

УДК 633.11: 632.938

UDC 633.11: 632.938

**ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ДНК-ПОЛИМОРФИЗМ
ИЗОЛЯТОВ *Puccinia triticina* ИЗ
СЕВЕРНОГО КАВКАЗА И
ЛЕНИНГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ**

**VIRULENCE AND DNA-POLYMORPHISM OF
Puccinia triticina ISOLATES FROM
NORTH CAUCASUS AND LENINGRAD
REGION**

Кудинова Ольга Александровна
аспирант

Kudinova Olga Aleksandrovna
post graduate student

Кремнева Оксана Юрьевна
к. б. н.

Kremneva Oxana Yurievna
Cand. Biol. Sci.

Волкова Галина Владимировна
д. б. н.
*Всероссийский научно-исследовательский
институт биологической защиты растений, г.
Краснодар, Россия*

Volkova Galina Vladimirovna
Dr. Sci. Biol.
*All-Russian Research Institute of Biological Plant
Protection, Krasnodar, Russia*

Проведено сравнение изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области по генетической структуре, фенотипическому составу, а также частоте встречаемости RAPD-фенотипов и полиморфных мажорных фрагментов с использованием индекса Роджерса. Не найдено значимых отличий по генетической структуре и по встречаемости мажорных фрагментов ДНК-полиморфизма. Различие изолятов данных регионов с высокой степенью достоверности определено по фенотипам вирулентности и RAPD-фенотипам

Puccinia triticina isolates from North Caucasus and Leningrad region were compared in regard to the genetic structure, phenotypic composition as well as frequency of occurrence of RAPD-phenotypes and polymorphous major fragments with the help of Rogers index. Did not demonstrate any significant differences according to their genetic structure and occurrence of major fragments of DNA-polymorphism. The difference of isolates from given regions was determined with high degree of confidence according to the phenotypes of virulence and RAPD-phenotypes

Ключевые слова: *Puccinia triticina*,
МОНОПУСТУЛЬНЫЕ ИЗОЛЯТЫ, ФЕНОТИП
ВИРУЛЕНТНОСТИ, RAPD-ПОЛИМОРФИЗМ

Keywords: *Puccinia triticina*, , SINGLE-
PUSTULE ISOLATES, PHENOTYPE OF
VIRULENCE, RAPD-POLYMORPHISM

Возбудитель бурой ржавчины *Puccinia triticina* встречается повсеместно во всех регионах культивирования пшеницы в мире. В годы эпифитотий потери урожая могут составить до 45% [1], а при умеренном поражении урожай снижается на 5-10%. Ареалы популяций ржавчинных грибов могут быть огромными и занимать целые континенты. Определение границ популяций патогена на территории страны имеет важное значение для стратегии защиты и территориального распределения генов устойчивости. Но определение точного числа популяций гриба затруднительно. Это связано с тем, что классическое понятие этого термина не применимо к возбудителю бурой ржавчины пшеницы,

поскольку грибок зимует в уредостадии и популяция является клональной. Поэтому ареалы популяций *P. triticina* авторы определяют, исходя из частоты встречаемости изолятов, вирулентных или авирулентных к близкоизоженным линиям растения-хозяина [2]. В настоящее время существуют две точки зрения в отношении количества популяций на территории России и СНГ. Л. А. Михайлова за многолетний период исследований (1980-2000) выделила три популяции: кавказскую, европейскую и западно-азиатскую [3]. Другая группа исследователей во главе со Смирновой Л. А. [4], проведя десятилетнее исследование, считает, что северокавказскую популяцию нельзя считать самостоятельной, ее следует рассматривать как субпопуляцию в пределах европейской популяции. Таким образом, согласно Смирновой с соавт., на территории СНГ можно выделить пять популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы:

1. Европейская (Северный Кавказ, Украина, ЦЧЗ).
2. Закавказская.
3. Западносибирская (Урал, Западная Сибирь, Казахстан).
4. Среднеазиатская (горные районы средней Азии).
5. Дальневосточная (Хабаровский край, Приморский край, Амурская область).

В нашей работе проведено сравнение изолятов возбудителя бурой ржавчины, собранных на территории Северного Кавказа и Ленинградской области, с помощью двух методов: фитопатологического тестирования и RAPD-ПЦР с целью установления степени различия изолятов *P. triticina* из двух отдаленных регионов, а также сопоставления данных, полученных с помощью двух различных методов изучения структуры популяции гриба.

Материалы и методы

В работе были использованы 36 монопустульных изолятов гриба из Ленинградской области и 40 изолятов из Северного Кавказа популяции 2007 года. Сбор, хранение, выделение монопустульных изолятов вели по методикам ВНИИФ [5]. Для накопления достаточного количества урединиоспор монопустульных изолятов проводили их размножение на восприимчивом сорте *Michigan Amber*. Для идентификации каждого выделенного изолята гриба высевали линии Северо-Американского набора, состоящего из 16 близкородственных линий сорта *Thatcher* [6]. На 10 – 12 сутки после инокуляции оценивали в баллах типы реакции сортов-дифференциаторов и изогенных линий по шкале Мейнса и Джексона [7]. Фенотипическое разнообразие в популяциях определяли по формуле Шеннона [8]. Уровень различия между популяциями по генетической структуре и фенотипическому составу рассчитывали с помощью индекса Роджерса [8].

Экстракцию ДНК из урединиоспор осуществляли по методике Chen [9]. Полимеразную цепную реакцию проводили в амплификаторе Mastercycler 1 фирмы Eppendorf по протоколу разработчика праймера Kolmer et al. [10], с некоторыми модификациями: 3 мин при 94° С, далее 35 циклов: 94° С — 20 сек., 36° С — 20 сек., 72° С — 1 мин., после чего финальная экспозиция - 72° С на 15 мин. Амплифицированные фрагменты разделяли электрофорезом в 1,2% агарозном геле, в 0,5% TBE буфере, гели окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете. Для оценки размера полученных фрагментов использовали 50 bp маркер от Gene Ruler. Полученные электрофореграммы фотографировали и обрабатывали на компьютере. Критериями, на основании которых происходило разбиение выборки на RAPD-фенотипы, являлись количество

и величина мажорных фрагментов. В работе использовали 10 праймеров, из которых в результате предварительного скрининга на информативность и воспроизводимость были отобраны три: UBS 450, UBS 517 и OPA 20.

Результаты и обсуждение

Результаты идентификации изолятов популяции возбудителя бурой ржавчины из Северного Кавказа и Ленинградской области на Северо-Американском наборе из 16 близкоизогенных линий сорта *Thatcher* представлены в таблице 1.

Среди 40 монопустульных изолятов из Северного Кавказа выявлено 38 фенотипов с разным количеством генов вирулентности. Среди 36 монопустульных изолятов из Ленинградской области выявлено 36 изолятов с различным количеством генов вирулентности. Это указывает на высокий уровень разнообразия обеих популяций по фенотипическому составу.

Таблица 1 – Фенотипы вирулентности изолятов *Puccinia triticina* из Ленинградской области и Северного Кавказа в 2007 году

№ изолята	Вирулентность (неэффективные гены Lr)	Фенотип
1	2	3
Изоляты из Ленинградской области		
1	2с,16,26,3ка, 11, В	DHQL
2	1,3,16,11,30,В,10,14а	MGHS
3	1,2с,16,26,3ка,11,30,В,10,14а	NHRS
4	2а,2с,3,16,26,11,17,30,10	KHKG
5	3,16,30,В,10	CGCQ
6	3,16,В	CGBL
7	1,2с,3,16,26,3ка	PHLB
8	1,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10,14а	PHRS
9	3,16,11	CGGB

10	1,2с,3,16,24,3ка,11,30,В	PJRL
11	1,2а,2с,3,16,26,11,30,10,14а	THHD
12	1,2а,2с,3,16,30,В	TGCL
13	1,2а,2с,3,26,11,30,10	TCHG
14	1,2с,16,10	NGBG
15	1,2а,2с,3, 26,11,В	TCGL
16	1,2а,2с,3,26,17,30,В	TCFL
17	2с,3,16,3ка,17	FGNB
18	1,2с,3,3ка,10	PBLG
19	1,2а,16,3ка,17	QGNB
20	2а,2с,3,16,26,3ка,11,17,30,В,14а	KHTN
21	1,2а,2с,3,16,3ка,11,17,30,10,14а,18	TGTK
22	2а,2с,3,26,3ка,11,17,10,14а,18	KHJT
23	1,2с,3,16,26,3ка,11,17,10,18	PHSH
24	1,2а,2с,3,3ка,11,17,10,18	TBSH
25	2с,3,16,26,3ка,11,17,В,10,14а,18	KHST
26	1,2а,2с,3,26,3ка,11,17,14а,18	TCSF
27	3,16,26,3ка,11,17,В,10	CHSQ
28	1,2а,2с,3ка,11,17,18	SBSC
29	1,3,3ка,11,17,10,18	MBSH
30	1,2а,2с,3,16,26,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	THTT
31	1,3,3ка,11,17,10	MBSG
32	2с,3,16,26,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	FHTT
33	1,2а,2с,3,16,26,3ка,11,17,30,10,14а,18	THTK
34	1,2а,2с,3,16,26,3ка,11,17,10,14а,18	THSK
35	26,3ка,11,17,10,18	BCSH
36	1,2а,3,26,3ка,11,17,10,14а	RCSJ
Изоляты из Северного Кавказа		
1	1,3,16,26,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	MHTT
2	1,3,16,26,3ка,11,30,В,10,14а,18	MHRT
3	1,3,16,26,3ка,11,17,В,10,14а	MHSS
4	2а,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10	KHRQ
5	2с,16,26,11,17,В,10,14а	DHJS
6	2с,3,16,3ка,11,В,10	FGQQ
7	2а,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10	KHRQ
8	3,16,3ка,17,В	CGNL
9	2а,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10	KHRQ
10	2а,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10,14а	KHRS

11	2с,3,26,3ка,11,30,В,10	FCRQ
12	2а,2с,3,16,26,3ка,11,30,В,10,14а	KHRS
13	2а,2с,16,26,3ка,11,30,В,10	JHRQ
14	2а,2с,3,3ка,11,17,30,В,10,14а	KBTS
15	2с,3ка,11,30,В,10,14а	DCRS
16	1,2а,2с,3,3ка,11,30,В,10	TBRQ
17	1,2с,3,16,3ка,11,17,30,В,18	PGTM
18	1,2с,3,10,14а,16,17,18	PGFT
19	1,2с,3,16,3ка,17,30,В,10	PGPQ
20	1,3,16,26,3ка,17,30,В,10,14а,18	MHPT
21	1,2с,16,26,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	NHTT
22	1,3,16,3ка,17,30,В,10,14а,18	MGPT
23	1,2с,3,26,3ка,11,17,В	PCSL
24	3,16,3ка,11,17,14а,18	CGSF
25	1,2а,3,3ка,11,17,30,В,14а,18	RBTP
26	1,3,16,26,11,17,В,14а	MHJN
27	1,2а,2с,3,3ка,11,17,30,10,18	TBTH
28	1,2с,3,26,3ка,11,17,30,10,14а,18	PCTK
29	1,3,16,26,3ка,17,30,В,18	MHPM
31	1,2а,2с,3,16,11,17,30,В,10,18	TGKR
32	1,3,26,3ка,11,17,30,10,18	MCTH
33	1,3,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	MBTT
34	2с,3,16,3ка,11,17,30,10,14а,18	FGTK
35	1,2с,3,26,3ка,17,30,В,10,18	PCPR
36	1,3,16,30,В,10,14а	MGCS
37	1,2с,3,3ка,11,17,30,В,10,14а,18	PBTT
38	3,3ка,11,17,В,10,14а,18	CBST
39	1,3,16,3ка,11,17,30,В,14а,18	MGTP
40	3,16,26,11,17,30,14а	CHKD

Генетическая структура изолятов из двух регионов приведена в таблице 2. Как видно из таблицы, среди изолятов из Северного Кавказа не обнаружены клоны, вирулентные к носителям генов Lr9 и Lr24.

Для изолятов обоих регионов отмечено высокое содержание клонов (40% и выше), вирулентных к Lr: 1, 2с, 3, 16, 26, 3ка, 11, 17, 10. Среди изолятов из Северного Кавказа также много клонов, вирулентных к Lr: 30, В, 14а и 18. Выборка изолятов из Ленинградской области содержит большое количество клонов, вирулентных к Lr2а и обнаружен 1 изолят, вирулентный к Lr24. Индекс Роджерса между изолятами двух регионов составил 0,24, что свидетельствует о незначительных различиях по генетическому составу.

Таблица 2- Генетическая структура изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области (2007 г.)

Lr ген	Частота вирулентных клонов (%), собранных на территории	
	Северного Кавказа	Ленинградской области
1	60,0	66.7
2а	27.5	47.2
2с	57.5	72.2
3	82.5	83.3
9	0,0	0,0
16	67.5	61.1
24	0,0	2.8
26	67.5	58.3
3ка	85,0	69.4
11	80,0	75,0
17	70,0	58.3
30	80,0	38.9
В	85,0	38.9
10	75,0	61.1
14а	57.5	38.9
18	47.5	36.1

В таблице 3 показано распределение изолятов по количеству генов вирулентности. Установлено, что для всех изолятов не обнаружены авирулентные фенотипы. У изолятов гриба из Северного Кавказа доля фенотипов с 1-9 генами вирулентности (из 16 отмеченных) составляет 42,0%, у изолятов из Ленинградской области – 63,9%.

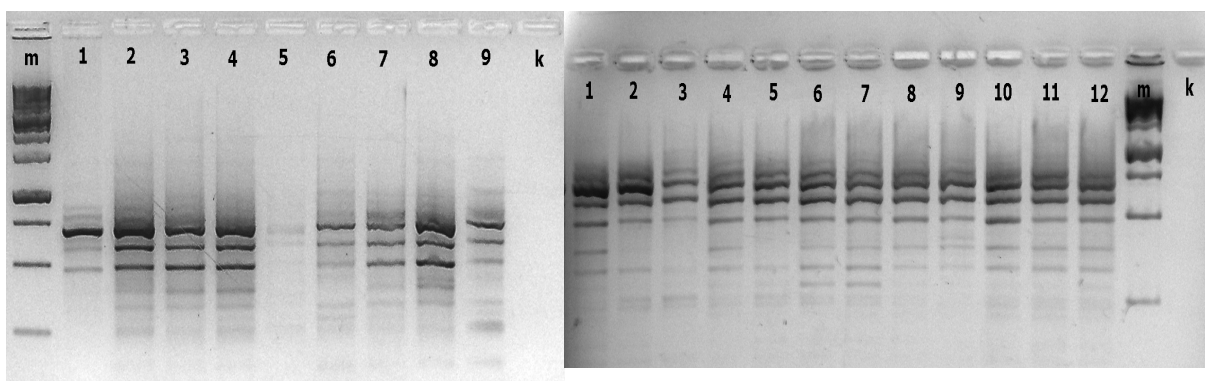
Таблица 3 - Фенотипы изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области с разным количеством генов вирулентности (2007)

Фенотип с «п» количеством генов вирулентности	Количество изолятов, шт.		Частота фенотипа, %	
	Ленинградская область	Северный Кавказ	Ленинградская область	Северный Кавказ
0, 1, 2	0	0	0,0	0,0
3	2	0	5,6	0,0
4	1	0	2,8	0,0
5	4	1	11,0	2,5
6	4	0	11,0	0,0
7	4	5	11,0	12,5
8	4	5	11,0	12,5
9	4	5	11,0	12,5
10	5	12	12,8	30,0
11	3	6	8,3	7,5
12	3	3	8,3	2,5
13	1	1	2,8	2,5
14	1	0	2,8	0,0

Доля изолятов с 10 – 14 генами для изолятов Северного Кавказа и Ленинградской области составляет 42,5% и 35,0% соответственно. Приведенные данные указывают на то, что изоляты из Северного Кавказа более вирулентны, в то время как из Ленинградской области - более гетерогенны. Уровень фенотипического разнообразия (индекс Шеннона)

оказался равным единице для обоих регионов. Это указывает на высокий уровень разнообразия изолятов данных регионов по фенотипическому составу, несмотря на небольшую разницу в генетической структуре. Это еще раз подтверждает мнение ряда исследователей о том, что северокавказская популяция входит в состав обширной европейской, являясь субпопуляцией.

Также было проведено исследование изолятов гриба двух регионов по ДНК-полиморфизму. На предварительном этапе 10 RAPD-праймеров проверяли на информативность и воспроизводимость ДНК-фрагментов. В результате были отобраны три наиболее информативных: UBS 450, UBS 517 и OPA 20. Из трех используемых праймеров, два разделяли выборки популяций на RAPD-фенотипы (рис. 1). Основным признаком, по которому происходило разбиение выборок на RAPD-фенотипы, являлся полиморфизм мажорных фрагментов. Критерием достоверности была воспроизводимость результатов при повторностях.



а)

б)

Рисунок 1 - RAPD профили в 1.2% агарозном геле изолятов возбудителя бурой ржавчины: а) собранных в Северокавказском регионе (1-МНТТ, 2-МНРТ, 3-МНСС, 4-КННН, 5-ДННН, 6-ФННН, 7-ФННН, 8-ВННН, 9-ПННН),

б) собранных в Ленинградской области (1-TGCL, 2-TVHG, 3-PBLG, 4-QGNB, 5-KHGT, 6-TVKH, 7-TCSF, 8-CHSQ, 9-SBSC, 10-THTT, 11-FHTT, 12-BCSH); m – маркер, K – контроль. Использовали праймер UBC 517.

Чтобы просуммировать данные по трем праймерам, каждому изоляту был присвоен трехзначный молекулярный фенотип (таблица 4). Первая цифра в трехзначном RAPD-фенотипе отражает праймер ОРА 20, вторая - UBS 450, и последняя – UBS 517. Цифры от 1 до 4 означают различные варианты сочетания фрагментов описываемых изолятов.

Таблица 4 - RAPD-фенотипы изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области (2007 г.)

RAPD-фенотип	Количество изолятов с данным фенотипом, шт.	
	Северный Кавказ	Ленинградская область
111	5	1
115	1	4
215	1	0
211	3	0
213	1	0
411	1	1
315	0	2
415	0	2

Для сравнения изолятов по молекулярному полиморфизму, а также для сопоставления результатов анализа по вирулентности и RAPD-профилям, был определен индекс Роджерса между регионами по RAPD-фенотипам и по ДНК-фрагментам. Индекс Роджерса по фрагментам составил 0,1, что указывает на незначительные отличия изолятов двух

регионов по наличию мажорных фрагментов. При сравнении по молекулярным фенотипам, индекс Роджерса составил 0,73, что означает высокую степень различия изолятов двух регионов по RAPD-фенотипам.

Найденные значения индекса Роджерса по RAPD-фенотипам и по ДНК-фрагментам аналогичны таковым по фенотипам вирулентности и генетическому составу. Из этого следует, что два метода исследования изолятов *Puccinia triticina* по вирулентности и ДНК-полиморфизму не противоречат, а дополняют друг друга и еще раз подтверждают тот факт, что различия изолятов из двух регионов основаны лишь на фенотипическом составе, т. е. незначительны. Значительных отличий в генетической структуре и составе мажорных фрагментов не найдено. Это позволяет сделать вывод о том, что изоляты из Северного Кавказа и Ленинградской области принадлежат к обширной европейской популяции, а значительная разница в фенотипическом составе позволяет обособить изоляты гриба Северного Кавказа в субпопуляцию. Для уточнения и дополнения полученных данных необходимо проследить динамику генетической структуры изолятов *P. triticina* из двух регионов, а также увеличить выборку.

Благодарность.

Ведущему научному сотруднику Анпиловой Л. К., научному сотруднику Вагановой О. Ф., лаборанту-исследователю Авдеевой Ю. В - за помощь в проведении исследований структуры северокавказской популяции гриба по вирулентности; Полушину П. А. - за помощь в проведении статистического анализа.

Список литературы

1. В. Б. Лебедев, А. Н. Васильев, Е. В. Якубова. Расчет возможных потерь яровой пшеницы от бурой ржавчины // Доклады ВАСХНИЛ. - №1. – 1994. – С. 14-16.
2. Л. А. Михайлова, С. В. Васильев. Ареалы популяций возбудителя листовой ржавчины пшеницы// Микология и фитопатология.- 19. – вып 2.- 1985. – С. 158-163.
3. Е. И. Гультяева, О. А. Баранова, А. П. Дмитриев. Вирулентность и структура популяций *Puccinia triticina* в РФ в 2007 году // Вестник защиты растений. – вып. 4. – 2009. – С. 33-38.
4. Г. К. Сорокина, Л. А. Смирнова и др. Использование эффективных Lr-генов в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине (методические рекомендации)/ ВНИИФ, ВАСХНИЛ.-М., 1990. – 31 с.
5. Методические рекомендации по изучению расового состава возбудителей ржавчины хлебных злаков / ВНИИФ, ВАСХНИЛ.- М., 1977.–144 с.
6. Long, D. L., Kolmer, J. A. A North America System of nomenclature for *Puccinia triticina* //Phytopathology 79, 1989. – P. 525-529.
7. Mains E. B., Jackson H. J., Physiological specialization the leaf rust wheat (*P. triticina* Erikss.) // Phytopathology 16, 1926. – P.89-120.
8. Афанасенко О. С. Методы анализа популяций возбудителей пятнистостей листьев ячменя / О. С. Афанасенко //Сборник методических рекомендаций по защите растений. – СПб., 1998. – С. 127-133.

9. Chen X.M., Line R.F., Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* //Phytopathology 83, 1993. – P. 1489-1497.
10. Kolmer J. A., Liu J. Q., and Sies M. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita f. sp. tritici* in Canada //Phytopathology 85, 1995. – P. 276-285.