






 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23

Оригинальное исследование

## Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, существующих на мягкой пшенице в Поволжском и Центральном регионах России, по микросателлитным локусам

Е.С. Сколотнева <sup>1</sup>, Ю.В. Лаприна<sup>1</sup>, О.А. Баранова <sup>2</sup>, Т.М. Коломиец <sup>3</sup>, М.И. Киселева<sup>3</sup>, В.Н. Кельбин <sup>1</sup>, Е.А. Салина <sup>1</sup>

**Аннотация:** Для эффективной селекции пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине необходимо исследование популяций гриба, циркулирующих на посевах в конкретном регионе. Выявление вероятных источников инфекции возможно в результате отслеживания основных путей миграции спор патогена по всей территории возделывания пшеницы в пределах одной климатической зоны. Для ускоренного анализа и охвата большей выборки образцов предложено использовать микросателлитные маркеры, представляющие альтернативу традиционному фитопатологическому анализу состава генов вирулентности популяции. С их помощью проведено генотипирование монопустьных изолятов *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, собранных в Центральном регионе России и Поволжье на мягкой яровой пшенице, установлена высокая степень дифференциации между популяциями патогена. Предложена схема диагностики происхождения инфекции с помощью шкалы размеров аллелей микросателлитных маркеров.

**Ключевые слова:** возбудитель стеблевой ржавчины; микросателлитные локусы; мягкая яровая пшеница; Поволжье; Центральный регион России.

**Для цитирования:** Сколотнева Е.С., Лаприна Ю.В., Баранова О.А., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Кельбин В.Н., Салина Е.А. Характеристика популяций *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, существующих на мягкой пшенице в Поволжском и Центральном регионах России, по микросателлитным локусам. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2023;9(4):201-208. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23

**Благодарности:** Образцы инфекции из Центрального региона России любезно предоставлены сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии (ФГБНУ ВНИИФ), образцы инфекции из Поволжья – сотрудниками Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений (ФГБНУ ВИЗР). Паспортизация штаммов возбудителя стеблевой ржавчины с помощью SSR-генотипирования проведена при поддержке гранта РНФ 23-16-00119.

Original article

## Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on bread spring wheat of the Volga region and the Central region of Russia by microsatellite loci

Е.С. Skolotneva <sup>1</sup>, Y.V. Laprina<sup>1</sup>, O.A. Baranova <sup>2</sup>, T.M. Kolomiets <sup>3</sup>, M.I. Kiseleva<sup>3</sup>, V.N. Kelbin <sup>1</sup>, E.A. Salina <sup>1</sup>

**Abstract:** Effective breeding for wheat immunity to stem rust is preceded by the study of fungal races circulating on crops in a particular region. In addition, to identify possible sources of infection, it is necessary to track the main routes of migration of pathogen spores throughout the wheat cultivation area within the same climatic zone. To speed up results and process a large sample, it is proposed to

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия  
Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Пушкин, Россия  
All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Pushkin, Russia

<sup>3</sup> Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Московская обл., Россия  
All-Russian Institute of Phytopathology, Moscow region, Russia

 sk-ska@yandex.ru

© Сколотнева Е.С., Лаприна Ю.В., Баранова О.А., Коломиец Т.М., Киселева М.И., Кельбин В.Н., Салина Е.А., 2023

use microsatellite markers, which are an alternative to traditional phytopathological analysis of virulence genes in population. Single pustule isolates of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* from bread spring wheat of the Volga region and the central region of Russia were genotyped and high degree of differentiation between the pathogen populations was revealed. A scheme for diagnosing the origin of infection using a scale for the size of alleles of microsatellite markers is proposed

**Key words:** stem rust pathogen; microsatellite loci; soft spring wheat; Volga region; Central region of Russia.

**For citation:** Skolotneva E.S., Laprina Y.V., Baranova O.A., Kolomiets T.M., Kiseleva M.I., Kelbin V.N., Salina E.A. Characteristics of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on bread spring wheat of the Volga region and the Central region of Russia by microsatellite loci. *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2023;9(4):201-208. DOI 10.18699/LettersVJ-2023-9-23 (in Russian)

**Acknowledgements:** Infection samples from the Central region of Russia were kindly provided by employees of the All-Russian Research Institute of Phytopathology, infection samples from the Volga region by employees of the All-Russian Research Institute of Plant Protection. Certification of stem rust pathogen strains using SSR genotyping was supported by the Russian Science Foundation grant 23-16-00119.

## Введение

Стеблевая ржавчина пшеницы, возбудителем которой служит гриб *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, за последние два десятилетия вошла в десятку заболеваний, отличающихся экономической значимостью. Исследование причин повсеместного повышения интенсивности болезни представляет теоретический и практический интерес (Dean et al., 2012; Rsaliev A.S., Rsaliev S.S., 2018). В отдельных регионах Российской Федерации отмечено регулярное проявление стеблевой ржавчины на мягкой пшенице, имеющей местный источник происхождения инфекции. Так, в 2010 г. значительное поражение посевов культуры наблюдалось в Северо-Кавказском и Поволжском регионах (Синяк, Волкова, 2015). Также в 2010 г. выявлена вспышка заболевания в Центральном регионе Российской Федерации, которая повторилась в 2013 и 2016 гг. (Larochkina et al., 2017). В 2016 г. на посевах яровой мягкой пшеницы в период колошения на всей территории Республики Татарстан отмечено сильнейшее распространение стеблевой ржавчины. Все сорта пшеницы, рекомендованные для возделывания в Татарстане, были восприимчивы, кроме сортов Тулайковская 5 и Белка (Василова и др., 2017). В Саратовской области, особенно в правобережной ее части, в 2016 г. эпифитотия стеблевой ржавчины проявилась на растениях в фазе молочной спелости зерна (начало июля) и продолжалась до полного созревания и уборки. Степень развития болезни достигала 80 %, средние потери урожая по пораженным сортам пшеницы составили 50 % (Сибикеев, неопубликованные данные).

Основные способы борьбы с этой типичной для пшеницы грибной болезнью включают применение химических средств защиты и устойчивых сортов. Однако первый метод может нанести вред экологии и здоровью людей, кроме того, является дорогостоящим и не всегда дает ожидаемые результаты (Шаманин и др., 2015). В связи с этим использование в производстве устойчивых сортов пшеницы наиболее предпочтительно. Известно, что из-за генетической изменчивости гриба возможно появление новых вирулентных рас, способных заражать ранее устойчивые сорта. Помимо этого, существует вероятность заноса агрессивной расы из другого региона возделывания пшеницы, поскольку споры способны перемещаться на огромные расстояния за небольшие промежутки времени при помощи циклонических масс. Для снижения потенциального вреда стеблевой ржавчины актуальна селекция сортов пшеницы, имеющих разно-

образную генетическую основу. Для селекции необходимо предварительное исследование рас гриба, циркулирующих на посевах в конкретном регионе. Кроме того, отслеживание основных путей миграции спор патогена на территории страны позволит выявить возможные источники инфекции. Для решения этой задачи традиционно прибегают к фитопатологическому анализу состава генов вирулентности у монопостульных изолятов патогена (single pustule isolate). Так, европейская популяция гриба на мягкой пшенице подвергается регулярному мониторингу с помощью маркеров вирулентности (Skolotneva et al., 2013; Сколотнева и др., 2020; Baranova et al., 2021). Альтернативным методом, позволяющим решить поставленные задачи быстрее и охватить выборку большего объема, может стать генотипирование образцов региональных популяций стеблевой ржавчины. Для этого необходимо подобрать молекулярно-генетические маркеры, которые смогут охарактеризовать выборки из различных популяций гриба.

Микросателлитные локусы (SSR, simple sequence repeats, повторы простых последовательностей) – участки ДНК, состоящие из тандемов повторяющихся единиц моно-, ди-, три-, тетра- или пентануклеотидов (Powell et al., 1996). Микросателлиты присутствуют в кодирующих и некодирующих областях ядерного генома, а также в хлоропластном и митохондриальном геномах (Chung et al., 2006). У ржавчинных грибов микросателлитные локусы распределены по хромосомам ядерного генома (Anderson et al., 2016). К причинам разнообразия количества повторов единиц микросателлитов в геноме относятся проскальзывание полимеразы во время репликации ДНК и/или несоответствующий кроссинговер, несовпадение/восстановление повреждений двойной нити ДНК, а также перемещения ретротранспозонов. Эти вариации приводят к полиморфизму по длине фрагментов, выявляемых при электрофорезе (Kalia et al., 2011). В настоящее время данный тип ДНК-маркеров становится все более популярным за счет ряда важных свойств, таких как гипервариабельность, мультялельная природа, кодоминантное наследование, высокая воспроизводимость, относительное обилие, экстенсивное распределение по геному, высокая пропускная способность и податливость автоматизации процесса. Праймеры ПЦР, разработанные для SSR в пределах одного вида, используются для амплификации соответствующего локуса у родственных видов, что позволяет проводить сравнительный геномный анализ

близкородственных видов, а также изучать филогенетические взаимоотношения близкородственных таксонов и исследовать популяционную структуру организмов с высокой генетической изменчивостью (Asad et al., 2012; Karaoglu et al., 2013). У дикариотических организмов, к которым относится возбудитель ржавчины злаков, кодоминантные маркеры, такие как SSR, более информативны для выявления генетических вариаций по сравнению с доминантными маркерами (Selkoe, Toonen, 2006).

Принимая во внимание актуальность регулярного проведения работ по изучению генетической структуры центрально-европейской популяции возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы, цель исследования заключалась в проведении SSR-генотипирования монопустьных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона России и Поволжья, а также в анализе распределения локусов в популяциях, существующих на мягкой яровой пшенице.

## Материал и методы

Материалом исследования служили образцы спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранные на посевах восприимчивых сортов пшеницы в 2019 г. в питомнике ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии» (Московская область, Центральный регион) и в с. Широкий Карамыш Лысогорского района Саратовской области в Поволжье. Последние образцы урединиоспор были любезно предоставлены нам сотрудниками ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений». Из образцов популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* выделены 110 и 22 монопустьных изолята (протоколы Всемирного справочного центра ржавчины (Global Rust Reference Center); Rsaliyev A.S., Rsaliyev S.S., 2018). Экстракцию ДНК из спорных навесок массой около 2 мг проводили с использованием модифицированного метода экстракции СТАВ (Michiels et al., 2003). Амплификация тринуклеотидных SSR ДНК-матриц осуществлена с помощью набора из 16 праймеров, разработанных специально для *P. graminis* f. sp. *tritici* (Zhong et al., 2009; Berlin et al., 2017) (табл. 1). Состав реакционной смеси был следующий: ДНК в концентрации 20 нг/мкл, 1.3 мкл буфера (67 mM Tris-HCl pH 8.8, 18 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % Tween 20), 1 ед/мкл ДНК-полимеразы HS-Taq, 1.3 нМ прямого праймера с хвостом M13, 1.3 нМ обратного праймера, 0.54 mM dNTP, 30 pM флюороформ-M13 (FAM) и стерильная деионизированная вода объемом до 13 мкл. Амплификацию осуществляли по протоколу Touchdown: 95 °C – 5 мин, 12 циклов с постепенным понижением температуры отжига праймеров на 0.5 °C/цикл (95 °C – 30 с, 63 °C – 90 с, 72 °C – 30 с), затем 23 цикла (95 °C – 30 с, 57 °C – 90 с, 72 °C – 30 с) и 72 °C в течение 10 мин. Фрагментный анализ амплифицированной ДНК выполнен с помощью генетического анализатора ABI 3130XL GeneticAnalyzer (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» СО РАН (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия). Полученные результаты проанализированы с использованием программы Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems, США).

**Обработка данных.** Анализ частоты аллелей SSR-локусов патогенных популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона и Поволжья проведен с помощью программы

GenAlEx6.4 (Peakall, Smouse, 2012). Были рассчитаны  $H_0$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга. Наблюдаемая гетерозиготность вычислена для каждого SSR-маркера и представляла собой долю образцов, гетерозиготных по локусу. Коэффициент инбридинга рассчитан с использованием уравнения  $F_{IS} = (\text{среднее значение } H_0 - \text{среднее значение } H_e) / \text{среднее значение } H_e$ .

Построение дендрограмм для определения филогенетических взаимоотношений между изолятами *P. graminis* f. sp. *tritici* выполнено методом UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean, метод попарного внутригруппового невзвешенного среднего) в программе PAST v. 4.05 (Hammer et al., 2001). Корреляция матриц вычислена с помощью программы VAT (Kosman et al., 2008). Для кластерного анализа SSR-полиморфизма внутри и между популяциями *P. graminis* f. sp. *tritici* использована программа Structure (Evanno et al., 2005), основанная на байесовском алгоритме. Предполагаемое число кластеров посчитано при помощи веб-программы Structure Harvester (Earl, vonHoldt, 2012).

## Результаты

Обработка данных SSR-генотипирования монопустьных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* позволила охарактеризовать образцы географических популяций гриба из Центрального региона России и Поволжья. Показано, что количество аллелей для разных SSR-локусов в двух популяциях варьирует от 1 до 6 (табл. 2).

В популяции Центрального региона  $H_0$  и  $H_e$  статистически значимо не отличаются только в случае локуса Pgestssr024, а для шести локусов гетерозиготность равна нулю. В популяции Поволжья  $H_0$  и  $H_e$  статистически значимо не отличаются для трех локусов (Pgestssr024, Pgestssr142, PgtGAA8), а гетерозиготность равна нулю в пяти случаях. Во всех остальных случаях для двух популяций  $H_0$  значительно выше, чем  $H_e$ , что указывает на избыток гетерозигот. Частоты аллелей исследованных локусов не были близки к равновесию Харди – Вайнберга (все значения  $F_{IS}$  отличны от нуля), ближе всех к нулю находится PgtGAA8. Индекс фиксации  $F_{IS}$  имеет отрицательные значения для всех остальных локусов (кроме PgtGAA8), что служит еще одним индикатором смещения генетического равновесия в данных группах в сторону избытка гетерозигот. Вероятно, популяции поддерживаются (существуют) за счет клонового размножения. Данное предположение снижает значение полового процесса для генетической изменчивости популяций *P. graminis* f. sp. *tritici*, но не отвергает его формообразующей роли в изучаемых регионах, что показано ранее (Skolotneva et al., 2013). Действительно, половая рекомбинация присутствует в жизненном цикле патогена поздней весной или ранним летом на промежуточном хозяине барбарисе, после чего следует многократная серия бесполой размножений на пшенице.

Групповое сравнение SSR-генотипов с помощью построения филогенетических деревьев позволяет более наглядно оценить влияние фактора обмена спорами на формирование структуры каждой географической популяции (рис. 1). Можно выделить два основных кластера в соответствии с географией происхождения материала. Кластер Поволжья

**Таблица 1.** Нуклеотидные последовательности праймеров на микросателлитные маркеры (Szabo, 2007; Zhong et al., 2009)  
**Table 1.** Nucleotide sequences of primers for microsatellite markers (Szabo, 2007; Zhong et al., 2009)

| Название локуса | Последовательность нуклеотидов праймера (5'–3') | Диапазон размеров амплифицированных фрагментов, п.н. |
|-----------------|---|--|
| Pgestssr021     | GTTTGCCTGATGATGGATGA                            | 187–193  |
|                 | CCGAATGCAGATTACCCCTTG                           |  |
| Pgestssr024     | TCATCGACCAAGAGCATCAG                            | 259–274  |
|                 | TTCGGGAGTGAGTCTCTGCT                            |  |
| Pgestssr059     | ATTATGCGGGACAAATCGAG                            | 210–234  |
|                 | AGGTTGATGATGGAGGATGC                            |  |
| Pgestssr109     | CCATCCGATCATTCTTCGT                             | 232–235  |
|                 | CCGACCTTCTCTTGCTTCTG                            |  |
| Pgestssr142     | CCACCAACAAACCAACAAGA                            | 167–179  |
|                 | GATGGTGAAGTCCGGTATGG                            |  |
| Pgestssr173     | TCCCTTGACCTTTCTCAACG                            | 173–206  |
|                 | TCCATTGAGTTCATCGTGA                             |  |
| Pgestssr227     | CACACGTCTCGAGGAACAGA                            | 176–218  |
|                 | CTCGTGGGATGAAGTCCATT                            |  |
| Pgestssr293     | GAACCTTGGCCTGAGTGCTA                            | 257–269  |
|                 | GCAGCCTACAGCAAGAATCC                            |  |
| Pgestssr325     | TTGGGTGAGTCAGAGTTGAGA                           | 247–262  |
|                 | CCCACCCACTCTCAGTCAAT                            |  |
| Pgestssr353     | TCGAATCCCAAGGAACAGAG                            | 140–152  |
|                 | ACGTCTTGGGTTTCTGTGGA                            |  |
| Pgestssr318     | ACAGACACTCCCGAGCTCAT                            | 198–228  |
|                 | GATGTCGGTCTTGGTCCACT                            |  |
| PgtCAA53        | AGGCTAACACCACCCATAC                             | 201–213  |
|                 | AGGAGGAGGTGAAGGGGATA                            |  |
| PgtCAA80        | GCCTCCAGACGAATGGTTTA                            | 189–198  |
|                 | TTGGTGATGATGATGGTTGG                            |  |
| PgtCAA93        | CACTCTCGCCAAACCTCATT                            | 275–293  |
|                 | CGCCTGTGATGGTTGTATTG                            |  |
| PgtCAA98        | ATTCCGATGGTCCGTTACTG                            | 202–250  |
|                 | CCATCCCACTCAAATCATCC                            |  |
| PgtGAA8         | GGATGATCGGTGAGTTGGTT                            | 129–159  |
|                 | TGCTGCCTGTCTGCGAAC                              |  |

имеет более сложную структуру, чем кластер Центрального региона. Очевидно, заноса спор из одного региона в другой не происходит, эти популяции изолированы друг от друга долгое время. Эти выводы полностью подтверждены результатами кластерного анализа, осуществленного в программе Structure. При анализе генотипических кластеров в программах Structure и Structure Harvester четко выявлены три кластера. Образцы Центрального региона разделились на два кластера, причем первый дополнительно делился на два субкластера. Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что эти две популяции имеют независимое происхождение. Среди возможных объяснений

могут быть экологические особенности исследуемых районов. В силу различий в составе высеваемых (районируемых) сортов пшеницы генетическая структура популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* также будет зависеть от генотипов растений-хозяев и их частоты в посевах. Однако следует учесть, что ДНК-полиморфизм внутри и между популяциями гриба выявлен с помощью селективно нейтральных SSR-маркеров. Это позволяет оценить степень обмена инфекционным материалом. Кластерный анализ данных демонстрирует отсутствие контакта между популяциями, локализованными в обозначенных регионах, которые разделяют более 400 км (крайние точки сбора образцов популяции). Помимо зна-

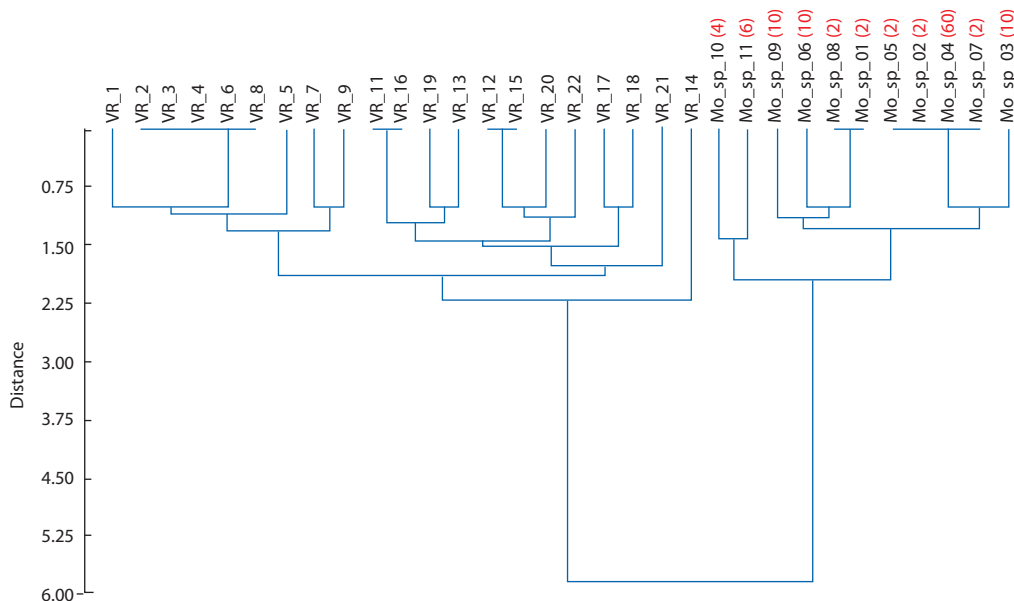
**Таблица 2.** Характеристика SSR-маркеров, полученная при помощи программы GenAlEx6.4 (Peakall, Smouse, 2012)  
**Table 2.** Characteristics of SSR markers obtained using the GenAlEx6.4 program (Peakall, Smouse, 2012)

| Локус       | Популяция 1 |       |       |          | Популяция 2 |       |       |          |
|-------------|-------------|-------|-------|----------|-------------|-------|-------|----------|
|             | Na          | $H_0$ | $H_e$ | $F_{IS}$ | Na          | $H_0$ | $H_e$ | $F_{IS}$ |
| Pgestssr021 | 2           | 0.82  | 0.50  | -0.64    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     |
| Pgestssr024 | 2           | 0.09  | 0.09  | -0.05    | 2           | 0.43  | 0.34  | -0,27    |
| Pgestssr059 | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     |
| Pgestssr109 | 2           | 0.78  | 0.48  | -0.64    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     |
| Pgestssr142 | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 2           | 0.43  | 0.34  | -0.27    |
| Pgestssr173 | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 2           | 0.95  | 0.50  | -0.91    |
| Pgestssr227 | 4           | 0.91  | 0.58  | -0.56    | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    |
| Pgestssr293 | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    |
| Pgestssr325 | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    |
| Pgestssr353 | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    |
| Pgestssr318 | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    |
| PgtCAA53    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     |
| PgtCAA80    | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     |
| PgtCAA93    | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 2           | 0.81  | 0.48  | -0.68    |
| PgtCAA98    | 2           | 1.00  | 0.50  | -1.00    | 3           | 0.67  | 0.46  | -0.45    |
| PgtGAA8     | 1           | 0.00  | 0.00  | #Н/Д     | 3           | 0.33  | 0.39  | 0.15     |

Примечание. Популяция 1 – 110 образцов спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранных на восприимчивых сортах пшеницы в 2019 г. в Центральном регионе европейской части страны; популяция 2 – 22 образца спор *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранных в 2019 г. в Поволжье. Na – количество аллелей на локус,  $H_0$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность (доля образцов, которая ожидается быть гетерозиготной при случайном спаривании), #Н/Д – нет данных,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга.  $F_{IS} = (\text{среднее значение } H_0 - \text{среднее значение } H_e) / \text{среднее значение } H_e$

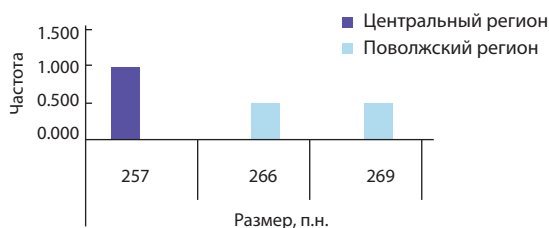
**Таблица 3.** Размеры ампликонов микросателлитных локусов *P. graminis* f. sp. *tritici*, диагностирующих происхождение инфекции**Table 3.** Amplicon sizes of microsatellite loci of *P. graminis* f. sp. *tritici*, diagnosing the origin of the infection

| Локус       | Размеры аллелей, п.н. | Регион происхождения |
|-------------|-----------------------|----------------------|
| Pgestssr227 | 190; 193              | Центральный регион   |
|             | 187                   | Поволжье             |
| Pgestssr173 | 194; 206              | Центральный регион   |
|             | 173; 191              | Поволжье             |
| Pgestssr059 | 210; 228              | Центральный регион   |
|             | 231                   | Поволжье             |
| Pgestssr293 | 257                   | Центральный регион   |
|             | 266; 269              | Поволжье             |
| Pgestssr325 | 259                   | Центральный регион   |
|             | 247; 256              | Поволжье             |
| PgtCAA93    | 278                   | Центральный регион   |
|             | 275; 293              | Поволжье             |
| Pgestssr021 | 190; 193              | Центральный регион   |
|             | 187                   | Поволжье             |



**Рис. 1.** Дендрограмма распределения изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального (Mo\_sp) и Поволжского (VR) регионов по результатам SSR-генотипирования. В скобках указано количество изолятов, входящих в группу

**Fig. 1.** Dendrogram combining SSR genotyping data of *P. graminis* f. sp. *tritici* from the central region (Mo\_sp) and the Volga region (VR). The number of isolates included in the group is indicated in brackets



**Рис. 2.** Частота аллелей локуса Pgestssr293 среди изолятов образцов популяций *P. graminis* f. sp. *tritici* из Центрального региона и Поволжья

**Fig. 2.** Allele frequency of the Pgestssr293 locus among population samples of *P. graminis* f. sp. *tritici* from the Central region and the Volga region

чительного расстояния барьером является различие в степени конвекции воздуха в Центральном регионе и Поволжье из-за разной скорости ветров, циркулирующих над этими территориями (<https://ecoteco.ru/library/magazine/zhurnal-9/tehnologii/karta-vetrov-rossii>).

Фрагментный анализ результатов SSR-генотипирования 132 монопустульных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* показал маркеры, аллельный состав которых позволяет охарактеризовать их географическое происхождение. Семь маркеров к микросателлитным локусам Pgestssr021, Pgestssr227, Pgestssr173, Pgestssr059, Pgestssr293, Pgestssr325, PgtCAA93 могут быть использованы для паспортизации штаммов гриба. Остальные маркеры из 16 протестированных не дифференцировали выборку. Для диагностических целей были отобраны такие маркеры, аллели которых не совпа-

дали по размеру: так, при использовании праймеров к локусу Pgestssr293 (рис. 2) образец из Центрального региона был представлен аллелем 257 п.н. в гомозиготном состоянии, а в образцах из Поволжья данный локус находился в гетерозиготном состоянии и представлен аллелями размером 266 и 269 п.н. Таким образом, для установления географического происхождения инфекции с помощью набора праймеров к микросателлитным локусам предложено соотнести размеры аллелей тестируемого изолята гриба с соответствующими табличными значениями (табл. 3).

Мы можем предложить следующую схему диагностики происхождения инфекции с помощью SSR-праймеров к микросателлитным локусам Pgestssr021, Pgestssr227, Pgestssr173, Pgestssr059, Pgestssr293, Pgestssr325 и PgtCAA93: (1) получение монопустульных изолятов из природного образца инфекции, (2) выделение геномной ДНК гриба с использованием СТАВ-буфера, (3) проведение ПЦР-амплификации пробы с SSR-праймером, (4) определение размера ампликонов с использованием фрагментного анализа продуктов ПЦР-амплификации и анализ полученных результатов с помощью программного обеспечения Peak Scanner v1.0.; (5) диагностика географического происхождения инфекции с помощью шкалы размеров аллелей микросателлитных маркеров (см. табл. 3).

В связи с угрозой проникновения вирулентной расы Уганда 99 (Ug99) стеблевой ржавчины пшеницы из стран Ближнего Востока и Средней Азии (Шаманин и др., 2015) проведено сравнение полученных SSR-профилей изолятов центральноевропейской популяции стеблевой ржавчины с имеющимся SSR-профилем расы Ug99 (Visser et al., 2009). Локус PgtSSR21 имеет у агрессивной расы два аллеля раз-

мером 165, 160 п.н. Среди SSR-профилей изолятов из Центрального региона выявлено два других аллеля этого локуса, размером 190 и 193 п.н. Таким образом, циркулирующие на территории Центрального региона РФ и Поволжья расы *P. graminis* f. sp. *tritici* по результатам SSR-генотипирования не входят в семейство рас Ug99.

## Обсуждение

Популяции фитопатогенных организмов, к которым относится возбудитель стеблевой ржавчины, в географически удаленных районах возделывания мягкой пшеницы, как правило, формируются под влиянием генотипа высеваемых сортов. Об этом свидетельствует практика традиционных исследований популяций грибов по признаку вирулентности (Гультяева и др., 2015). Однако для возбудителя стеблевой ржавчины миграция спор на значительные расстояния может повышать степень генетической изменчивости отдельной географической популяции, при этом снижая различия между ними. Особенности климата и рельефа регионов также играют немаловажную роль в формировании и степени изоляции популяций. В настоящем исследовании с помощью селективно нейтральных микросателлитных маркеров установлена высокая степень дифференциации между популяциями Центрального региона и Поволжья. Это, в свою очередь, позволяет проводить самостоятельные программы селекции на иммунитет и не исключает необходимости регулярного мониторинга инфекции на посевах мягкой пшеницы.

Предложенная схема диагностики на основании SSR-генотипирования образцов позволит решить такие задачи эпидемиологической значимости, как паспортизация изолятов гриба, выяснение происхождения инфекции, а также установление путей миграции спор в течение сезона вегетации пшеницы, в дополнение к традиционному фитопатологическому анализу.

## Список литературы / References

Василова Н.З., Асхадуллин Дам.Ф., Асхадуллин Дан.Ф. Эпифитотия стеблевой ржавчины на яровой пшенице в Татарстане. *Защита и карантин растений*. 2017;(2):27-28. DOI 10.28983/asj.y2021i8pp23-27 [Vasilova N.Z., Askhadullin Dam.F., Askhadullin Dan.F. Stem rust epiphytotic on soft spring wheat in Tatarstan. *Zashchita i Karantin Rastenij = Plant Protection and Quarantine*. 2017;(2):27-28. DOI 10.28983/asj.y2021i8pp23-27 (in Russian)]

Гультяева Е.И., Шайдаюк Е.Л., Казарцев И.А., Аристова М.К. Структура российских популяций гриба *Puccinia triticina* Eriks. *Вестник защиты растений*. 2015;(3(85)):5-10 [Gultyayeva E.I., Shaidayuk E.L., Kazartsev I.A., Aristova M.K. Structure of russian populations of *Puccinia triticina*. *Vestnik Zashchity Rastenij = Plant Protection News*. 2015;(3(85)):5-10 (in Russian)]

Синяк Е.В., Волкова Г.В. Распространение и вирулентность популяции возбудителя *Puccinia graminis* pers. f.sp. *Tritici* erikss. et henn. на юге России. *Молодой ученый*. 2015;(9(89)):70-71 [Sinyak E.V., Volkova G.V. Spreading and virulence of *Puccinia graminis* pers. f. sp. *Tritici* erikss. et henn. in Southern Russia. *Molodoy Uchenyj = Young Scientist*. 2015;(9(89)):70-71 (in Russian)]

Сколотнева Е.С., Кельбин В.Н., Моргунов А.И., Бойко Н.И., Шаманин В.П., Салина Е.А. Расовый состав новосибирской популяции *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Микология и фитопатология*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092 [Skolotneva E.S., Kelbin V.N., Morgunov A.I., Boiko N.I., Shamanin V.P., Salina E.A. Races Composition of the Novosibirsk Popula-

tion of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Mikologiya i fitopatologiya = Mycology and Phytopathology*. 2020;54(1):49-58. DOI 10.31857/S0026364820010092 (in Russian)]

Шаманин В.П., Моргунов А.И., Петуховский С.Л., Лихенко И.Е., Левшунов М.А., Салина Е.А., Потоцкая И.В., Трущенко А.Ю. Селекция яровой мягкой пшеницы на устойчивость к стеблевой ржавчине в Западной Сибири. Под ред. В.П. Шаманина. Омск: ФГБОУ ВПО ОмГАУ им. П.А. Столыпина, 2015. [Shamanin V.P., Morgunov A.I., Petukhovskiy S.L., Likhenko I.E., Levs hunov M.A., Salina E.A., Pototskaya I.V., Trushchenko A.Y. Breeding spring bread wheat for resistance to stem rust in Africa. Shamanin V.P. (Ed.). Омск: P.A. Stolypin Education Omsk State Agrarian University Publ., 2015 (in Russian)]

Anderson C., Khan M.A., Catanzariti A.M., Jack C.A., Nemri A., Lawrence G.J., Upadhyaya N.M., Hardham A.R., Ellis J.G., Dodds P.N., Jones D.A. Genome analysis and avirulence gene cloning using a high-density RADseq linkage map of the flax rust fungus, *Melampsora lini*. *BMC Genomics*. 2016;17(1):667. DOI 10.1186/s12864-016-3011-9

Asad M.A., Xia X., Wang C., He Z. Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrSN104* in Chinese wheat line Shaannong 104. *Hereditas*. 2012;149(4):146-152. DOI 10.1111/j.1601-5223.2012.02261.x

Baranova O.A., Sibikeev S.N., Druzhin A.E., Sozina I.D. Loss of effectiveness of stem rust resistance genes Sr25 and Sr6Agi in the Lower Volga region. *PLANT Prot. NEWS*. 2021;104(2):105-112. DOI 10.31993/2308-6459-2021-104-2-14994

Berlin A., Samils B., Andersson B. Multiple genotypes within aecial clusters in *Puccinia graminis* and *Puccinia coronata*: improved understanding of the biology of cereal rust fungi. *Fungal Biol. Biotechnol.* 2017;4(1):1-7. DOI 10.1186/S40694-017-0032-3

Chung S.M., Staub J.E., Chen J.F. Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation. *Genome*. 2006;49(3):219-29. DOI 10.1139/g05-101

Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G.D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 2012;13(4):414-30. DOI 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

Earl D.A., vonHoldt B.M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 2012;4(2):359-361. DOI 10.1007/s12686-011-9548-7

Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 2005;14(8):2611-2620. DOI 10.1111/J.1365-294X.2005.02553.X

Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):9. Available at: [http://palaeo-electronica.org/2001\\_1/past/issue1\\_01.htm](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)

Herrman A., Dinooor A., Schachte G., Kosman E. Virulence Analysis Tool (VAT). 2008.

Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K. Microsatellite markers: An overview of the recent progress in plants. *Euphytica*. 2011;177:309-344. DOI 10.1007/s10681-010-0286-9

Karaoglu H., Lee C.M.Y., Park R. Simple sequence repeats in *Puccinia graminis*: Abundance, cross-formae speciales and intra-species utility, and development of novel markers. *Australas. Plant Pathol.* 2013;42(3):271-281. DOI 10.1007/s13313-013-0199-x

Lapochkina I.F., Baranova O.A., Shamanin V.P., Volkova G. V., Gainullin N.R., Anisimova A. V., Galinger D.N., Lazareva E.N., Gladkova E. V., Vaganova O.F. The development of the initial material of spring common wheat for breeding for resistance to stem rust (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*), including the Ug99 race, in Russia. *Russ. J. Genet. Appl. Res.* 2017;7(3):308-317. DOI 10.1134/S207905971703008X

Michiels A., Van Den Ende W., Tucker M., Van Riet L., Van Laere A. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Anal. Biochem.* 2003;315(1):85-89. DOI 10.1016/S0003-2697(02)00665-6

Peakall R., Smouse P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537. DOI 10.1093/BIOINFORMATICS/BTS460

Powell W., Machray G., Provan J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci.* 1996;1:215-222. DOI 10.1016/S1360-1385(96)86898-0

- Rsaliev A.S., Rsaliev S.S. Principal approaches and achievements in studying race composition of wheat stem rust. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2018;22(8):967-977. DOI 10.18699/VJ18.439
- Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecol. Lett.* 2006;9(5):615-29. DOI 10.1111/j.1461-0248.2006.00889.x
- Skolotneva E.S., Lekomtseva S.N., Kosman E. The wheat stem rust pathogen in the central region of the Russian Federation. *Plant Pathol.* 2013;62(5):1003-1010. DOI 10.1111/PPA.12019
- Szabo L.J. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus, *Puccinia graminis*. *Mol. Ecol. Notes*. 2007;7(1):92-94. DOI 10.1111/j.1471-8286.2006.01540.x
- Visser B., Herselman L., Pretorius Z.A. Genetic comparison of Ug99 with selected South African races of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici*. *Mol. Plant Pathol.* 2009;10(2):213-222. DOI 10.1111/j.1364-3703.2008.00525.x
- Zhong S., Leng Y., Friesen T.L., Faris J.D., Szabo L.J. Development and characterization of expressed sequence tag-derived microsatellite markers for the wheat stem rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*. 2009;99(3):282-289. DOI 10.1094/PHYTO-99-3-0282

---

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.05.2023. После доработки 21.08.2023. Принята к публикации 30.08.2023.