

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Биотрофный гриб *Puccinia graminis* Pers. - возбудитель стеблевой ржавчины злаков, одного из наиболее вредоносных заболеваний зерновых культур. Инфекция в виде урединиоспор способна быстро и широко распространяться в течение одного вегетативного сезона, приводя к значительным потерям урожая зерновых. Серьезные эпифитотии ржавчины в 20-м веке отмечались во многих странах (Наумов, 1939; Zadoks, 1963; Roelfs, 1977; Watson, 1981; Leonard, 2001; Szabo, 2005).

В последние десятилетия удалось снизить ущерб, наносимый ржавчиной производственным посевам. Однако высокий инфекционный потенциал гриба, поддерживающийся в природе на дикорастущих злаках, не исключает массового проявления стеблевой ржавчины при благоприятных условиях. Таким образом, существует необходимость постоянного мониторинга развития патогена на основном (злаках) и промежуточном (барбарисе) растениях-хозяевах.

Традиционный для ржавчинных грибов анализ расового состава дает информацию о генах вирулентности в популяциях патогенов, что важно для селекции устойчивых сортов и их районирования. Наряду с генетическим анализом вирулентности, молекулярные и биохимические маркеры могут внести вклад в оценку внутривидового полиморфизма ржавчинных грибов – организмов с относительно бедной морфологией и в исследование микроэволюционных процессов внутри популяций. Выявление характера и механизмов изменчивости представляет интерес как с теоретических позиций (оценка коэволюции паразита и хозяина у биотрофов), так и с практической точки зрения (ограничение развития опасного патогена на зерновых культурах).

Цель работы. Характеристика генетического и молекулярного разнообразия изолятов *P. graminis*, собранных в 2001-2005 гг. с разных растений-хозяев в нескольких географических зонах России; выявление структуры и закономерностей изменчивости возбудителя стеблевой ржавчины злаков.

Задачи:

1. Изучение динамики расового состава возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы *P. graminis* f. sp. *tritici*.
2. Выявление особенностей отбора по признаку вирулентности в популяциях патогена в зависимости от устойчивости растения-хозяина и климатических условий во время критического для развития заболевания периода.
3. Оценка эффективности известных генов устойчивости пшеницы к возбудителю стеблевой ржавчины пшеницы *P. graminis* f. sp. *tritici*.
4. Определение возможности использования полиморфизма ДНК для характеристики популяционной структуры *P. graminis*.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые проведен детальный анализ внутривидового разнообразия вида *P. graminis* на территории России и ближнего зарубежья по составу генов вирулентности и по молекулярным признакам.

Определена эффективность известных генов устойчивости пшеницы к возбудителю *P. graminis* f. sp. *tritici*.

С помощью ДНК-маркеров описаны генетически устойчивые группировки внутри специальных форм *P. graminis*, возникающие, вероятно, в результате канализированного отбора клонов гриба на разных растениях-хозяевах. По результатам RAPD-анализа выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, выполненного с помощью набора GC-насыщенных праймеров, описаны направления дифференциации возбудителя стеблевой ржавчины злаков.

Результаты исследования представляют ценность как для теоретического понимания внутривидовой структуры и микроэволюции биотрофного вида *P. graminis*, так и для селекционной работы по выведению устойчивых сортов культурных злаков.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на заседании кафедры микологии и альгологии МГУ им. М. В. Ломоносова в 2008 г. На конференциях: Юбилейная конф., посвящ. 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В.Ломоносова (М., 2004); XI и XII Международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (М., 2004, 2005); «Грибы в природных и антропогенных экосистемах» междунар. конф., посвящ. 100-летию начала работы профессора А.С. Бондарцева в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. (СПб, 2005); «Грибы и водоросли в биоценозах - 2006» междунар. конф., посвящ. 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова (М., 2006); «Общие проблемы мониторинга природных экосистем» Всероссийск. научно-практич. конф. (Пенза, 2007); «The XV Congress of European mycologists» (Russia, St Petersburg. 16-21 September 2007); «Современные проблемы биологической эволюции» конф. к 100-летию Государственного Дарвиновского музея (М., 2007); «Современная микология в России» Второй съезд микологов России (М., 2008); «ICPP 2008 - 9th International Congress of Plant Pathology»(Turin, Italy, 2008); «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» межд. конф. (СПб, 2008).

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 19 работ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 146 работ, приложения. Текст изложен на 102 страницах, содержит 39 иллюстраций (рисунки, таблицы).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В главе приведены сведения об истории изучения возбудителей ржавчинных болезней зерновых культур, биологических особенностях *P. graminis*, внутривидовой структуре патогена, о подходах, используемых в популяционных исследованиях ржавчинных грибов (генетических, биохимических и молекулярных методах).

Глава 2. Материалы и методы

Материалом исследований служили моноурединальные изоляты *P. graminis*, выделенные из урединиоспор с зерновых культур (*Triticum*, *Secale*, *Avenae*, *Hordeum*) и диких видов злаков (*Elytrigia*, *Dactylis*, *Phleum*, *Lolium*, *Festuca*, *Agropyron*, *Leymus*), а также из эциев с барбариса; и собранных с 2001 по 2005 в России: Центральном регионе (Московская обл.), на Северном Кавказе (Ростовская обл.), в Западной Сибири (Томская обл.); и на Украине (Киевская обл.).

Искусственное заражение растений проводили в теплице стандартными методами (Кирай и др., 1974). Использовались восприимчивые растения пшеницы (сорт Хакасская), ржи (Вятка) и овса (Орел) в стадии 2-3 листьев.

Определение патотипов возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы. Использован дифференцирующий набор 16 изогенных линий пшеницы, предоставленный профессором Джэймсом Гротом (James V. Groth) из Cereal Disease Laboratory (CDL) Университета Миннесота США. Типы заражения оценивали по пятибалльной шкале (Roelfs, Martin, 1988; Лекомцева, 2000).

Изоферментный анализ спектров НАД-зависимой малатдегидрогеназы – МДГ – (КФ: 1.1.1.37) проводили по методу, описанному у Малеевой (Малеева и др., 2003а).

Выделение ДНК из урединиоспор проводили с использованием цетавлонового лизирующего буфера по адаптированному для *P. graminis* методу (Малеева и др., 2003а).

Реакции амплификации (ITS-, IGR-, RAPD-PCR) выполняли на амплификаторах марки «Cyclo-Temp 106» и «Терцик» 1-й модели с использованием различных температурных режимов, описанных у Малеевой (Малеева и др., 2003а) и Кима (Kim et al., 1992).

Коэффициент сходства выборок патогена по составу вирулентных фенотипов вычисляли по формуле: $r = \sum \min(p_i, q_i)$, - где p_i и q_i – минимальная частота фенотипа в одном из двух сравниваемых образцов (Михайлова, Тырышкин, 1989).

Коэффициент Шеннона для оценки разнообразия расового и генотипического состава выборок вычислялся по формуле: $H = -\sum p_i \log p_i / \ln k$, - где p_i - частота i -того генотипа и k - объем выборки (Мэгарран, 1992; Goodwin et al., 1995).

Клональная фракция генотипов в выборке изолятов рассчитывалась по формуле: $CF = 1 - (a/b)$, - где a – число уникальных генотипов, b – общее число изолятов (Zhan et al., 2003; Мироненко, 2005).

Показатель генетической дифференциации (F_{ST}) между изолятами из разных выборок вычислялся с помощью статистической программы Arlequin v.3.1.1.

Кластерный анализ данных выполнен с помощью программы TREECON for Windows (version 1,3b). Для установления степени различий образцов взят метод кластерного анализа UPGMA.

Глава 3. Экспериментальная часть

АНАЛИЗ ВИРУЛЕНТНОСТИ *P. GRAMINIS* F. SP. *TRITICI* НА РАЗНЫХ РАСТЕНИЯХ-ХОЗЯЕВАХ В 2001-2005 ГГ.

1. Структура популяций возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы на территории РФ и ближнего зарубежья в 2001-2005 гг.

Расовый состав *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2001-2005 гг. в отдельных регионах России на разных растениях-хозяевах отличался значительным разнообразием. При определении вирулентности 309 моноурединальных клонов к 16-и изогенным линиям пшеницы за указанный период идентифицировано 43 расы возбудителя. При этом ежегодно доминировали 2-3 расы гриба (табл. 1).

Таблица 1. Патотипы, доминирующие в популяциях *P. graminis* f. sp. *tritici* в различных регионах РФ в 2001 – 2005 гг.

Патотип	Гены вирулентности <i>pp</i>	Раса по Стэкмену (Стэкмен, Харрар, 1959)
TKNT	5, 21, 9e, 7b, 6, 8a, 9g, 36, 30, 9a, 9d, 10, Tmp	15
TTNT	5, 21, 9e, 7b, 11, 6, 8a, 9g, 36, 30, 9a, 9d, 10, Tmp	15
TKST	5, 21, 9e, 7b, 6, 8a, 9g, 36, 30, 9a, 9d, 10	15
MKB T	5, 7b, 11, 6, 8a, 9g, 9a, 9d, 10, Tmp	34
MKLT	5, 21, 11, 9g, 36, 9a, 9d, 10, Tmp	34
PKLT	5, 21, 9e, 7b, 6, 8a, 9g, 36, 30, 13, 9a, 9d, 10, Tmp	40

Сезоны 2001, 2002 и 2005 годов были относительно благоприятными для развития стеблевой ржавчины. За этот период в Ростовской области выделено 20 рас, в Московской - 15, Томской – 12, в Киевской области 8 рас. Редкие расы с частотой менее 8% были представлены 22 фенотипами. Максимальное количество фенотипов (12) было обнаружено в 2001 году в Ростовской области среди 33 клонов.

Использование коэффициента Шеннона для статистической оценки разнообразия расового состава *P. graminis* f. sp. *tritici* с учетом редких рас в 2001-2005 годах подтвердило, что наибольшее разнообразие наблюдалось в 2001 и 2005 годах ($\bar{H} = 0,566$ и $0,528$, соответственно), а слабое - в 2003 и 2004 годах ($\bar{H} = 0,276$ и $0,188$, соответственно).

Анализ расового состава популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2001-2005 гг. на территории Московской области проводился ежегодно. На протяжении всех сезонов исследования среди основных рас, выделяющихся со злаков и барбариса, постоянной была высоковирулентная раса TKNT (табл. 1).

В 2001 году она доминировала вместе с расой MKBT. В 2002 году по частоте встречаемости эта раса занимала следующее место за группой рас MKBT, MKLT, MKBP, авирулентных к линиям пшеницы с генами Sr-9e и Sr-21. В последующие годы дифференцирующая способность указанных линий резко снизилась и значительно возросла доля вирулентных к ним рас.

В 2003 году вместе с расой TKNT (26%), была зарегистрирована близкая к ней раса TTNT (51.5%) с большим количеством генов вирулентности (табл. 1). В 2004 и 2005

годах основными стали высоко вирулентные расы TTNT, TKST и TKNT, среди которых доминировала последняя.

Как правило, в исследуемых регионах наборы доминирующих рас были сходными в течение одного сезона. Разнообразие рас и присутствие редких фенотипов в различных географических выборках *P. graminis* f. sp. *tritici* создали необходимость сравнения их фенотипического состава (табл. 2).

Таблица 2. Сходство фенотипического состава образцов различных географических выборок *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2001-2005 гг., (коэффициент сходства г, %)

Год	Регион	Московская обл.	Томская обл.	Киевская обл.
2001	Ростовская обл.	27	-	39
	Московская обл.			28,6
2002	Ростовская обл.	33	16,7	50
	Московская обл.		25	0
	Томская обл.			0
2004	Ростовская обл.	64	-	-
	Московская обл.		-	-
2005	Ростовская обл.	55,7	41,7	81
	Московская обл.		49,4	40,7
	Томская обл.			41,7

Наибольшее сходство в течение 2001-2005 гг. обнаружено между выборками изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Ростовской и Киевской областей (от 39 до 81%). Коэффициент сходства г этих выборок с выборкой из Московской области также был относительно высоким (от 27 до 55,7%), за исключением 2002 года, когда между Киевской и Московской выборками он оказался равным нулю. Из-за недостатка исследуемого материала в указанном сезоне не было возможности оценить истинное распределение фенотипов *P. graminis* f. sp. *tritici* на территории Киевской области. В указанном регионе была выявлена единственная раса - PKLT, которая не обнаружена ни среди Московской, ни среди Томской выборок изолятов. Однако в Ростовской области она составила 50 %.

В 2002 и 2005 годах в сравнительный анализ были включены изоляты *P. graminis* f. sp. *tritici* из Томской области. Здесь также преобладали расы, доминирующие среди изолятов Европейской части страны (МКВТ и МКЛТ в 2002 году, ТКНТ, ТКСТ и ТТНТ в 2005 году). Доля «собственных» рас в этом районе составила 25%. На основании сходства фенотипов (RKNS, RKНТ и RTNS) их можно объединить в одну группу вирулентности. При этом раса RKNS присутствовала в выборках как 2002, так и 2005 года с постоянной частотой 16,8%.

В воздушных потоках на территории России уединиоспоры *P. graminis* регистрируются ежегодно и по частоте встречаемости находятся в числе доминирующих групп грибов (Еланский, Лекомцева, 1998). В годы достаточно интенсивного развития стеблевой ржавчины злаков вполне вероятно интенсивная миграция спор на исследуемой территории из районов первичного развития и

массового накопления урединиоспор гриба. Этим могут объясняться высокие значения коэффициента сходства r (от 40,7 до 81%), полученные при сравнении фенотипического состава географических выборок *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2005 году (табл. 2).

Сходство выборок Западной Сибири и Европейской части страны обнаружилось на достаточном уровне для объединения их в одну совокупность. Коэффициент сравнения, как правило, превышал 20%. Эта мера была принята Михайловой за пограничную оценку при исследовании степени изоляции и сходства географических популяций *P. recondita* f. sp. *tritici* (*P. triticina*) (Михайлова, Тырышкин, 1989).

Таким образом, обнаруженные закономерности в распределении фенотипов гриба по результатам суммирования данных анализа отдельных географических выборок дают основание предполагать существование одной центрально-европейской популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* на исследованной территории.

2. Влияние условий климата на развитие возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы и распределение вирулентных фенотипов на территории РФ и ближнего зарубежья в 2001-2005 гг.

Температура и влажность – основные элементы климата, от которых зависит развитие и распространение стеблевой ржавчины (Наумов, 1939; Цадокс, 1970).

Наибольшее значение имеют погодные условия в определенный критический для развития болезни период времени от колошения до созревания хлебов. С этой точки зрения для подавляющей части нашей страны стратегически важными являются метеорологические условия первых летних месяцев - июня и июля.

В течение 10-и летнего исследования погодные условия «критического периода», наблюдавшиеся на территории Центрального региона России, можно отнести к двум противоположным режимам. Сочетание пониженной относительной влажности воздуха (45 - 50%) и высоких среднесуточных температур (22-25°C) было характерно для периода с 1996-2000 года. Сухое лето 2002 года со средней относительной влажностью 30-35% и температурой 17-20°C также можно отнести к описанной категории. Превышающая сезонную норму относительная влажность воздуха (70 - 100%) отмечалась вместе с низкими среднесуточными температурами (13-17°C). Этому режиму соответствовали погодные условия 2001, 2003, 2004 и 2005 годов.

При объединении данных по расовому составу стеблевой ржавчины пшеницы 2001-2005 гг. с результатами, полученными в 1996-2000 гг. (Лекомцева и др., 2004), была выявлена динамика основных рас *P. graminis* f. sp. *tritici* за 10-и летний период.

В период с 1996 по 2000 гг. расовый состав возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы был относительно постоянным. Основные (по частоте встречаемости) расы отличались сходными фенотипами вирулентности, а доминирующие расы – МКС, МКСТ и РКСТ характеризовались большим числом генов вирулентности (9, 10 и 11, соответственно) (Лекомцева и др., 2004).

В 2001 году произошла смена состава доминирующих рас. В течение последующих лет высоковирулентные расы ТКНТ, ТТНТ, ТКНС и ТКСТ практически полностью вытеснили предыдущий набор. Только в 2002 году популяция *P. graminis* f. sp. *tritici* по фенотипическому составу проявила сходство с популяциями патогена 1996-2000 гг.

Обнаруженные колебания в расовом составе центрально-европейских выборок изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, наблюдаемые в течение 1996-2005 гг., выглядят как смена физиологических рас 11 (RKCT, RKBS) и 34 (МКСТ, МКСК, МКБК, МКBS, МКВТ) на расу 15 (ТКНТ, ТТНТ, ТКНС, ТКСТ, ТКПС, ТКНП, ТТСТ) (Roelfs, Martens, 1988).

Динамика рас *P. graminis* f. sp. *tritici* в течение 1996-2005 годов была сопоставлена с варьированием основных элементов климата в течение указанного периода. В сезоны пониженной влажности и относительно высоких температур (1996-2000 и 2002 гг.) доминировали гетерогенные физиологические расы 11 и 34. Вместе со сменой погодного режима на влажные июнь и июль с температурами ниже сезонной нормы преимущества получила высоко гетерогенная и высоко вирулентная раса 15. Выявленная закономерность может быть связана с различиями в экологии физиологических рас *P. graminis* f. sp. *tritici*. По данным Волковой (1978), физиологические расы 11 и 34 относятся к доминирующим в южных регионах (Украина, Северный Кавказ, Грузия, Армения), то есть предпочитают высокие температуры и терпимы к условиям засухи, что соответствует климатическому режиму, наблюдавшемуся в 1996-2000 и 2002 годах на территории Центрального региона России. Что касается расы 15 возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы, то помимо высокой агрессивности (в среднем 12,5 pp генов на клон) и пластичности за счет широкого набора вирулентных фенотипов (биотипов), была отмечена ее способность накапливаться в условиях пониженной температуры (Katsuya, Green, 1967). Эти особенности, вероятно, определили большую конкурентоспособность расы при установившемся за последние годы погодном режиме.

3. Отбор по признакам вирулентности в выборках моноурединальных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*

У биотрофа *P. graminis* наибольшую значимость в качестве фактора отбора имеет адаптация к паразитированию на растении-хозяине. Действие естественного отбора проявляется в различиях состава клонов гриба на растениях-хозяевах, динамике популяции во времени и т.д. Для определения влияния растения-хозяина на отбор клонов *P. graminis* f. sp. *tritici* по признаку вирулентности был проведен анализ реакций на заражение 16-ти изогенных линий пшеницы с различными Sr-генами (Лекомцева и др., 1994).

При подсчете частот генов вирулентности (pp) на разных растениях-хозяевах установлена авирулентность изолятов гриба к линии Sr-9b, близкая к 100%. Вирулентность к линиям Sr- 5, 6, 7b, 8a, 9d, 9c, 9g, 10 была близка к 100% во всех образцах популяции. Вариабельность клонов по вирулентности, в основном, отмечена

к линиям Sr - 21, 9e, 11, 30, 36, 13, Tmp. Данные 2001 -2005 годов проанализированы совместно с результатами исследования популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* в 1996-2000 годах (Лекомцева, 2004).

Ген Sr-6 использовался для выведения устойчивых сортов пшеницы в СССР и в ряде европейских стран в период 60-80-х годов прошлого столетия (Волкова, 1978). К настоящему моменту ген Sr-6 потерял дифференцирующую способность: практически каждый год частота встречаемости вирулентных к нему клонов гриба приближается к 100%.

Обнаружено, что некоторые гены авирулентности, вероятно, находятся в более или менее тесной ассоциации друг с другом. Как правило, клоны, авирулентные к линии Sr-21, были также авирулентны и к линии Sr-9e; то же прослеживалось и для пары линий с генами Sr- 30 и Sr- 36. При этом отбор в популяции патогена на протяжении всего десятилетия шел в сторону снижения их эффективности. Если в течение 1996-2000 годов авирулентные к ним клоны постоянно доминировали в популяции, то уже с 2003 года стала регистрироваться 100%-поражаемость линий, содержащих одновременно гены Sr- 30 и Sr-36 линии, а с 2004 года – линий с генами Sr-21 и Sr-9e.

В среднем неэффективный ген Sr-Tmp продемонстрировал достаточный уровень устойчивости к патогену в 1996, 1997, 2001 и 2003 году: в популяции наблюдалось от 26% до 44,4% авирулентных клонов к линии Sr-Tmp.

За последние пять лет выявлено возрастание числа клонов, вирулентных к гену Sr-11, ранее достаточно устойчивому к стеблевой ржавчине в России (Lekomtseva et al., 2004). В 2003 году была отмечена максимальная частота поражения этой линии – 71,4%.

Обнаруженное нарастание фенотипов, авирулентных к линии Sr-13, происходило скачкообразно. Чередясь со 100%-ной вирулентностью, степень патогенности популяции по отношению к гену Sr-13 значительно снижалась с каждым годом: в 1997 – 64% вирулентных клонов, в 1999 – 12,5%, 2001 – 10,7%, 2002 – 7,7% и, начиная с 2004 года, поражение практически отсутствовало. По всей вероятности, авирулентные к Sr-13 аллели косвенно, через сцепление, или непосредственно способны повышать выживаемость особей в популяции, что должно приводить к накоплению соответствующих генотипов при неблагоприятных условиях.

Таким образом, анализ типов реакции изогенных линий пшеницы выявил канализованную изменчивость популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* в течение 1996-2005 годов, обусловленную действием периодического отбора отдельных клонов, имеющих более высокие фенотипические показатели патогенности. Клоны гриба, авирулентные к Sr-генам 21, 9e, 36, 30, оказались постепенно вытесненными из популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* отбором по признаку вирулентности. Кроме того, показано, что Sr гены 9b и 13 эффективны для селекции на иммунитет к стеблевой ржавчине в России.

4. Роль барбариса и дикорастущих злаков в поддержании расового разнообразия возбудителя стеблевой ржавчины пшеницы и возобновлении инфекции

Высокая вредоносность *P. graminis* обуславливает необходимость постоянного мониторинга развития стеблевой ржавчины на основном (злаках) и промежуточном (барбарисе) растениях-хозяевах.

При оценке расового состава *P. graminis* f. sp. *tritici* на разных видах растений-хозяев в Московской области в 2001-2005 гг. выявлено, что в Центральном регионе России промежуточный хозяин может внести существенный вклад в изменчивость возбудителя стеблевой ржавчины. Коэффициент Шеннона (\bar{H}) на барбарисе составил 0,44. Меньшее разнообразие наблюдалось на диких злаках – коэффициент \bar{H} – 0,39. На пшенице выявлена наименьшая величина коэффициента Шеннона (\bar{H}) – 0,357.

Наши данные подтверждают высказанные Петерсоном с соавторами (Peterson et al., 2005) предположения о том, что независимо от объема посадок, занимаемых барбарисом в том или ином районе, эциальные популяции за счет полового процесса на промежуточном хозяине могут служить источником появления новых рас *P. graminis* f. sp. *tritici*. В таблице 3 отражено потенциальное влияние барбариса на текущее расовое разнообразие популяции патогена.

Таблица 3. Анализ эциопопуляций *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2001-2005 гг.

Год	2001	2002	2003	2004	2005
Доминирующие в сезоне расы (частота в эциопопуляции)	МКВТ (50%)	ТКНТ (100%)	ТТНТ (55,6%) МКНС (18,5%) ТКНТ (3,7%)	ТКНТ (42,9%)	ТКНТ (66,7%) ТТНТ (28,6%)
Редкие* расы (частота в эциопопуляции)	РКДЛ (16,7%) МКВQ (16,7%) РКНТ (16,7%)		ПКНТ (7,4%) МКНТ (3,7%)	ТТНТ (14%) ТКСТ (28,6%) ПКСТ (14%)	ТКНН (4,8%)
Всего клонов	6	3	27	21	21

* «редкие» расы встречаются с частотой менее 8% в генеральной популяции патогена в сезон.

Вместе с доминантами сезона, значительная доля эциопопуляции приходилась на фенотипы, часто не встречающиеся на злаках. Большая часть из них обычно обладает пониженной вирулентностью, что не дает им возможности закрепиться на зерновых и получить дальнейшее распространение (Смирнова, 1968), однако некоторые могут задерживаться и размножаться на дикорастущих злаках (Lekomtseva et al., 2004; 2005; 2006). Относительно высокий уровень разнообразия рас на диких злаках ($\bar{H} = 0,391$) указывал на их способность служить дополнительным источником инфекции для культурных видов.

При анализе динамики основных рас *P. graminis* f.sp. *tritici* в 2001-2005 году было отмечено, что доминирующие в отдельные года фенотипы не исчезают полностью в неблагоприятные сезоны, а с низкой частотой могут выделяться с барбариса среди эциопопуляций или с дикорастущих злаков среди урединиопопуляций (табл. 3).

В 2001, 2004 и 2005 годах в популяции *P. graminis* f.sp. *tritici* на пшенице и ячмене доминировала раса ТНКТ. Встречаемость расы заметно снизилась в 2002 и 2003 годах (до 5,1%), при этом она регистрировалась только в составе эциопопуляций. Доминирование в 2005 году высоковирулентной расы ТТНТ предшествовал «скрытый» процесс постепенного ее накопления в популяции *P. graminis* f.sp. *tritici*. Отмеченная в 2001 году на пшенице с низкой частотой 4%, в последующие годы эта раса наблюдалась только на барбарисе и дикорастущих злаках, пока снова не стала фиксироваться на пшенице.

В неблагоприятные для развития патогена сезоны высоко специализированная система устойчивости культурных злаков оказывается противопоставленной более мягкому режиму паразитирования на альтернативных растениях-хозяевах (Дьяков, 1998), что и определяет роль дикорастущих злаков в поддержании инфекции с последующим возобновлением ее масштаба.

К настоящему времени практически во всем мире устойчивость пшеницы к стеблевой ржавчине отличалась стабильностью в течение длительного времени. Однако в 2003 и 2004 годах большинство сортов современных пшениц в Кении и большинство образцов коллекции CIMMYT (www.cimmyt.org), выращиваемых в этой стране, оказались восприимчивыми к стеблевой ржавчине. При изучении вирулентности изолятов возбудителя идентифицирована новая высоковирулентная раса ТТКС, описанная впервые в Уганде в 1999 г., названная расой Ug99, которая оказалась вирулентной к гену Sr31, обычно устойчивому к стеблевой ржавчине во всех странах.

Известна масса примеров происхождения с барбариса рас, получивших впоследствии широкое распространение на пшенице: расы 56 в Северной Америке, 22 – в Австралии; расы, вызвавшие эпифитотию в Ирландии и других странах (Johnson, Newton, 1946; Стэкмен, Харрар, 1959; Цадокс, 1970). В связи с этим очевидна необходимость мониторинга рас *P. graminis* f.sp. *tritici* во всех регионах мира.

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВНУТРИВИДОВОЙ СТРУКТУРЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ СТЕБЛЕВОЙ РЖАВЧИНЫ ЗЛАКОВ

1. Анализ ДНК-полиморфизма области рибосомных генов моноурединальных изолятов *P. graminis*

Как показано в исследованиях видового и внутривидового полиморфизма фитопатогенных грибов, в частности ржавчинных, скорость эволюции межгенных спейсеров области рибосомных генов (транскрибируемых - ITS, ETS, и нетранскрибируемых – IGR) позволяет использовать эти участки генома в качестве

молекулярных маркеров для оценки изменчивости внутривидовых структур (White et al, 1990; Kim et al., 1992; Zambino, Szabo, 1993; Малеева и др., 2005; Abbasi, 2005).

На материале 2001 и 2002 годов был исследован полиморфизм длин ITS-и IGR-участков области рибосомных генов моноурединальных изолятов пшеничной и ржаной формы возбудителя стеблевой ржавчины

В результате полимеразной цепной реакции с праймерами ITS₄ и ITS₅ всегда амплифицировался одинаковый по размеру фрагмент, мажорный по интенсивности. У всех изученных изолятов как пшеничной, так и ржаной формы *P. graminis* длина транскрибируемого региона, содержащего некодирующие межгенные участки (ITS1-5,8S-ITS2), оказалась равной 660 пар нуклеотидов (п. н.).

Сабо и Замбино (Szabo, Zambino, 1995) при изучении изменчивости нуклеотидного состава участка ITS1-5,8S-ITS2 у различных представителей ржавчинных грибов также не обнаружили значительных различий в нуклеотидном составе ITS-фрагмента между отдельными изолятами пшеничной и ржаной форм *P. graminis*. Известно, что эти две формы легко скрещиваются между собой (Anikster, 1984), чем, вероятно, может обеспечиваться обнаруженное сходство ITS-фрагментов. Аналогичные результаты были получены у представителей другой группы фертильности – *P. graminis* f. sp. *poae* и *P. graminis* f. sp. *avenae* (Zambino, Szabo, 1993).

Таким образом, исследование внутривидовой изменчивости возбудителя стеблевой ржавчины с помощью ITS-маркеров ограничивается выделенными группами фертильности, внутри которых воспроизведение ITS-фрагмента характеризуется достаточной стабильностью.

На ITS-паттернах некоторых изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* (из Московской и Киевской областей) обнаружены дополнительные PCR-продукты, преимущественно минорные по интенсивности. Распространение новых генотипов среди сообществ патогена свидетельствует о высокой частоте рекомбинационных обменов между их членами. Так, для североамериканских популяций возбудителя стеблевой ржавчины злаков где значительную роль играет половой процесс либо парасексуальные обмены отмечен высокий уровень варибельности молекулярных маркеров (Burdon, Roelfs, 1985).

На территории Московской обл. на злаках и на барбарисе в 2001 г. был распространен один и тот же ITS-фенотип с обязательным мажорным фрагментом размером 660 п. н., и дополнительными минорными ITS-продуктами большего размера, порядка 1000 п. н. В Киевской обл. зафиксированы генотипы, отличающиеся по набору ITS-фрагментов. В двух из пяти случаях в результате ITS-PCR амплифицировался один продукт размером 660 п. н., другим вариантом был молекулярный ITS-фенотип, состоящий из двух фрагментов: 660 и 500 п. н. Можно предположить, что указанные ITS-фенотипы могли возникнуть в результате полового процесса на промежуточном хозяине *P. graminis* – барбарисе.

На территории Северного Кавказа половой процесс имеет значение в жизненном цикле *P. graminis* в горных и прилегающих к ним районах (Смирнова, 1968). Перезимовка гриба только в урединиостадии обычно обуславливает эффект генетического «бутылочного горлышка» (bottleneck effect), так как популяционное разнообразие ограничено лишь потомством выживших урединиоспор (McCallum et al., 1999). Изоляты 2001 г. из Ростовской обл. (степной части Северокавказского региона) с одним мажорным продуктом ITS-PCR, вероятно, произошли из клональной группы, где данная структура ITS-участка поддерживалась отбором в ряду бесполок поколений урединиоспор.

Среди структурных единиц области рибосомных генов с наибольшей скоростью эволюционируют нетранскрибируемые межгенные спейсеры, что позволяет использовать их для изучения близкородственных отношений, включая внутривидовые. Установлено, что длина IGR-участка рибосомного оперона различается среди видов и рас ржавчинных грибов (Kim et al., 1992). В связи с этим был исследован полиморфизм длин IGR-участков у изолятов пшеничной и ржаной форм *P. graminis*, происходящих из разных областей и с различных растений-хозяев.

Каждая специализированная форма отличалась своим IGR-фенотипом: у изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* в результате IGR-PCR амплифицировался один продукт

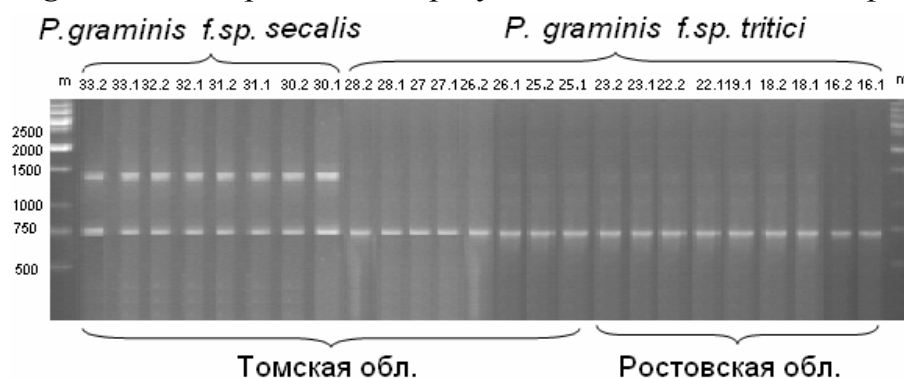


Рис. 1. IGR-фенотипы изолятов пшеничной (16.1–28.2) и ржаной формы (30.1–33.2) *P. graminis* (из коллекции 2005г.), амплифицированные с праймерами Q и Y; m – маркер GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas

размером 730 п. н., в то время как у изолятов *P. graminis* f. sp. *secalis* всегда амплифицировались два PCR-продукта – 730 и 1400 п. н. (рис. 1).

Таким образом, при исследовании внутривидовых структур возбудителя стеблевой ржавчины злаков был продемонстрирован различный уровень значимости маркеров области рибосомных генов. Длина ITS-участка оказалась одинаковой среди исследованных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. graminis* f. sp. *secalis*. Выявленная IGR-изменчивость изолятов позволила отличить специализированные формы (ржаную и пшеничную) *P. graminis* при развитии на различных злаках.

2. RAPD-полиморфизм моноуредиальных изолятов *P. graminis*

Применение неспецифических праймеров, на чем основан метод RAPD-PCR, повышает количество анализируемых признаков (PCR-продуктов) и обеспечивает информацией об индивидуальных особенностях генома. Чувствительность метода отвечает требованиям исследований, касающихся изменчивости внутри отдельных

специализированных форм ржавчинных грибов (Chen et al., 1995; Kolmer et al., 1995; McCallum et al., 1999; Малеева и др., 2003а).

RAPD-полиморфизм широкой выборки моноурединальных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. graminis* f. sp. *secalis* исследован с использованием праймеров RP₃ и Core, продемонстрировавших свою эффективность на большой группе грибов, в том числе и возбудителе стеблевой ржавчины пшеницы (Малеева и др., 2003а). Молекулярные фенотипы изолятов (генотипы, полученные с помощью RAPD-PCR), представляли собой наборы фрагментов разной длины (рис. 2).

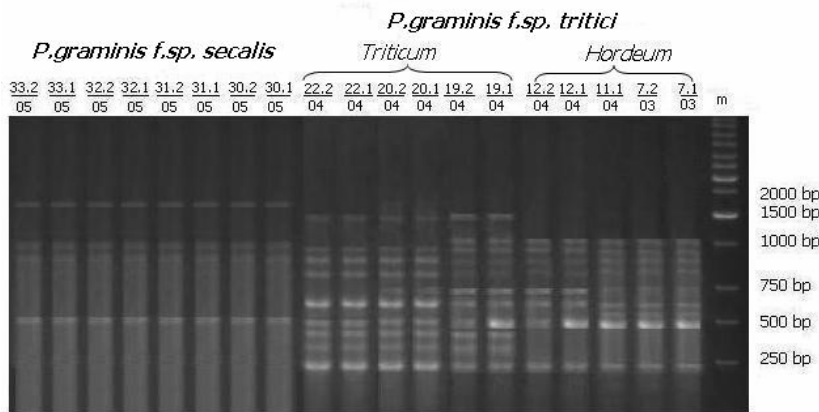


Рис. 2. RAPD-полиморфизм изолятов пшеничной (№№ 7.1/03–22.2/04) и ржаной (№№ 30.1/05–33.2/05) форм *P. graminis*, полученный со случайным праймером Core; m – маркер, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, Fermentas

Среди изолятов пшеничной формы было обнаружено наибольшее число генотипов: 8 и 9 (с помощью праймеров RP₃ и Core, соответственно), при этом на долю полиморфных фрагментов пришлось 50% и 54% (табл. 3). Среди изолятов ржаной формы при проведении PCR-реакции с указанными праймерами выявлено только по одному генотипу с низким количеством признаков (до 4 воспроизводящихся PCR-продуктов). Таким образом, полиморфизм Core- и RP₃- маркеров позволил различить специальные формы *P. graminis*, а также установить сложную структуру пшеничной формы.

С целью повышения количества информативных признаков, RAPD-полиморфизм изолятов пшеничной формы был исследован с помощью праймеров CRL-7, CRL-9 и CRL-11, насыщенных GC-нуклеотидами и рекомендованных для *P. graminis* f. sp. *tritici* (Kubelik & Szabo, 1995). Для анализа изолятов ржаной формы были использованы праймеры № 402, 556, 489, 521, 450, 517, успешно применявшиеся для изучения структуры вида *P. recondita* (Kolmer et al., 1995; Малеева и др., 2003б).

В таблице 3 приведена структура и сравнительная характеристика всех использованных в работе праймеров. Молекулярные фенотипы изолятов, полученные с помощью выбранных праймеров, продемонстрировали высокую степень полиморфизма (рис. 4). Была выявлена гетерогенность RAPD-профилей изолятов *P. graminis* f. sp. *secalis*, а для изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* получено большее количество информативных признаков (в среднем 22 на паттерн) по сравнению с Core- и RP₃- маркерами (в среднем 11). Доля полиморфных фрагментов возросла от 0% до 53,3% и от 52% до 73% среди молекулярных фенотипов ржаной и пшеничной форм патогена, соответственно. Дендрограммы сравнения изолятов *P. graminis* f. sp. *secalis*

и *P. graminis* f. sp. *tritici*, построенные по данным тестируемого набора праймеров, характеризовались большей степенью устойчивости (85,4% и 75,9% - средние значения индекса бутстрепа) по сравнению с оценками достоверности кластеризации RAPD-фенотипов, полученных при использовании Core- и RP₃-праймеров (64,68% - среднее значение индекса бутстрепа) (табл. 3).

Таблица 3. Используемые праймеры и характеристика RAPD-полиморфизма изолятов

Праймер	Структура праймера	Количество полиморфных фрагментов, доли, %	Среднее значение индекса бутстрепа ¹ , %
Изоляты <i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> (<i>Pgt</i>) и <i>P. graminis</i> f. sp. <i>secalis</i> (<i>Pgs</i>)			
Core	GAGGGTGGX-GGXTCT	7/13, 54 – для <i>Pgt</i> - изолятов 0 – для <i>Pgs</i> -изолятов	69,06
RP₃	(GTG) ₅	4/8, 50 – для <i>Pgt</i> - изолятов 0 – для <i>Pgs</i> -изолятов	60,3
Среднее значение		6/11, 52 – для <i>Pgt</i> - изолятов 0 – для <i>Pgs</i> -изолятов	64,68
Изоляты <i>P. graminis</i> f. sp. <i>secalis</i> (<i>Pgs</i>)			
№ 521	CCGCCCCACT	5/13, 38	85,5
№ 489	CGCACGCACA	7/17, 41	76,8
№ 402	GGAAGGCTGT	7/13, 54	87,75
№ 450	CGGAGAGCCC	8/12, 67	86,67
№ 556	ATGGATGACG	10/18, 56	81,67
№ 517	GGTCGCAGCT	9/14, 64	84,5
Суммарная матрица		46/87, 52	95
Среднее значение		8/15, 53,3	85,4
Изоляты <i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> (<i>Pgt</i>)			
CRL-11	CCACCGCGCC	18/22, 82	74,8
CRL-9	CAGCCGCCCC	18/24, 75	77,9
CRL-7	GCCCCGCGCC	13/20, 65	62,1
Суммарная матрица		49/66, 74	89
Среднее значение		16/22, 73	75,9

¹ – оценка устойчивости дендрограмм сравнения изолятов при кластеризации их RAPD-фенотипов (Treeson for Windows).

Таким образом, для каждой специализированной формы были определены наборы праймеров, эффективно характеризующие их внутривидовую изменчивость.

Исследование структуры *P. graminis* f. sp. *secalis* с помощью подобранного набора праймеров (табл. 3) проводилось на выборке изолятов, собранных в 2002 году с разных растений-хозяев в Московской области. Полиморфизм продуктов амплификации был обнаружен во всех случаях, при этом наибольшее количество переменных признаков обеспечивали праймеры №№ 556, 517, 450.

Дендрограмма, полученная на основе суммарной матрицы по паттернам амплификации с использованием индивидуальных праймеров, оказалась наиболее устойчивой (средний процент бутстрепа 95%) (рис. 3). Обособились четыре группы

изолятов с высокой степенью гомогенности RAPD-маркеров (индекс бутстрепа для каждой группы 100%). Группы изолятов со ржи (*Secale*) и пырея (*Elytrigia*) объединились в один кластер, для которого группа изолятов с плевела (*Lolium*) оказалась сестринской. Наибольшее отличие проявили изоляты с тимopheевки (*Phleum*).

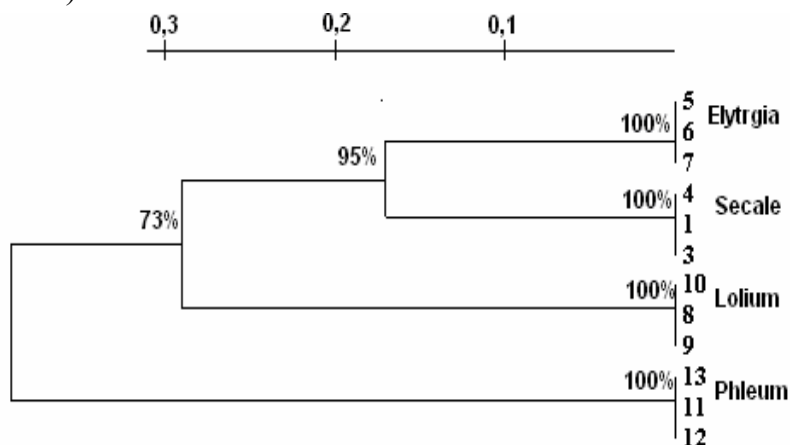


Рис. 3. Дендрограмма сходства изолятов *P. graminis* f. sp. *secalis* с разных растений-хозяев, построенная на основе суммарной матрицы по всем праймерам (№№ 521, 489, 402, 450, 556, 517)

Полиморфизм RAPD-маркеров, полученный как при использовании отдельных праймеров, так и при анализе суммарных данных, обнаружился на уровне групп изолятов, различающихся источником заражения, причем каждая такая группа проявила высокий уровень гомогенности по выбранным маркерам. Таким образом, группоспецифическая RAPD-изменчивость соответствовала исходной специализации паразита по отношению к растению-хозяину.

Полученная дифференциация групп изолятов возбудителя ржаной формы ржавчины находилась в соответствии с таксономическим положением растений-хозяев, с которых был собран спорный материал для анализа. По традиционной классификации злаков (Цвелев, 1987), рожь (*Secale*) и пырей (*Elytrigia*) принадлежат к одной трибе Пшеницевые (Triticeae), плевел (*Lolium*) входит в состав большой трибы Мятликовые (Poeae), а тимopheевка (*Phleum*) относится к самостоятельной трибе Тимофеевковые (Phleae).

Сходство изолятов гриба, поражающих близких в таксономическом отношении растений-хозяев, можно, по-видимому, объяснить сходством их типов обменов веществ. Однако как было отмечено Абасси (Abassi, 2005), анализировавшего нуклеотидный состав рДНК возбудителя стеблевой ржавчины с разных растений-хозяев, пока недостаточно данных по нуклеотидным последовательностям и информативности фрагментов генома самих растений-хозяев для обсуждения коэволюционного аспекта формирования комплекса таксономических единиц внутри сложного вида *P. graminis*.

Набор богатых GC-нуклеотидами праймеров (табл. 3) был применен для исследования RAPD-полиморфизма изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, собранных в 2005 году на территории Московской, Томской и Ростовской областей с барбариса, культурных и диких злаков. Во всех случаях обнаружен высокий уровень полиморфизма продуктов амплификации (рис. 4).

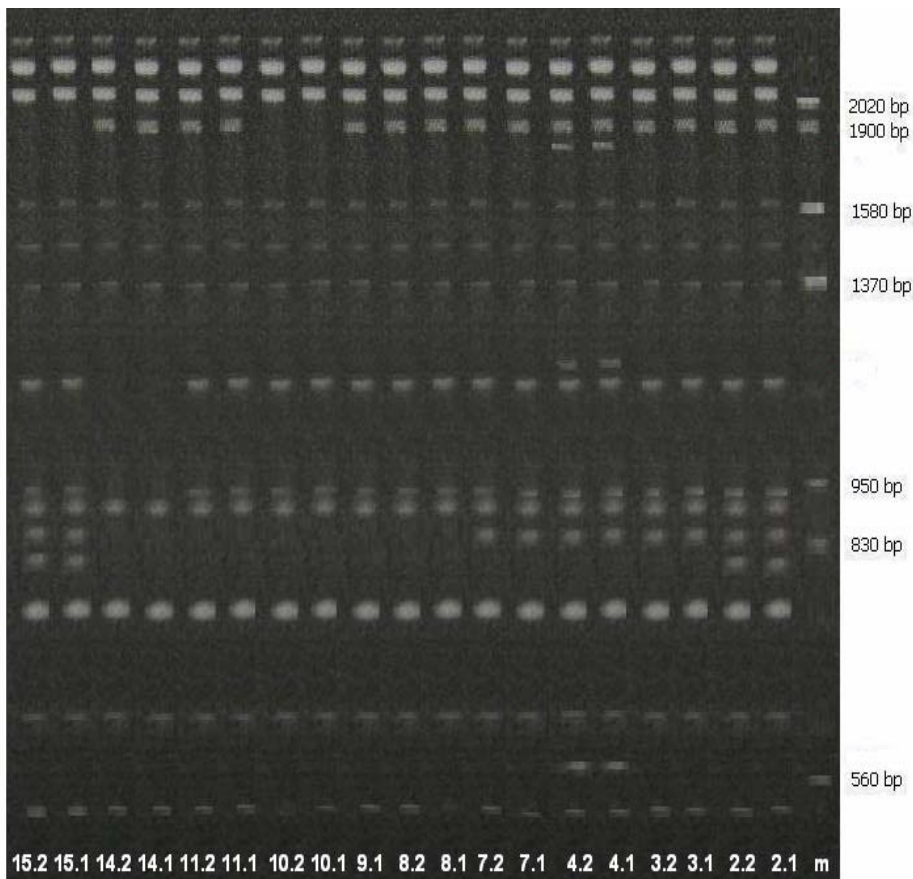


Рис. 4. RAPD-полиморфизм изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, полученный с праймером CRL-7, богатыми GC-нуклеотидами; m – маркер: ДНК фага λ , гидролизованная с помощью ферментов рестрикции *Hind*III-*Eco*RI, Fermentas

Дендрограммы сравнения обладали значительным структурным сходством. Стабильно выделялись два основных кластера, поддерживаемых высокими значениями индекса бутстреп. Наиболее устойчивой по среднему значению бутстрепа (89%) была дендрограмма по данным со всего набора праймеров (рис. 5).

Явно выраженными на дендрограммах внутри центрально-европейского кластера оказались группировки изолятов с пшеницы (*Triticum*) (монофилия группы до 91% случаев), ячменя (*Hordeum*) (до 75%), барбариса (*Berberis*) (до 86%), уровень объединения которых не превышал 0,2 генетических условных единиц. При этом вклад географического происхождения изолятов был на уровне индивидуальных различий. На суммарной дендрограмме внутри группировок по растениям-хозяевам (по пшенице и ячменю) изоляты образовали отдельные совокупности по областям (Московской и Ростовской).

По данным RAPD-анализа были вычислены основные показатели генетического и генотипического разнообразия выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*. Доля клональной фракции (CF) (Zhan et al., 2003) в выборке составила в среднем 59,65%. Индекс Шеннона (H) (Мэгарран, 1992; Goodwin et al., 1995) был использован для оценки генотипического разнообразия между изолятами и принимал высокие значения, от 5,29 до 7,94 в зависимости от выбора праймера из CRL-набора. По данным Мироненко по гембиотрофным грибам *Pyrenophora* и *Cochliobolus* низкая доля клональной фракции (0-60%) в популяции и высокое генотипическое разнообразие характеризует узкую специализацию паразита (Мироненко, 2005). Таким

образом, для высоко специализированного патогена *P. graminis* f. sp. *tritici* была обнаружена та же закономерность (соотношение генотипических показателей CF и H).

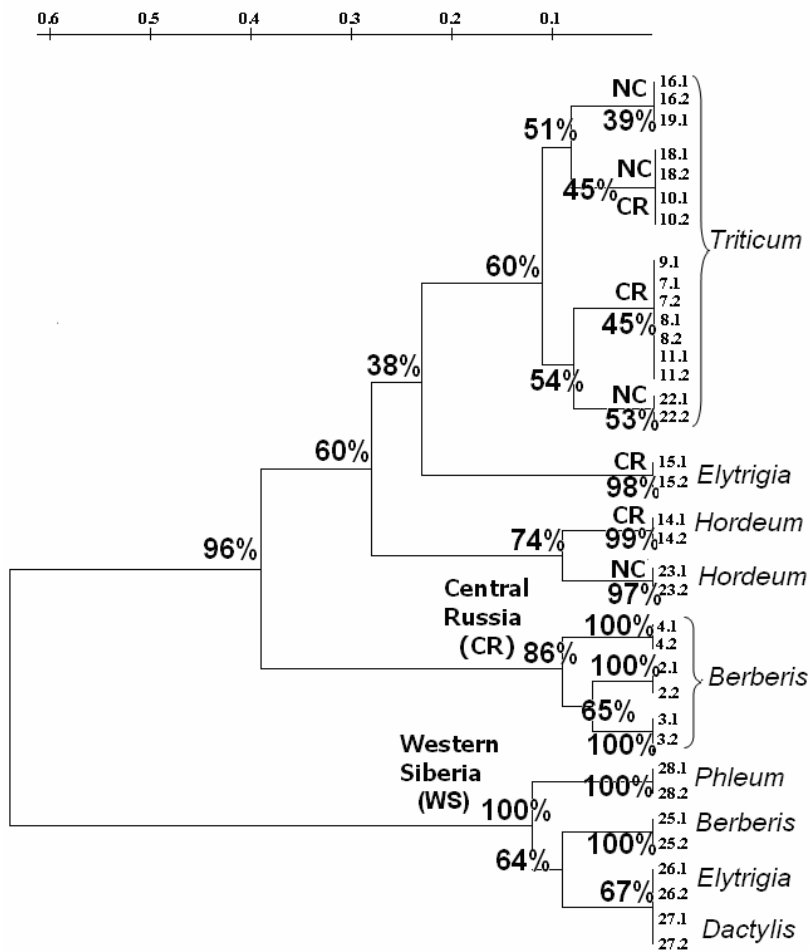


Рис. 5. Дендрограмма сходства изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* с разных растений-хозяев и регионов страны, построенная на основе матрицы по всем праймерам CRL-11, CRL-9, CRL-7; Central Russia (CR) – Центральный регион, Northern Caucasus (NC) – Северный Кавказ, Western Siberia (WS) – Западная Сибирь

Величина индекса Шеннона для популяции обычно укладывается в интервал от 1,5 до 3,5 и очень редко превышает 4,5 (Мэгарран, 1992). Полученное нами по данным RAPD-анализа высокое значение генотипического разнообразия, в среднем $H = 7,43$, позволило предположить влияние дивергентных процессов на формирование сложной гетерогенной структуры выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* с образованием некоторых субпопуляционных сообществ патогена.

Мерой генетической подразделенности популяции является индекс F_{ST} (Алтухов, 2003). Высокое значение показателя генетической дифференциации между изолятами из Западной Сибири (Томской области) и центрально-европейской части России (Московской и Ростовской областей) ($F_{ST} 0,413$) вместе с кластеризацией изолятов на дендрограммах дают основание говорить об отличиях данных выборок *P. graminis* f. sp. *tritici* и существовании генетической обособленности между ними.

Для выяснения фактора, определяющего дифференциацию RAPD-фенотипов центрально-европейской выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, были проверены варианты их группировки по географическому происхождению и исходному

растению-хозяину. Значения индекса F_{ST} , превышающие 0,25, считались значимыми для оценки генетической дивергенции (Мироненко, 2005; Hartl, Clarke, 1997).

Вывод об отсутствии корреляции между ДНК-полиморфизмом и происхождением изолятов из данной выборки был сделан на основании низкого значения индекса F_{ST} (0,229). Группировка изолятов по растениям-хозяевам привела к получению наибольшего показателя (0,601). Таким образом, как результаты кластерного анализа, так и степень дифференциации выборок изолятов указывают на растение-хозяина как на основной фактор дивергенции патогена.

Генотипическое разнообразие дивергирующих по растению-хозяину групп было оценено с помощью статистики Шеннона.

Группа изолятов *P. graminis* f.sp. *tritici*, выделенных с пшеницы, отличалась наибольшим разнообразием набора CRL-фенотипов, в среднем $H_S = 3,120$. Генотипическое разнообразие внутри групп изолятов с барбариса и дикорастущих злаков не превышала 1,969. Таким образом, установлена различная степень дифференциации выборок изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* на растениях-хозяевах, генетически и экологически отличающихся друг от друга.

3. Изоферментный анализ моноурединальных изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*

Генетическое разнообразие изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* из Московской и Ростовской областей коллекции 2004 года сбора было охарактеризовано по изозимным спектрам малатдегидрогеназы (МДГ). Эта ферментная система применялась для оценки генетического разнообразия патогена стеблевой ржавчины и, в частности, полиморфности географических изолятов пшеничной формы гриба (McCallum et al., 1999; Малеева и др., 2003а). Исследуемые образцы содержали экстракты листьев пшеницы с пустулами.

При изучении спектров изозимов малатдегидрогеназы изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* обнаружен полиморфизм фермента. На изоферментных паттернах выявлено 12 переменных признаков. Кластерный анализ МДГ-спектров с помощью программы Treescan for Windows продемонстрировал гетерогенную структуру выборки изолятов. Значения индекса бутстрепа для отдельных группировок варьировали от 15% до 97%. Изоляты с барбариса (*Berberis*) Московской области выделялись в один кластер с достоверностью 15% на уровне 0,7 единиц генетической дистанции. Группировки изолятов со злаков объединялись с вероятностью 24%. Кластерная структура выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* по изоферментным спектрам малатдегидрогеназы была в целом неустойчивой, со средним значением индекса бутстрепа - 45,12%.

Генетическое разнообразие выборки изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* по данным изоферментного анализа описывалось высоким значением индекса Шеннона, $H = 7,439$, а степень дифференциации географических изолятов - относительно небольшой величиной показателя подразделенности популяции, $F_{ST} = 0,347$.

Таким образом, по результатам кластерного анализа и значениям показателей популяционного разнообразия, выборка изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici* отличается высокой гетерогенностью состава МДГ-фенотипов, причем степень их дифференциации практически не позволила выделить устойчивые группировки изолятов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с наблюдающейся в последние годы депрессией развития возбудителя стеблевой ржавчины на производственных посевах зерновых культур, приобретает актуальность вопрос об условиях сохранения инфекции в биоценозах. Широкий уровень специализации гриба способствует сохранению патогена на дополнительных растениях-хозяевах – диких видах злаков. Изучение изменчивости внутривидовых структур *P. graminis* представляет интерес как с фундаментальных – выяснение стратегий сохранения вида в природе, так и с практических позиций – установление потенциальных источников инфекции для развития гриба в агроценозах.

Значение растений-хозяев (барбариса и злаков), а также климатических показателей во время «критического» для развития инфекции периода было показано при изучении вирулентности и состава фенотипов *P. graminis* f. sp. *tritici*. Анализ типов реакции изогенных линий пшеницы обнаружил канализованную изменчивость популяции *P. graminis* f. sp. *tritici*, обусловленную действием периодического отбора отдельных клонов, имеющих более высокие фенотипические показатели патогенности. Молекулярные и биохимические маркеры (RAPD-, ITS-, IGR-, МДГ-полиморфизм) продемонстрировали высокий уровень изменчивости изолятов *P. graminis* на внутривидовом уровне и ее групповой характер, а также позволили различить изоляты, принадлежащие к разным специальным формам (*P. graminis* f. sp. *tritici* и f. sp. *secalis* по ITS- и RAPD-профилям).

Среди изолятов *P. graminis* f. sp. *tritici*, представляющих доминирующую расу (TKNT) на территории России в 2004 и 2005 годах, были зафиксированы высокий уровень RAPD- и МДГ-изменчивости. Низкое соответствие между группировками, выделенными на основе вирулентности, молекулярных RAPD- и МДГ- маркеров, говорит в пользу участия генетической рекомбинации той или иной природы в определении структуры популяции патогена на территории России. Такая закономерность обычно прослеживается для популяций ржавчинных грибов, в формировании которых активную роль играет половой процесс или парасексуальная рекомбинация (Burdon, Roelfs, 1985; Chen et al., 1995; Малеева и др., 2003а).

Анализ вирулентности и молекулярного полиморфизма патогена на разных растениях-хозяевах в некоторых регионах России позволил установить вероятные источники инфекции стеблевой ржавчины пшеницы, выявить возможную роль растения-хозяина в формировании структуры популяций гриба и подтвердить необходимость мониторинга расового состава для проведения мероприятий, ограничивающих развитие крайне агрессивного для зерновых культур патогена.

ВЫВОДЫ

1. На территории Центрально-Европейской части России и Западной Сибири возбудитель стеблевой ржавчины злаков представлен преимущественно двумя основными патогенными массивами (сообществами), различающимися по специализации к растению-хозяину (*P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. graminis* f. sp. *secalis*) и по молекулярным маркерам (IGR-полиморфизм).

2. Выборки *P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. graminis* f. sp. *secalis* являются гетерогенными по структуре, обнаруживая изменчивость изолятов как по набору генов вирулентности (*P. graminis* f. sp. *tritici*), так и на уровне ДНК-полиморфизма отдельных участков генома (*P. graminis* f. sp. *tritici* и *P. graminis* f. sp. *secalis*).

3. Результаты комплексного анализа изменчивости изолятов *P. graminis* позволяют выделить основные факторы дивергенции внутри выборок: географическое происхождение изолятов и растение-хозяин. По растению-хозяину дивергенция идет вплоть до образования отдельных генетически устойчивых группировок.

4. Показан различный вклад в изменчивость патогенной популяции основного (культурные злаки), промежуточного (барбарис) и альтернативного (дикорастущие злаки) хозяина. Половая рекомбинация на барбарисе повышает генетическое разнообразие патогена: для эциопопуляций значение коэффициента Шеннона максимально.

5. Генетика устойчивости основного растения-хозяина обуславливает направления отбора в популяции гриба по признаку вирулентности (к настоящему времени сохраняют эффективность гены Sr-9b и 13); и вместе с климатическими условиями определяет доминантные фенотипы (в течение 1996-2000 гг. набор биотипов физиологической расы 15 вытеснил расы 34 и 11).

6. Альтернативный хозяин способствует поддержанию *P. graminis* в природе, в результате обеспечивается сохранение вида, сопровождаемое повышением степени вариабельности индивидов, о чем свидетельствует высокое разнообразие расового состава исследованных выборок патогена и степень изменчивости молекулярных маркеров.

7. Динамика основных рас со сменой доминантов и высокое расовое разнообразие патогенной популяции *P. graminis* f. sp. *tritici* в 2001-2005 гг. указывают на необходимость постоянного мониторинга расового состава для своевременного проведения мероприятий, ограничивающих развитие крайне важного для зерновых культур патогена.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лекомцева С.Н., Малеева Ю.В., Инсарова И.Д., **Сколотнева Е.С.**, Чайка М.Н. Оценка изменчивости биотрофных видов грибов // "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития" Материалы III Съезда ВОГиС. М., 2004. Т.1, с. 457.
2. **Сколотнева Е.С.** Комплексный подход для анализа изменчивости специальных форм возбудителя стеблевой ржавчины // Материалы юбилейной конференции, посвященной 85-летию кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В.Ломоносова. М., 2004, с. 124.
3. **Сколотнева Е.С.** RAPD-полиморфизм и влияние растения-хозяина на внутривидовую структуру *Puccinia graminis* f.sp. *secalis* // Тезисы докладов XI международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2004», секция «Биология». М., 2004, с. 144.
4. Малеева Ю.В., Лекомцева С.Н., **Сколотнева Е.С.** Влияние растения-хозяина на молекулярный полиморфизм возбудителя стеблевой ржавчины ржи (*Puccinia graminis* f. sp. *secalis*) // «Грибы в природных и антропогенных экосистемах». Труды Международной конференции, посвященной 100-летию начала работы профессора А.С. Бондарцева в Ботаническом институте им. В.Л. Комарова РАН. СПб, 2005, с. 339-343.
5. Лекомцева С.Н., **Сколотнева Е.С.**, Малеева Ю.В., Инсарова И.Д., Чайка М.Н. Оценка изменчивости возбудителя стеблевой ржавчины злаков *Puccinia graminis* Pers. на разных стадиях онтогенеза гриба//«Фитосанитарное оздоровление экосистем». Второй Всероссийский съезд по защите растений. СПб, 2005. Т. 1, с. 498-501.
6. **Сколотнева Е.С.**, Лекомцева С.Н. Анализ вирулентности и RAPD-полиморфизма популяций *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* на территории России и Украины в 2001 году // Тезисы докладов XII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005», секция «Биология», М., 2005, с. 149.
7. **Сколотнева Е.С.**, Малеева Ю.В., Инсарова И.Д., Лекомцева С.Н. Полиморфизм специальных форм возбудителя стеблевой ржавчины злаков (*Puccinia graminis*) // «Грибы и водоросли в биоценозах – 2006». Материалы международной конференции, посвященной 75-летию Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова: Москва, 31 января-3 февраля 2006 г. М., 2006, с.145.
8. Лекомцева С.Н., Волкова В.Т., Зайцева Л.Г., **Сколотнева Е.С.**, Чайка М.Н. Анализ вирулентности изолятов *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* с разных растений-хозяев // Микология и фитопатология. 2007. Т. 41, вып. 6, с. 554-563.
9. **Skolotneva E. S.**, V.T. Volkova, Yu. V. Maleeva, L.G. Zaitseva, and S.N. Lekomtseva The analysis of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* populations in the Russian Federation and the Ukraine in 2001 // Annual Wheat Newsletter, 2005. Vol. 51, p. 112-115.
10. **Skolotneva E.S.**, Maleeva Yu.V., Insarova I.D., Lekomtseva S.N. Molecular variability of *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* on various plant-hosts in some regions of the Russian Federation in 2003 and 2004 // Annual Wheat Newsletter, 2007. Vol. 53, p. 67-69.
11. Lekomtseva S.N., Volkova V.T., Zaitseva L.G., Chaika M.N., **Skolotneva E.S.** Races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Russian Federation in 2001-2005. Annual Wheat Newsletter. Vol. 53. August 2007, p. 65-67.
12. Lekomtseva S.N., **Skolotneva E.S.**, Maleeva Yu.V. Variability of the biotrophic fungus *Puccinia graminis* Pers. f.sp. *tritici* on different host plants // Proceedings of the XV Congress of European mycologists. Russia. St Petersburg. September 2007, p. 259.

13. Лекомцева С.Н., Волкова В.Т., Зайцева Л.Г., **Сколотнева Е.С.** Мониторинг вирулентности *Puccinia graminis* Pers. на диких злаках в некоторых регионах России // Общие проблемы мониторинга природных экосистем. Сб. статей Всероссийской научно-практической конф. Пенза, 2007, с. 80-84
14. Малеева Ю.В., **Сколотнева Е.С.**, Лекомцева С.Н. Молекулярные подходы для исследования роли комбинативной изменчивости и дивергенции популяций в микроэволюции фитопатогенных грибов // Материалы конференции «Современные проблемы биологической эволюции» к 100-летию Государственного Дарвиновского музея 17-20 сентября 2007г. М., с. 181-182.
15. **Skolotneva E.S.**, Lekomtseva S.N., Maleeva Y.V., Insarova I.D. Molecular and virulence variability of Russian isolates of wheat and rye stem rust (*Puccinia graminis* f.sp. *tritici* and f.sp. *secalis*) in 2001-2005 // ICPP 2008 9th International Congress of Plant Pathology, August 24-29, Turin, Italy. Book of abstracts. In Journal of Plant Pathology, 2008. Vol. 90 (2, Supplement), p. 351.
16. Lekomtseva S.N., Volkova V.T., Zaitseva L.G., **Skolotneva E.S.**, Chaika M.N. Races of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Russian Federation in 2006 // Annual Wheat Newsletter, 2008. Vol. 54, p. 188-119.
17. **Skolotneva E.S.**, Lekomtseva S.N. RAPD distribution of Russian isolates of *P. graminis* f. sp. *tritici* by the high-GC primers // Annual Wheat Newsletter, 2008. Vol. 54, p. 119-121.
18. **Сколотнева Е.С.**, Инсарова И.Д., Малеева Ю.В., Лекомцева С.Н. Использование белковых и молекулярных маркеров при оценке внутривидовой изменчивости *Puccinia graminis* Pers. // «Современная микология в России». Второй съезд микологов России. Тезисы докладов. М., 2008. Т.2, с.205.
19. **Сколотнева Е.С.**, Малеева Ю.В., Инсарова И.Д., Лекомцева С.Н. Генетическое разнообразие изолятов *Puccinia graminis* Pers. f.sp. *tritici* и *P. graminis* f.sp. *secalis* // Микология и фитопатология. 2008. Т.42. В.4, с. 374-385.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность научному руководителю Лекомцевой С.Н., сотрудникам – кафедры микологии и альгологии Инсаровой И.Д., Зайцевой Л.Г., Чайке М.Н., Волковой В.Т., Еланскому С.Н.; кафедры молекулярной биологии Колесникову А.А., Малеевой Ю.В., Калебиной Т. С.; а также доценту кафедры ботаники Южного государственного университета Русанову В. А. и доценту Томского государственного университета Чикину Ю. А. за предоставленный материал для исследования. Глубокая признательность всему коллективу кафедры микологии и альгологии. Огромное спасибо моей семье за постоянную поддержку и внимание.