученных (рис. 1, А).

По результатам анализа полиморфизма 12 микросателлитных локусов всего описали 9 генотипов (4 — в челябинской популяции, 4 — в курганской, 7 — в омской, 4 — в павлодарской, 5 — в акмолинской, 2 — в карагандинской) (см. табл. 1). Большинство генотипов встречались в двух популяциях и более, и только два были уникальными (один идентифицировали на линии Лютесценс 715 в омской популяции, другой — на сорте Омская 35 в курганской). Всего обнаружили 21 полиморфный аллель. Для большинства локусов выявили по 2 полиморфных аллеля, за исключением локусов PtSSR55, PtSSR91 и PtSSR164, которые оказались мономорфными (рис. 2, см. online версию статьи на сайте <http://www.agrobiology.ru>). Мы не обнаружили аллелей, специфичных для определенной популяции. Отметим, что наше исследование выполнено на генетическом анализаторе ABI Prism 3500, у которого, в отличие от приборов 4200 DNA Analyzer или 4300 DNA Analyzer («LI-COR», США), использовавшихся с подобной целью другими научными группами (3, 12, 17, 18), пробоподготовка и анализ полностью автоматизированы, что повышает точность определения и сопоставимость результатов (при той же разрешающей способности).

Показатели генетической изменчивости изолятов *P. triticina* по микросателлитным локусам были сходными для всех изученных популяций, за исключением карагандинской, что могло быть обусловлено ее малой представленностью в анализе (4 изолята). Среднее число аллелей на locus (N_a) варьировало от 1,2 в карагандинской популяции до 1,6-1,7 в других изученных, число эффективных аллелей (N_e) — соответственно от 1,1 до 1,3-1,4. Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) была выше ожидаемой (H_e) для челябинской, курганской, павлодарской и омской популяций, что подтверждалось отрицательными значениями индекса фиксации (F). Для карагандинской и акмолинской популяций наблюдали близкие значения H_o и H_e (соответственно 0,06 и 0,07; 0,16 и 0,19). Индекс Шеннона (I) был идентичным для всех популяций (0,3), кроме карагандинской (0,1).

Согласно индексу генетических различий F_{ST} , по SSR маркерам не было различий между большинством изученных популяций, за исключением челябинской и карагандинской ($F_{ST} = 0,21$ $P = 0,003$) (см. рис. 1, Б). Аналогичные результаты получили с использованием $Nei D$ (соответственно 0,01-0,03 и 0,07). Выявленная дифференциация между челябинскими и карагандинскими популяциями может быть обусловлена контрастностью сортов пшеницы, возделываемых в этих двух областях, по *Lr*-генам, географической удаленностью регионов (свыше 1000 км) и региональными различиями климатических условий. В Карагандинской области бурю ржавчину отмечают спорадически в годы, благоприятные для развития патогена. В Челябинской области заболевание встречается практически ежегодно и относится к группе потенциально опасных.

В целом при сравнении российских и казахстанских популяций индексы генетических расстояний указывали на высокое сходство между ними ($Nei D = 0,007$; $F_{ST} = 0,003$; $P = 0,31$), что согласуется с результатами ранее проведенного анализа вирулентности (10, 20). Низкое значение коэффициента генетической дивергенции (F_{ST}) позволяет предположить существование генного потока между изученными популяциями.

Для всех популяций, кроме челябинской, наблюдали близкий характер дифференциации по вирулентности и микросателлитным локусам: со-

гласно тесту Мантеля, при сравнении по Nei D $r = 0,88$ ($P < 0,001$), по индексу F_{st} — $r = 0,43$ ($P < 0,001$). Сходство челябинской популяции с акмолинской и павлодарской по микросателлитным локусам было существенно выше, чем по вирулентности.

Высокое родство между западноазиатскими российскими и североказахстанскими популяциями указывает на существование единой популяции гриба в этих регионах. Такие результаты согласуются с сообщениями других исследователей и данными, полученными нами ранее (4, 10, 12, 21). Имеется несколько предположений о заносе инфекции на запад азиатской России и в Казахстан. В качестве географического препятствия для распространения спор из Европы в Азию рассматриваются Уральские горы, физического — направления воздушных потоков (21). Показано (22), что 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. Подтверждением могут служить эпифитотии болезни в Западной Сибири и на Урале на фоне ее депрессии на Северном Кавказе (21, 22), а также отсутствие изолятов с вирулентностью для форм с *Lr9* в северокавказских популяциях (23) при высокой представленности в азиатских.

Согласно мнению других исследователей, эпифитотийное развитие бурой ржавчины в Западной Сибири и Северном Казахстане происходит только при заносе инфекции из южных или юго-западных районов европейской части России (24). Не исключен перенос патогена с посевов Среднего Поволжья и западных районов Казахстана (24, 25). При этом наряду с экзогенной инфекцией в Западной Сибири имеются ее собственные, независимые от европейских источники (21, 22, 24). Произрастание в регионе промежуточного растения-хозяина *Isoopyrum fumarioides* может способствовать развитию возбудителя по полному циклу. Сообщается (26) о более высокой пластичности формы гриба *P. triticina*, приуроченной к виду *I. fumarioides*, по сравнению с той, которая поражает *Thalictrum* spp., что повышает конкурентоспособность местных изолятов. Источником инфекции для Северного Казахстана могут служить пораженные посевы озимой и яровой пшеницы на западе республики и в сопредельных областях России. За счет преобладания западных ветров в период вегетации культуры создаются благоприятные условия для воздушного заноса инфекции (27). По другим данным (12, 28), заражение яровой пшеницы в Северном Казахстане происходит при переносе спор воздушными потоками из южной части республики с возделываемой в этом регионе озимой пшеницы из-за отсутствия географических барьеров между севером и югом Казахстана.

Таким образом, с использованием методического подхода, позволяющего снизить влияние растения-хозяина на результаты анализа вирулентности возбудителя бурой ржавчины, нами показано высокое сходство популяций *Puccinia triticina* Erikss. на Урале, в Западной Сибири и Северном Казахстане. Этим подтверждается предположение о существовании единой популяции патогена на указанной территории. Для предотвращения эпифитотий *Puccinia triticina* на сопредельной территории России и Казахстана рекомендуется постоянно обновлять сортимент сортов пшеницы, расширять его генетическое разнообразие и применять мозаичное размещение сортов с соблюдением оптимальных площадей, занятых генетически однородными сортами.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ защиты растений,
196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: eigulyaeva@gmail.com ✉, eshaydayuk@bk.ru;

²ФГБОУ ВО Омский государственный аграрный
университет им. П.А. Столыпина,
644122 Россия, г. Омск, Институтская площадь, 1,
e-mail: vp.shamanin@omgau.org;

³International Maize and Wheat Improvement Center
(CIMMYT),

Р.К. 39, Емек, 06511, Ankara, Turkey,
e-mail: aigkur@gmail.com, a.morgounov@cgiar.org;

⁴ФГБНУ Челябинский НИИ сельского хозяйства,
456404 Россия, Челябинская обл., Чебаркульский р-н,
п. Тимирязевский,
e-mail: chniisx2@mail.ru, shreyder11@mail.ru;

⁵ООО Агрокомплекс «Кургансемена»,
640000 Россия, г. Курган, ул. Володарского, 57-203,
e-mail: irfom45@mail.ru;

⁶ТОО Павлодарский НИИСХ,
140000 Республика Казахстан, Павлодарская обл.,
п. Красноармейка, ул. 60 лет Октября, 32,
e-mail: selektion2011@mail.ru;

⁷ТОО Карагандинский НИИ растениеводства
и селекции,
110435 Республика Казахстан, Карагандинская обл.,
Бухар-Жырауский р-н, с. Центральное,
e-mail: 12345680@bk.ru

Поступила в редакцию
29 июня 2017 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2018, V. 53, № 1, pp. 85-95

GENETIC STRUCTURE OF RUSSIAN AND KAZAKHSTANI LEAF RUST CAUSATIVE AGENT *Puccinia triticina* Erikss. POPULATIONS AS ASSESSED BY VIRULENCE PROFILES AND SSR MARKERS

E.I. Gulyaeva¹, E.L. Shaydayuk¹, V.P. Shamanin², A.K. Akhmetova³, V.A. Tyunin⁴,
E.R. Shreyder⁴, I.V. Kashina⁵, L.A. Eroshenko⁶, G.A. Sereda⁷, A.I. Morgunov³

¹All-Russian Research Institute of Plant Protection, Federal Agency for Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail eigulyaeva@gmail.com (✉ corresponding author), eshaydayuk@bk.ru;

²Stolyipin Omsk State Agricultural University, 1, Institutskaya pl., Omsk, 644008 Russia, e-mail vp.shamanin@omgau.org;

³International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT), P.K. 39, Emek, 06511, Ankara, Turkey, e-mail aigkur@gmail.com, a.morgounov@cgiar.org;

⁴Chelyabinsk Research Institute of Agriculture, Federal Agency for Scientific Organizations, p. Timiryazevskii, Chebarkul Region, Chebarkul Province, 456404 Russia, e-mail chniisx2@mail.ru, shreyder11@mail.ru;

⁵ООО Агрокомплекс Кургансемена, 57-203, ул. Володарского, Курган, 640000 Russia, e-mail irfom45@mail.ru;

⁶Pavlodar Research Institute of Agriculture, 32, ul. 60 let Oktyabrya, p. Krasnoarmeika, Pavlodar Province, 140000 Republic of Kazakhstan, e-mail selektion2011@mail.ru;

⁷Karaganda Research Institute of Plant Growing and Breeding, s. Tsentralnoe, Bukhar-Zhyrauskii Region, Karaganda Province, 110435 Republic of Kazakhstan, e-mail 12345680@bk.ru

ORCID:

Gulyaeva E.I. orcid.org/0000-0001-7948-0307

Shaydayuk E.L. orcid.org/0000-0003-3266-6272

Shamanin V.P. orcid.org/0000-0003-4767-9957

Akhmetova A.K. orcid.org/0000-0003-2957-8239

Tyunin V.A. orcid.org/0000-0002-3609-0488

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (project № 14-26-00067 for molecular genetic characterization of the pathogen and project № 16-16-10005 for identification of wheat resistance genes using PCR markers)

Received June 29, 2017

Shreyder E.R. orcid.org/0000-0001-6094-962x

Kashina I.V. orcid.org/0000-0001-6753-7855

Eroshenko L.A. orcid.org/0000-0001-5722-1507

Sereda G.A. orcid.org/0000-0002-0593-5839

Morgunov A.I. orcid.org/0000-0001-7082-5655

doi: 10.15389/agrobiology.2018.1.85eng

Abstract

Leaf rust caused by *Puccinia triticina* Erikss is an economically significant disease of spring wheat in the West-Asian Russia and Northern Kazakhstan. Successful wheat breeding for leaf rust resistance necessitates characterization of *Lr* gene effectiveness, the impact of new wheat varieties on the pathogen virulence, and isolation between populations of *P. triticina*. Until now, nobody used a uniform infectious material in *P. triticina* population study, as it was collected from a different set of varieties in each region. Thence, the virulence assessment data were significantly influenced by the

effects of host plants. We were the first to compare the structure of *P. triticina* populations in the West-Asian Russia and Northern Kazakhstan on virulent and molecular genetic properties, using as a source of infectious material a single set of the wheat samples dated 2016 that were tested there within the framework of the Kazakhstan-Siberian Spring Wheat Improvement Network Program (KA-SIB). Ninety one single-pustule isolates have been tested in the virulence analysis, including 13 isolates from Chelyabinsk, 28 from Omsk, 6 from Kurgan, 16 from Akmolinskaya, 16 from Pavlodarskaya, and 12 from Karagandinskaya provinces. Eleven phenotypes of virulence have been identified with the use of 20 isogenic Thatcher lines with *Lr* genes (*TcLr*). The similar phenotypes were found on cultivars Duet, Tertsia, Omskaya 35, Pamyati Azieva, Saratovskaya 29, Chebarkulskaya 3 and line Eritrosperum 85-08. The Russian pathotypes found on variety Astana and lines Lutescens 1003 and Lutescens 6/04-4 differed from Kazakhstan ones in virulence to *TcLr11*, and those colonizing variety GVK 2074/4 and line Lutescens 715 differed in avirulence to *TcLr18*. More significant differences in the virulence rang between regional populations have been observed on the line Lutescens 34/08-1 and the variety Rodnik. All studied *P. triticina* isolates were avirulent to *TcLr19*, *TcLr24* and virulent to *TcLr3a*, *TcLr3bg*, *TcLr3ka*, *TcLr14a*, *TcLr14b*, *TcLr16*, *TcLr17*, *TcLr30*. The variation in virulence frequencies was observed on the wheat lines with the genes *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr9*, *Lr15*, *Lr18*, *Lr20*, and *Lr26*. Virulence to *Lr9* was found in the pathogen populations collected from the wheat samples Duet, Tertsia, Chebarkulskaya 3, Lutescens 34/08-19 carrying this gene. The differences in populations on virulence were found using the indices of genetic distances Nei D and Fst, the analog for binary data in AMOVA. The Nei index values indicated a high similarity between the majority of the Northern-Kazakhstani and Russian populations, except of those from Chelyabinskaya and Karagandinskaya provinces. According to the Fst index, the high similarity was found between the populations from Omsk, Kurgan and Northern Kazakhstan. The Chelyabinsk population appeared to be close to the Kurgan but varied from others. In the test, a total of 46 isolates and 9 genotypes have been identified using 12 SSR markers. In this, 21 polymorphic alleles were found in the studied set. The Nei and Fst indices revealed the moderate differences between the Chelyabinsk and Karaganda populations and a high similarity between other populations studied. The current survey defined the high similarity of leaf rust pathogen populations in West-Asian Russia and Northern Kazakhstan, assuming the existence of a single fungus population in the studied territories. In order to prevent the *P. triticina* epiphytotic on the adjacent territories of Russia and Kazakhstan, the constant updating of wheat varieties and higher genetic diversity are strongly recommended. In addition, the varieties should be grown according to the «mosaic distribution» scheme using optimal areas for genetically homogeneous varieties.

Keywords: *Puccinia triticina* Erikss., leaf rust, common wheat, populations, virulence, *Lr*-genes, SSR markers.

REFERENCES

1. Shamanin V.P., Petukhovskii S.L. *Vestnik Omskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2012, 4(8): 4-9 (in Russ.).
2. Belan I.A., Rosseeva L.P., Meshkova L.V., Blokhina N.P., Pershina L.A., Trubocheeva N.V. *Vestnik Altaiskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2017, 1(147): 5-14 (in Russ.).
3. Koishybaev M. *Zashchita i karantin rastenii*, 2015, 9: 21-26 (in Russ.).
4. Kolmer J.A., Kابدulova M.G., Mustafina M.A., Zhemchuzhina N.S., Dubovoy V. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. *Plant Pathol.*, 2015, 64(2): 328-336 (doi: 10.1111/ppa.12248).
5. Shamanin V., Salina E., Wanyera R., Zelenskiy Y., Olivera P., Morgounov A. Genetic diversity of spring wheat from Kazakhstan and Russia for resistance to stem rust Ug99. *Euphytica*, 2016, 121(2): 287-296 (doi: 10.1007/s10681-016-1769-0).
6. Tyunin V.A., Shreider E.R., Gul'tyaeva E.I., Shaidayuk E.L. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*. 2017, 21(5): 523-529 (doi: 10.18699/VJ17.269) (in Russ.).
7. D'yakov Yu.T. *Populyatsionnaya biologiya fitopatogennykh gribov* [Population biology of phytopathogenic fungi]. Moscow, 1998 (in Russ.).
8. Kolmer J.A., Hanzalova A., Goyeau H., Bayles R., Morgounov A. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathol.*, 2013, 62: 21-31 (doi: 10.1111/j.1365-3059.2012.02626.x).
9. McCallum B., Ceto-Coh P., Xue A. Physiologic specialization of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust, in Canada in 2010. *Can. J. Plant Pathol.*, 2016, 38(4): 440-447 (doi: 10.1080/07060661.2016.1261047).
10. Gul'tyaeva E.I., Aristova M.K., Shaidayuk E.L., Kazartsev I.A. *Mikologiya i fitopatologiya*, 2017, 51(1): 54-59 (in Russ.).
11. Kolmer J. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests*, 2013, 4(1): 70-84 (doi: 10.3390/f4010070).
12. Kolmer J.A., Ordocez M.E. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. *Phytopathology*, 2007, 97(9): 1141-1149 (doi: 10.1094/PHYTO-97-9-1141).

13. Mikhailova L.A., Gul'tyaeva E.I., Mironenko N.V. *Metody issledovaniy struktury populyatsii vzbuditelya buroi rzhavchiny pshenitsy Puccinia recondita Rob. ex Desm. f. sp. tritici* [Methods for studying structure of populations of the causative agent of wheat brown rust *Puccinia recondita Rob. ex Desm. f. sp. tritici*]. St. Petersburg, 2000 (in Russ.).
14. McIntosh R.A., Wellings C.R., Park R.F. *Wheat rusts. An atlas of resistance genes*. Plant Breeding Institute, University of Sydney, CSIRO, Australia, 1995.
15. Long D.L., Kolmer J.A. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 1989, 79(5): 525-529.
16. Justesen A.F., Ridout C.J., Hovmüller M.S. The recent history of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Denmark as revealed by disease incidence and AFLP markers. *Plant Pathol.*, 2002, 51: 13-23 (doi: 10.1046/j.0032-0862.2001.00651.x).
17. Duan X., Enjalbert J., Vautrin D., Solignac M., Giraud T. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. *Mol. Ecol. Notes*, 2003, 3(1): 65-67 (doi: 10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x)
18. Szabo L.S., Kolmer J.A. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina*. *Mol. Ecol. Notes*, 2007, 7(4): 708-710 (doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01686.x)
19. Serfling A., Krämer I., Lind V., Schliephake E., Ordon F. Diagnostic value of molecular markers for Lr genes and characterization of leaf rust resistance of German winter wheat cultivars with regard to the stability of vertical resistance. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2011, 130(4): 559-575 (doi: 10.1007/s10658-011-9778-2).
20. Sibikeev S.N., Markelova T.S., Druzhin A.E., Vedeneva M.L., Singkh D. *Doklady RASKHN*, 2011, 2: 3-5 (in Russ.).
21. Mikhailova L.A. *Genetika vzaimootnoshenii vzbuditelya buroi rzhavchiny i pshenitsy* /Pod redaktsiei M.M. Levitina [Genetics of the relationship between the causative agent of brown rust and wheat plants. M.M. Levitin (ed.)]. St. Petersburg, 2006 (in Russ.).
22. Pavlova T.V., Mikhailova L.A. *Mikologiya i fitopatologiya*, 1997, 31(5): 60-66 (in Russ.).
23. Volkova G.V. *Zashchita i karantin rastenii*, 2010, 9: 13-17 (in Russ.).
24. Berlyand-Kozhevnikov V.M., Dmitriev A.P., Budashkina E.B., Shitova I.T., Reiter V.G. *Ustoichivost' pshenitsy k buroi rzhavchine (geneticheskoe raznoobrazie populyatsii griba i rasteniya-khozyaina)* [Wheat resistance to brown rust (genetic diversity of populations of fungus and host plants)]. Novosibirsk, 1978 (in Russ.).
25. Lebedev V.B. *Rzhavchina pshenitsy v Nizhnem Povolzh'e* [Wheat rust disease in the Lower Volga Region]. Saratov, 1998 (in Russ.).
26. Sorokina G.K. *Dinamika rasovogo sostava i spetsializatsiya vzbuditelya buroi rzhavchiny pshenitsy (Puccinia recondita Rob. ex Desm. f. sp. tritici Erikss. et Henn.) na territorii evropeiskoi chasti SSSR. Avtoreferat kandidatskoi dissertatsii* [Dynamics of race composition and specialization of causative agent of wheat brown rust (*Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* Erikss. et Henn.) on the territory of the European part of the USSR. PhD Thesis]. Moscow, 1978 (in Russ.).
27. Turapin V.P., Mostovoi V.A. *Rzhavchinnye bolezni zernovykh kul'tur v Respublike Kazakhstan i bor'ba s nimi* [Rust diseases of grain crops and phytopathological control in the Republic of Kazakhstan]. Almaty, 1995 (in Russ.).
28. Koishibaev M.K. *Bolezni zernovykh kul'tur: simptomy, rasprostranenie i vredonosnost', spetsializatsiya, biologicheskie osobennosti, struktura populyatsii vzbuditelei i integriruvannaya zashchita posevov* [Diseases of cereal crops: symptoms, occurrence and harmfulness, specialization, biological features of pathogens and the structure of populations, integrated crop protection]. Almaty, 2002 (in Russ.).