

УДК632.4:582.284.21

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ПОПУЛЯЦИЙ ВОЗБУДИТЕЛЯ БУРОЙ РЖАВЧИНЫ ПШЕНИЦЫ

Е.И. Гультяева, И.А. Казарцев

Всероссийский НИИ защиты растений, Санкт-Петербург

Исследования популяций возбудителя бурой ржавчины *Puccinia triticina* Erikss. имеют почти вековую историю. В данном обзоре проанализированы традиционные фитопатологические и современные молекулярные методические подходы, используемые при изучении *P. triticina*. Обобщены результаты анализа российских популяций *P. triticina* по признаку вирулентности и внутривидовому и межвидовому разнообразию патогена по ДНК-полиморфизму. Обсуждены достоинства и недостатки RAPD, AFLP и SSR анализов для популяционных исследований *P. triticina*. Представлены оригинальные результаты анализа российских популяций с использованием RAPD и SSR маркеров. С середины 2010 гг. для изучения микроэволюции популяций *P. triticina*, обитающих на мягкой и твердой пшенице, подобраны SNP-маркеры. Обсуждается отработка методического подхода для оценки филогенетического родства между дербентскими изолятами *P. triticina*, полученными с видов *Triticum* sp. и *Aegilops* sp. разной ploидности, и актуальность его использования в популяционных исследованиях. Охарактеризованы перспективы создания и практического применения новых молекулярно-генетических диагностических систем для мониторинга популяций *P. triticina*, отслеживания появления новых рас, их распространения и миграции.

Ключевые слова: *Puccinia triticina*; RAPD; SNP; SSR маркеры; вирулентность; *Lr*-гены.

Условием успешной селекции на устойчивость пшеницы к бурой ржавчине является не только наличие достаточного количества генетически разнородных доноров устойчивости к болезни, но и знание закономерностей изменчивости популяций возбудителя (*Puccinia triticina* Erikss.). Для исследования популяций *P. triticina* могут быть использованы такие маркирующие признаки как вирулентность, изозимные спектры и ДНК-полиморфизм.

Вирулентность. История изучения популяций возбудителей ржавчинных болезней началась со времени, когда было выяснено, что вирулентность является дифференциальным признаком по отношению к сортам пшеницы и наследуется как обычный менделевский признак [Mains, Jackson, 1926; Newton, Johnson, 1932]. До настоящего времени для ржавчинных грибов – облигатных паразитов – вирулентность к изогенным линиям, различающимся по генам устойчивости, является наиболее доступным и информативным фенотипическим признаком [Михайлова и др., 2000]. До конца 1960 годов для изучения структуры популяций использовали восемь сортов-дифференциаторов, предложенных Е.В. Mains и Н.С. Jackson [1926]: Malakoff (ген *Lr1*), Carina (*Lr2b=Lr2²*), Brevit (*Lr2c=Lr2³*), Webster (*Lr2a*), Loros (*Lr2⁴*), Mediterranean (*Lr3a*), Hussar (*Lr11*), Democrat (*Lr3a*). Затем P.L. Dyck и D.J. Samborski [1968] создали набор моногенных линий на основе сорта Thatcher. Линии получены посредством беккроссов, сходны по генотипу, но отличаются по одному из генов устойчивости. К настоящему времени идентифицировано свыше 77 *Lr*-генов, среди них гены с *Lr1* до *Lr38*, а также *Lr44*, *Lr45*, *Lr51*, *Lr52*, *Lr60*, *Lr64*, *Lr67* введены в генотип сорта Thatcher (*TcLr*), а остальные представлены в исходных образцах-донорах, большинство из которых не являются моногенными, что отражается на результатах анализа вирулентности.

Во второй половине 20-го века в различных странах, в том числе и России, была получена обширная информация о расовом составе популяций ржавчинных грибов. В 1981–2000 гг. Л.А. Михайлова с использованием оригинального набора тестеров вирулентности определила существование нескольких популяций *P. triticina* в России и СНГ: европейской, занимающей территорию от северо-западной

части РФ до Поволжья, азиатской (Урал, Казахстан, Западная Сибирь), кавказской (Грузия, Азербайджан, Дагестан, Северная Осетия, Чечено-Ингушетия) и дальневосточной [Михайлова, 2006]. В этот же период различия между кавказской и европейской популяциями гриба показаны Г.К. Сорокиной с соавторами [1990], а между европейской и среднеазиатской А. Амановым [1984]. Дифференциация между европейскими и азиатскими популяциями *P. triticina* сохранялась и последующий период [Гультяева и др., 2009; 2015; Коваленко и др., 2010, 2012].

Следует отметить, что на результаты анализа вирулентности и частоту встречаемости фенотипов существенное влияние оказывает наличие генов устойчивости в растении-хозяине, что обуславливает направленный селективный отбор. Например, в США D.L. Long с соавторами в 2000 г. [2002] отмечали, что встречаемость изолятов, вирулентных к *Lr9* в штатах, где выращивались сорта с данным геном, была равна 7–28%, а в штатах, где эти сорта отсутствовали, частота таких изолятов была 0–1%. Аналогичные результаты по вирулентности к *Lr9* получены нами и для российских популяций [Гультяева и др., 2009, 2015]. Вирулентность к *Lr9* в Уральском и Западно-Сибирском регионах, где широко выращиваются сорта с этим геном, была существенно выше, чем в европейских и северокавказских. Аналогичная ситуация отмечается по вирулентности к *Lr19* для волжских популяций патогена, где сконцентрированы сорта, защищенные данным геном.

Изоимные спектры. В 1980–1990 гг. для анализа популяций возбудителя бурой ржавчины были апробированы неселективные биохимические маркеры, в частности электрофоретические спектры изозимов. При использовании изозимного анализа для изучения популяций *P. triticina* и *P. graminis* в Австралии был выявлен низкий уровень полиморфизма и гетерозиготности по изозимным системам у обоих видов грибов, по сравнению с анализом вирулентности [Burdon et al., 1983]. J.J. Burdon и A.P. Roelfs [1985] выявили вариабельность по одному из десяти изозимных локусов у изолятов *P. triticina* из Северной Америки. Только два изозимных генотипа были определены в наборе из 45 изолятов, принадлежащих к девяти различным фенотипам вирулентности. В целом популяция

патогена из Северной Америки, также как и Австралии, имела низкую изозимную вариабельность, что указывает на определенное ограничение в использовании изозимов для характеристики популяций возбудителя бурой ржавчины.

ДНК-полиморфизм: RAPD анализ. С середины 1990 г. были предприняты попытки диверсифицировать подходы изучения структуры популяций с использованием молекулярных маркеров. Одним из первых для этого был использован RAPD анализ (случайно амплифицированная полиморфная ДНК). Данный метод основан на полимеразно-цепной реакции (ПЦР) ДНК организма со случайными короткими (10 н.п.) олигонуклеотидами (праймерами) с последующим фракционированием амплифицированных фрагментов ДНК при помощи электрофореза. Для RAPD анализа достаточно очень малого количества ДНК (измеряемого в нг), не требующего дополнительной очистки. Также не требуется знания нуклеотидной последовательности тестируемой ДНК для конструирования праймеров, поскольку используют праймеры со случайной нуклеотидной последовательностью. RAPD-метод позволяет оценить большое количество изолятов за сравнительно короткое время [Михайлова и др., 2003].

RAPD маркеры для изучения популяций *P. trititcina* впервые были использованы в Северной Америке в середине 1990 годов [Kolmer et al., 1995]. Было подтверждено предположение о наличии в Канаде двух географических популяций патогена, выдвинутое по результатам многолетнего мониторинга вирулентности. В последующий период (1995–2000 гг.) аналогичные исследования были проведены в Западной Европе [Park et al., 2000]. Также была проанализирована обширная коллекция *P. trititcina*, включающая изоляты из Австралии, Новой Зеландии, Европы, Америки, Азии и Африки [Kolmer, Liu, 2000] и показана разная степень сходства между ними.

Российские популяции возбудителя бурой ржавчины также были изучены с использованием RAPD-маркеров. О. А. Кудинова [2011] с использованием трех RAPD праймеров (UBS 450, UBS 517 и OPA 18) оценила полиморфизм популяций возбудителя бурой ржавчины, собранных в Северо-Кавказском регионе в 2007–2009 гг. и показала различия между образцами популяций в разных зонах. Дополнительно ею был проведен сравнительный анализ популяций патогена из Северного Кавказа и Ленинградской области, в результате которого выявлены существенные различия между географическими коллекциями патогена [Кудинова и др., 2010]. Более масштабные исследования российских популяций с использованием RAPD маркеров проведены в ВИЗР [Gulyaeva et al., 2012]. С использованием шести RAPD и одного УП праймера охарактеризовано 417 монопустульных изолятов *P. trititcina*, собранных с мягкой пшеницы в семи регионах РФ в 2007 г. Сходный уровень разнообразия российских популяций патогена по признаку вирулентности и молекулярному полиморфизму был определен в данных исследованиях. Согласно анализам вирулентности и RAPD высоким сходством характеризовались популяции Западной Сибири и Урала, что объясняется выращиванием в этих регионах генетически сходных сортов. Образцы северокавказских популяций и центрально-европейских существенно отличались от северо-западных, западно-азиатских и волжских по

вирулентности. По RAPD полиморфизму центрально-европейские изоляты кластеризовались независимо от северокавказских, северо-западных и западносибирских, как это было установлено и по признаку вирулентности [Gulyaeva et al., 2012]. Дополнительно, с использованием RAPD маркеров было проведено расширенное изучение популяций *P. trititcina* в Северо-Западном регионе РФ в 2007 г. [Гуляева и др., 2011]. Среди 139 проанализированных изолятов выявлено 35 фенотипов вирулентности и 37 молекулярных. Сравнительный анализ выявил значимые различия между псковскими, новгородскими и ленинградскими субпопуляциями *P. trititcina* по признаку вирулентности, что было обусловлено влиянием сортов – источников инфекционного материала, собранных преимущественно на ГСУ в Псковской и Ленинградской областях и на производственных посевах в Новгородской области. Молекулярный анализ показал приблизительно сходный уровень внутривидового генетического разнообразия трех популяций и не выявил значимых различий в степени сходства между парами популяций. Сходство изолятов по молекулярным маркерам подтвердило общее генетическое единство изученных северо-западных субпопуляций и указывало на определенную нейтральность RAPD маркеров при анализе популяций, по сравнению с признаком вирулентности.

ДНК-полиморфизм: AFLP анализ Высокая чувствительность RAPD маркеров к изменениям условий реакций и возможность сравнения только фрагментов амплификации из одной ПЦР реакции является ограничением для широкого использования данного метода в популяционных исследованиях. В начале 2000 годов для анализа популяций возбудителя бурой ржавчины был использован AFLP анализ (полиморфизм длин амплифицированных ДНК-фрагментов). AFLP маркеры, как и RAPD, относятся к группе доминантных маркеров. Преимуществом AFLP, по сравнению с RAPD, является воспроизводимость результатов и уровень выявления полиморфизма. Однако для его проведения требуются более дорогие расходные материалы. F.J. Keiper с соавторами [2003] сравнили информативность молекулярных маркеров полученных методами, основанными на ПЦР (AFLP, SAM (селективно амплифицированные сателлиты), S-SAP (полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей ДНК)) для идентификации видов ржавчинных грибов и изучения их внутривидового разнообразия. Был сделан вывод, что все маркеры удовлетворительно дифференцировали виды грибов, однако разнообразие внутри групп изолятов одного вида, определяемое всеми этими методами, было низким. С использованием AFLP маркеров проведены ограниченные исследования популяций *P. trititcina* в Канаде [Kolmer, 2001], в Германии и Эфиопии [Mebbrate et al., 2006], и Иране [Dadrezai et al., 2013]. Из-за дороговизны и методических сложностей, которые могут ограничить воспроизводимость результатов при проведении AFLP-анализа, данный метод не получил массового применения в популяционных исследованиях возбудителя бурой ржавчины пшеницы.

ДНК-полиморфизм: микросателлитный анализ (SSR). Наибольший прорыв в молекулярных исследованиях *P. trititcina* произошел в 2003–2007 гг., чему способствовало секвенирование ДНК нескольких изолятов

гриба [Duan et al., 2003], выявление микросателлитных повторов в геноме патогена и конструирование на основе этого SSR-праймеров, эффективных в определении внутривидового полиморфизма популяций данного патогена [Szabo, Kolmer, 2007]. SSR (микросателлитные) маркеры являются кодоминантными и могут выявлять различия между гомозиготными и гетерозиготными генотипами, по сравнению с RAPD и AFLP-маркерами. С использованием подобранных SSR-маркеров был изучен молекулярный полиморфизм популяций *P. trititcina* в Северной и Южной Америке [Ordóñez, Kolmer, 2009; Ordóñez et al., 2010], в Западной Европе [Goyeau et al., 2007; Mantovani et al., 2010; Kolmer et al., 2013], в Средней и Центральной Азии и Закавказье [Kolmer, Ordóñez, 2007; Kolmer et al., 2011]. Результатом этих исследований в Северной и Южной Америке явилось определение источника первичного появления гриба на двух континентах и направлений его дальнейшего распространения, а также оценка влияния генетически разнородных сортов пшеницы на дифференциацию популяций гриба. Полученные сведения позволили охарактеризовать микроэволюцию *P. trititcina* на территории Северо- и Южноамериканского континентов и разработать комплексную стратегию защиты пшеницы от бурой ржавчины. Исследования западно-европейских популяций позволили оценить влияние генетически разнородных сортов пшеницы, выращиваемых в разных странах Европы, на молекулярно-генетическую изменчивость популяции, определить пути миграции изолятов как в пределах Европы, так и извне. Был показан возможный занос спор патогена в Западную Европу с Ближнего Востока, в том числе и из Турции [Kolmer et al., 2011]. Подтверждено высокое сходство по микросателлитным локусам между образцами кавказских популяций, обитающих на территории Азербайджана Грузии и Армении, и их родство с среднеазиатскими популяциями, собранными на территории Узбекистана, Таджикистана и Киргизстана. Популяции Северного и Южного Казахстана дифференцировались от кавказских и среднеазиатских, что обусловлено наличием географического барьера (Тянь-Шанских гор), препятствующих заносу спор на территорию Казахстана [Kolmer, Ordóñez, 2007].

Российские популяции *P. trititcina* по полиморфизму микросателлитных локусов были охарактеризованы в Cereal Diseases Laboratory (США) [Kolmer et al., 2015] и в ВИЗРе [Гульятеева и др., 2017]. J.A. Kolmer с соавторами [2015] изучили коллекции патогена, собранные в 4 регионах РФ: Центральном (Курская, Липецкая, Тамбовская, Московская, Тульская обл.), Северокавказском (Краснодарский край), Западно-Сибирском (Новосибирская, Омская обл.), Нижневолжском (Саратовская обл.) и Волго-Вятском (Кировская обл.) в 2006–2010 гг. В этих исследованиях не выявлено дифференциации между европейскими и азиатскими популяциями, но показано существование двух групп изолятов *P. trititcina*, распространенных по всей территории России.

В ВИЗРе была охарактеризована более широкая по географическому происхождению коллекция. Она включала изоляты, собранные в 2007–2014 гг. в девяти регионах РФ: Северокавказском (Дагестан, Краснодарский, Ставропольский край), Северо-Западном (Калининградская, Псковская, Ленинградская, Новгородская обл.), Центральном

(Смоленская, Владимирская, Брянская, Тульская обл.), Центрально-Черноземном (Курская, Липецкая, Воронежская, Тамбовская, Белгородская обл.), Западно-Сибирском (Томская, Омская, Кемеровская, Новосибирская, Тюменская обл., Алтайский край), Уральском (Курганская, Оренбургская, Челябинская обл., Башкортостан), Нижневолжском (Саратовская обл.), Средневолжском (Самарская обл.) и Волго-Вятском (Нижегородская обл., Чувашия) Дополнительно в анализ были включены коллекции патогена из Северного и Южного Казахстана. Значения индексов генетических расстояний между популяциями (*Fst*, *Rst*, *KBm*) по микросателлитным маркерам указывали на дифференциацию изолятов *P. trititcina* по географическому происхождению на три группы: 1) западноазиатские, 2) европейские, 3) северокавказские. Северокавказские изоляты из Краснодарского и Ставропольского краев характеризовались меньшими различиями с европейскими, чем дагестанские. В целом микросателлитные маркеры показали высокую результативность в оценке генетического полиморфизма популяций *P. trititcina* и дифференциации их по географическому происхождению. Проведенный анализ подтвердил ранее выдвинутое на основании анализа вирулентности предположение о наличии в России нескольких популяций гриба [Михайлова, 2006; Гульятеева и др., 2017].

При проведении SSR анализа в лаборатории микологии и фитопатологии ВИЗР и в Cereal Diseases Laboratory [Kolmer et al., 2015] были использованы сходные исследовательские подходы. Использован единый набор микросателлитных маркеров и протоколы проведения ПЦР [Duan et al., 2003; Szabo, Kolmer, 2007]. Для осуществления фрагментного анализа в ВИЗРе был использован генетический анализатор ABI Prism 3500 («Applied Biosystems», США, «Hitachi», Япония). Размеры SSR аллелей определяли в программе GeneMapper 4.1. В Cereal Diseases Laboratory для этих целей использовали прибор 4200 DNA Analyzer или 4300 DNA Analyzer («LI-COR», США). Поэтому наблюдались некоторые различия в методиках подготовки и реализации экспериментов в зависимости от особенностей используемого оборудования. Также были небольшие различия в типах использованных флуоресцентных красителей и маркеров длин, что практически не влияет на качество и сопоставимость результатов, полученных разными лабораториями.

В качестве стандарта длины мы использовали маркер LIZ450 (Синтол). Используемые маркеры были помечены флуоресцентными красителями: FAM (карбоксифлуоресцеин), ROX (карбокси-X-родамин), TAMRA (тетраметилкарбоксихородамин), R6G (6-Карбоксихородамин) и HEX (4,7,2',4',5',7'-гексахлоро-6-карбоксихородамин). Это позволяло провести мультиплексный анализ изолятов одновременно по нескольким маркерам (рис. 1). Основным условием при этом являлось использование флуоресцентных меток разных цветов, либо и подбор маркеров разной длины. Такой подход позволял сэкономить время и финансовые затраты (ПЦР продукта) на проведение микросателлитного анализа и подобрать оптимальную концентрацию пробы, которая своим свечением не заглушала свечение стандарта длины, пики не перекрывались и четко визуализировались в программе GeneMapper.

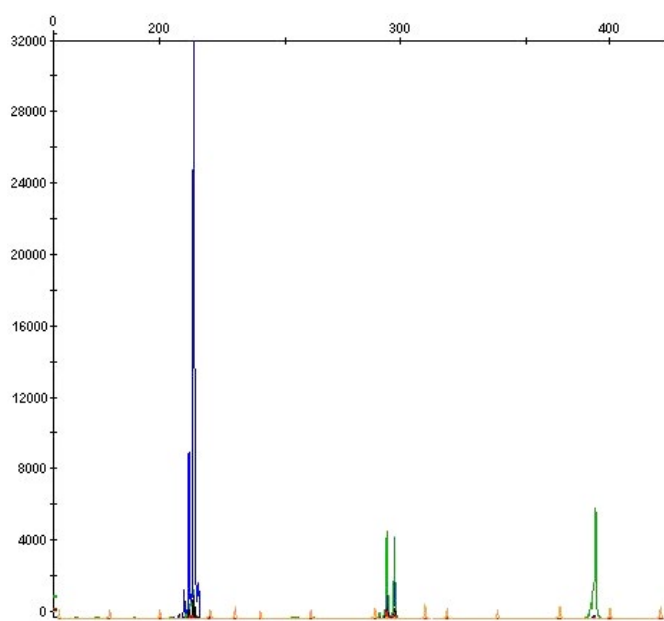


Рисунок 1. Фрагментный анализ *P. triticina* с маркерами PtSSR173 (212 п.н.), PtSSR61 (294 п.н., 300 п.н.), PtSSR152 (389 п.н.).

По оси абсцис – шкала размера фрагмента, по оси ординат – шкала интенсивности флуоресценции

Различия в результатах дифференциации российских популяций возбудителя бурой ржавчины в двух вышеописанных работах [Kolmer et al., 2015; Гульятеева и др., 2017] могут быть обусловлены разной представленностью изученных коллекций изолятов по происхождению и времени сбора. В исследованиях ВИЗР использован инфекционный материал более широкого географического происхождения, в котором доминировали изоляты, собранные в 2011–2014 гг. (75%), а в исследованиях Cereal Diseases Laboratory в 2006–2010 гг.

Наряду с вышеописанными микросателлитными маркерами в литературе имеются сведения о других, созданных с использованием базы данных маркерных экспрессируемых последовательностей (EST). X. Wang с соавторами [2010] в результате анализа 7134 EST из библиотек кДНК *P. triticina* отобрали 204 EST-SSRs с минимальным числом повторяющихся нуклеотидов, которые содержали короткие ди- и тринуклеотидные повторы. На их основе были сконструированы маркеры, которые характеризовались высоким полиморфизмом и информативностью при изучении канадских популяций *P. triticina*. Сравнение результатов анализа вирулентности и микросателлитного показало их высокую корреляцию. Показана эффективность использования EST библиотек для подбора информативных молекулярных маркеров в генетических исследованиях *P. triticina*. Аналогичные по типу маркеры были подобраны для изучения популяций *P. triticina* в Турции [Sipahi et al., 2015].

ДНК-полиморфизм: SNP анализ. Все вышеописанные молекулярные маркеры используются для оценки внутрипопуляционной и межпопуляционной генетической изменчивости *P. triticina*. Однако наряду с мягкой пшеницей в вегетативной фазе возбудитель бурой ржавчины может существовать и на других культурных и диких злаках из родов *Triticum*, *Aegilops*, *Elymus*, *Bromus* и др. [Bolton et al., 2008]. Показано, что SSR генотипы *P. triticina*, выделенные с *Ae. speltoides* в Израиле, существенно отличались от

изолятов с мягкой и твердой пшеницы. Изоляты *P. triticina* на твердой пшенице были менее вариабельны по микросателлитным локусам, и значимо отличались от изолятов с мягкой [Ordoñez, Kolmer, 2007]. В связи с этим возникла необходимость проанализировать дивергенцию и адаптацию гриба *P. triticina* к видам-хозяевам разной плоидности [Liu et al., 2014]. Основная гипотеза состояла в том, что изоляты *P. triticina* на *Ae. speltoides* представляют более раннюю эволюционную форму, а изоляты, вирулентные к твердой пшенице имеют происхождение от изолятов с мягкой пшеницы. Для проверки этой гипотезы был разработан новый методический подход с использованием секвенирования интрон-содержащих участков гена субъединицы РНК-полимеразы (RPB2), информативных для рода *Puccinia* SSR-локусов, а также анонимных гипервариабельных участков генома [Liu et al., 2014]. Все последовательности и праймеры были получены и проверены относительно имеющихся для *P. triticina* геномных библиотек. В SNP анализе (однонуклеотидный полиморфизм) использовали 48 изолятов с мягкой пшеницы широкого географического происхождения (Центральная Азия, Европа, Ближний Восток, Северная и Южная Америка, Новая Зеландия), 20 изолятов с твердой пшеницы (Ближний Восток, Эфиопия, Европа, Северная и Южная Америка) и 2 изолята с *Ae. speltoides* (Израиль). В качестве аутгруппы для филогенетического и коалесцентного анализа в исследовании включили 2 изолята *P. persistens*, собранных в Чехии и Швеции на пырее (*Elymus repens*). В результате анализа 15 полиморфных локусов показано, что сопряженная эволюция *P. triticina* шла по вектору *Ae. speltoides* (донор генома В и цитоплазмы аллополиплоидных рядов пшеницы) – *T. durum* (эфиопские формы) – *T. aestivum* [Liu et al., 2014]. Для других изолятов гриба с твердой пшеницы, имеющих широкое географическое происхождение, показана относительно недавняя дивергенция из популяций патогена, обитающих на мягкой пшенице. На филогенетическом древе изоляты с *T. durum* отдельной группой вошли в общий кластер с изолятами, полученными с мягкой пшеницы. Сделан вывод, что по относительной временной шкале дивергенция *P. triticina* по специфичности к растению-хозяину произошла не очень давно. Значительный генный поток был определен между всеми популяциями патогена на мягкой и твердой пшенице, в том числе и эфиопскими [Liu et al., 2014].

Изучение популяций *P. triticina*, обитающих на разных видах-хозяевах, проводится и в России. На Дагестанской опытной станции ВИР (ДОС ВИР), расположенной в Южном Дагестане (Дербентский район) ежегодно изучается генетически разнообразная коллекция пшениц и эгилопсов, которая в целом представляет генофонд устойчивости к бурой ржавчине. Данный регион относится к Переднеазиатскому центру происхождения пшениц и ее патогенов, соответственно, и является уникальным для изучения взаимоотношений в патосистеме паразит – хозяин. Вокруг станции произрастают дикие злаки, в том числе, виды пырея и эгилопсов, восприимчивые к бурой ржавчине. Осенний посев пшеницы и теплая зима создают благоприятные условия для перезимовки и воспроизведения популяции патогена [Дмитриев и др., 1976; Михайлова и др., 1997]. Имеется мнение [Бердянд-Кожевников и др., 1978], что основной (материнской) популяцией *P. triticina*

в этом регионе является совокупность клонов паразита, обитающих в течение года на пырее и других многолетних злаках. Изучение генотипического состава клонов гриба, собранных с дикорастущих злаков в южном Дагестане в 1970–1972 гг., показало их высокое разнообразие по признаку вирулентности [Бердянд-Кожевников и др., 1978; Михайлова, 2006]. Высокий полиморфизм по вирулентности отмечен и у дербентских изолятов *P. triticina* на видах *Triticum* и *Aegilops* выращиваемых на ДЭС ВИР [Бердянд-Кожевников и др., 1978; Михайлова, 2006; Gulyaeva et al., 2016]. Изоляты с тетраплоидных видов характеризовались меньшим числом аллелей вирулентности, по сравнению с изолятами с гексаплоидных видов и с диплоидного *Ae. tauschii*. В 2014 г. в ВИЗР эти исследования дополнены использованием SSR маркеров [Gulyaeva et al., 2018]. Показано, высокое сходство по микросателлитным локусам между изолятами патогена на гексаплоидных видах пшеницы и их отличие от изолятов на тетраплоидных видах *T. aethiopicum*, *T. turanicum* и *T. dicoccum* (геном ВВВ^А) [Gulyaeva et al., 2018].

Отработка методики проведения SNP анализа для изучения российских популяций *P. triticina*. В связи с подбором новой группы маркеров (SNP) для анализа возбудителя бурой ржавчины, представляло интерес оценить филогенетическое родство и дивергенцию дербентских изолятов *P. triticina* на разных видах-хозяевах (*Triticum* и *Aegilops*). Для этого требовалось отработка методических подходов постановки SNP анализа. Для изучения полиморфизма дагестанских изолятов *P. triticina* протестированы 11 маркеров, представленных в исследованиях М. Liu с соавторами [2014]: RPB2, ctg1, ctg5, ctg9, ctg10/2, ctg10/3, ctg12, ctg34, ctg47, ctg67, ctg84. Для предварительного анализа использовали изоляты *P. triticina*, полученные с трех тетраплоидных видов *T. turanicum*, *T. aethiopicum*, *Ae. crassa* и с пяти гексаплоидных видов *T. spelta*, *T. vavilovii*, *T. petropavlovskiyi*, *T. macha*, *T. aestivum*. Оптимизации протокола ПЦР включала подбор реактивов (полимераза разных фирм-производителей) и условий амплификации. В результате отобрано 6 стабильно амплифицирующихся маркеров (RPB2, ctg1, ctg5, ctg34, ctg67, ctg84). Эти маркеры были протестированы с использованием расширенной коллекции, включающей изоляты патогена с 15 разных видов *Aegilops* и *Triticum*.

Для отработки методики подготовки проб к секвенированию использовали 24 изолята *P. triticina*, полученные с разных видов *Triticum* и *Aegilops* в Дагестане, Новосибирске и Северном Казахстане (рис. 2). Ввиду особой сложности изучаемого объекта, а именно по причине того, что клетки *P. triticina* являются гетерокарионами и необходимо снизить вероятность неверного прочтения при анализе гетерозиготных локусов, нами были предъявлены повышенные требования к качеству получаемых нуклеотидных последовательностей.

Секвенирование полученных ампликонов было проведено методом обрыва цепи по Ф. Сэнгеру [1977]. Наилучшие результаты получены по трем локусам ctg1, ctg5, ctg84. Для других локусов и гена RPB2 качество результатов нуклеотидной последовательности было неудовлетворительным ввиду высокой неспецифичности ПЦР, которая наблюдалась и у предыдущих исследователей [Liu et al., 2014]. Это существенно лимитирует использование дан-

ного метода. Нуклеотидные последовательности каждого локуса для отдельного изолята были конкатенированы в программе Sequence Matrix v1.7.8 [Vaidya et al., 2011]. Филогенетическое дерево для мультилокусных последовательностей было построено с помощью программы MrBayes v3.2, с использованием модели нуклеотидных замен GTR+G+I и генерации 1×10^6 марковских цепей [Huelsenbeck, Ronquist, 2001]. Полученные нами данные SNP анализа для 24 российских изолятов сравнили с представленными М. Liu с соавторами [2014] (рис. 2) для изолятов с мягкой и твердой пшеницы широкого географического происхождения. Исходные последовательности маркеров ctg1, ctg5 и ctg84 для референсных изолятов были получены из Генбанка.

Как и в исследованиях М. Liu с соавторами, на диаграмме выделено 2 существенно различающихся кластера. В первый вошли эфиопские изоляты с твердой пшеницы, во второй все изученные нами и дополнительно включенные в анализ. Внутри второго кластера наблюдалась дифференциация на 2 субкластера. Первый был представлен североамериканским изолятом с твердой пшеницы. Во втором субкластере наблюдалась умеренная дифференциация. Большинство дербентских изолятов *P. triticina* и чешский с мягкой пшеницы характеризовались высокой степенью сходства. Умеренно дифференцировались от них новосибирские изоляты с *T. aestivum* и *T. dicoccoides* и азербайджанский с *T. aestivum* и ближе к ним по сходству были алтайские изоляты с *T. aestivum*, североамериканский с мягкой пшеницы и дербентские с *Ae. tauschii* и *T. spaerococcum*. Предварительные результаты изучения российских популяций указывают на высокое филогенетическое сходство между дербентскими изолятами, полученными с разных видов-хозяев. В целом полученные результаты филогенетического анализа согласуются с М. Liu с соавторами [2014]. Однако для повышения достоверности сравнения необходимо использование большего числа маркеров, для которых в нашем исследовании не удалось получить стабильных результатов SNP анализа.

Полногеномное секвенирование. Возбудитель ржавчины гриб *P. triticina* имеет высокий эволюционный потенциал, что подразумевает проведение постоянного мониторинга популяций патогена и дальнейшее совершенствование методов его изучения. В современный период ведутся активные работы по полногеномному секвенированию ржавчинных грибов (whole genome sequencing) [Kolmer, 2013; Wu et al., 2017]. Первые попытки использования данного подхода предприняты в Австралии для картирования 20 изолятов, маркированных вирулентностью/авирулентностью к *Lr20* [Wu et al., 2017]. В результате полногеномного ассоциативного анализа идентифицировано 302 гена, содержащих как минимум один SNP, связанный с вирулентностью *Lr20* ($p < 0.05$). Критерий Вилкоксона для парных (несвязанных) выборок показал, что разница в количестве несинонимических мутаций между группами невирулентных и вирулентных изолятов была значима ($p < 0.05$). В целом SNP анализ показал потенциальную вовлеченность эпигенетических механизмов в патогенез *P. triticina*. В связи с этим, дальнейшие исследования будут направлены на выявление биологических функций предполагаемых эффекторов и механизмов регуляции генов на эпигенетическом и посттранскрипцион-

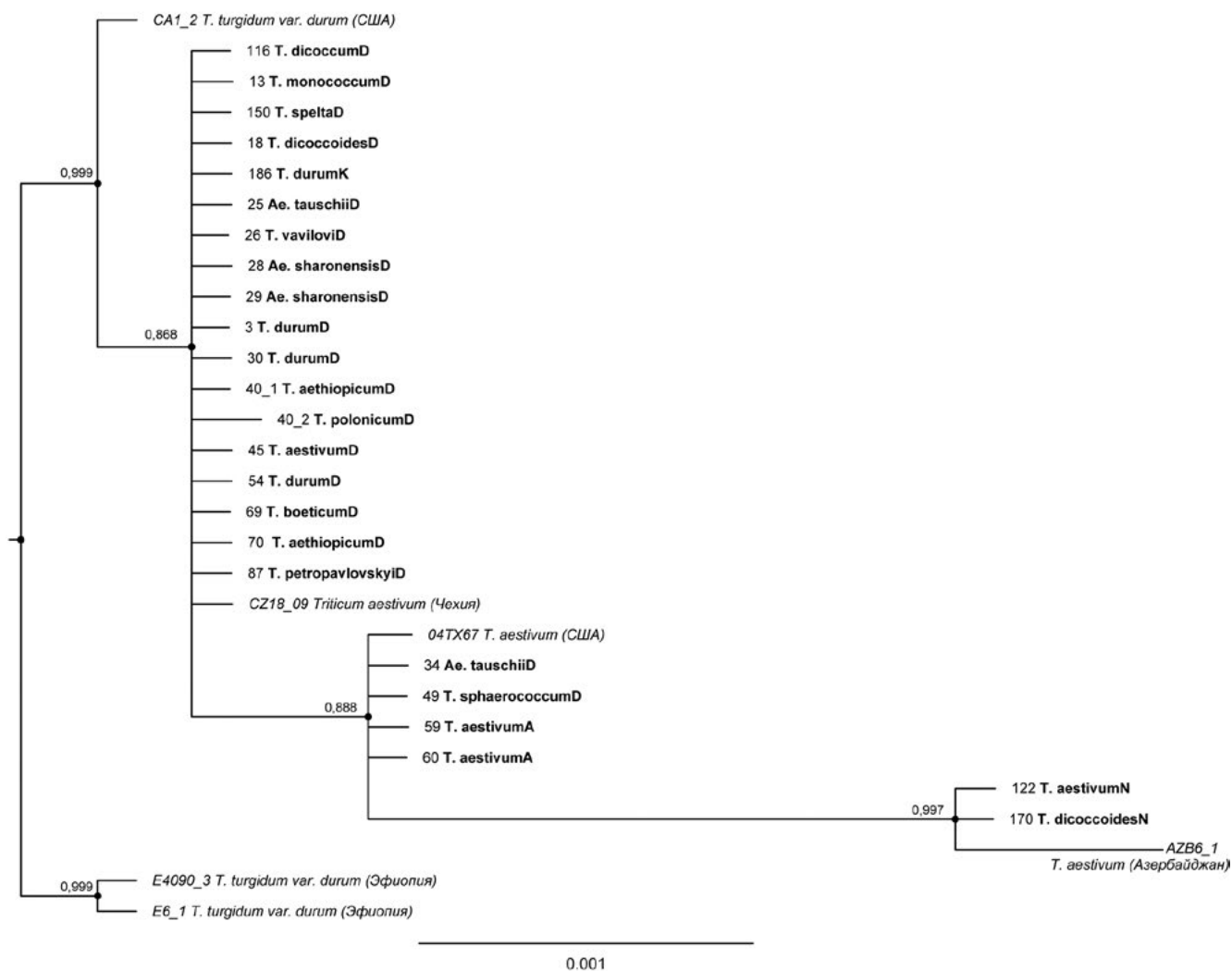


Рисунок 2. Филогенетическое дерево изолятов *P. triticina* разного происхождения, построенное методом Байеса.

Числами указаны значения апостериорной вероятности. Курсивом выделены изоляты, исследованные в статье Liu et al. [2014] и выбранные в настоящей работе в качестве референсных групп; данные по остальным изолятам получены авторами (D – дербентские изоляты, А – алтайские, N – новосибирские)

ном уровнях. В недалеком будущем, несомненно, это приведет к разработке новых диагностических SNP маркеров, которые в режиме реального времени позволят провести быстрое обнаружение новых рас и позволят отслеживать их распространение и миграцию. Однако, для мониторин-

га появления новых агрессивных рас и изучения эффективности *Lr*-генов устойчивости, основная информация может быть получена только с использованием признака вирулентности. Молекулярные маркеры более актуальны в фундаментальных исследованиях.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект №14-26-00067).

Библиографический список (References)

- Аманов А. Популяционное изучение возбудителя бурой ржавчины пшеницы в Средней Азии и Южном Казахстане и создание устойчивости селекционного материала в условиях полива. / А. Аманов // Автореф. ... канд. дис. 06.01.05, 06.01.11 Ленинград, 1984. 24 с.
- Берлянд-Кожевников В.М. Устойчивость пшеницы к бурой ржавчине. / В.М. Берлянд-Кожевников, А.П. Дмитриев, Е.Б. Будашкина, И.Т. Шитова, В.Г. Рейтер // Генетическое разнообразие популяций гриба и растения-хозяина. Новосибирск: Наука, 1978. 442 с.
- Гулятьева Е.И. Вирулентность и структура популяций *Puccinia triticina* в Российской Федерации в 2007 году / Е.И. Гулятьева, О.А. Баранова, А.П. Дмитриев // Вестник защиты растений. 2009. N 4. С. 333–338.
- Гулятьева Е.И. Структура популяций *Puccinia triticina* по вирулентности и ДНК-маркерам в Северо-Западном регионе РФ в 2007 году / Е.И. Гулятьева, Е. Косман, А.П. Дмитриев, О.А. Баранова // Микология и фитопатология. 2011. Т. 45. N 1. С. 70–81.
- Гулятьева Е.И. Структура российских популяций гриба *Puccinia triticina* Eriks. / Е. И. Гулятьева, Е.Л. Шайдаюк, И.А. Казарцев, М.К. Аристова // Вестник защиты растений. 2015. Т. 3. N 85. С. 5–10.
- Дмитриев А.П. Исследование расового и генотипического состава дербентской популяции *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. в 1972–1973 гг. // А.П. Дмитриев, Л.А. Михайлова, Л.Ф. Шеломова, А.И. Деревянкин // Микология и фитопатология. 1976. Т. 10. N 4. С. 61–64.
- Коваленко Е.Д. Современное состояние популяций возбудителя бурой ржавчины и создание генбанка источников и доноров устойчивости пшеницы // Е.Д. Коваленко, А.И. Жемчужина, М.И. Киселева, Т.М. Коломиец, И.Ф. Лапочкина, Ж.Н. Худокормова, Х. Боккельман // Иммуногенетическая защита сельскохозяйственных культур от болезней: теория и практика. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 125 – летию со дня рождения Н.И. Вавилова. Большие Вяземы Московской обл. 17–20 июля, 2012 г., Московская область, Большие Вяземы. 2012. С. 69–80.
- Кудинова О.А. Вирулентность и ДНК – полиморфизм изолятов *Puccinia triticina* из Северного Кавказа и Ленинградской области // О.А. Кудинова, О.Ю. Кремнева, Г.В. Волкова // Научный журнал КубГАУ. 2010. N 62(08). <http://ej.kubagro.ru/2010/08/pdf/15.pdf>
- Кудинова О.А. Динамика северокавказской популяции бурой ржавчины пшеницы (возбудитель – *Puccinia triticina*) по вирулентности и ДНК-полиморфизму / О.А. Кудинова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2011. Т. 6. N 68. С. 63–65.

- Михайлова Л.А. Изменение структуры популяции *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* в окрестностях Дербента (Дагестан) в 1970–1995 гг. / Л.А. Михайлова, К.М. Абдуллаев, Л.Ф. Шеломова // Микология и фитопатология. 1997. Т. 31. N 2. С. 71–77.
- Михайлова Л.А. Методы исследования генетического разнообразия популяций возбудителя бурой ржавчины пшеницы *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* / Л.А. Михайлова, Е.И. Гультяева, Н.В. Мироненко // СПб.: ВИЗР, 2003. 24 с.
- Михайлова Л.А. Генетика взаимоотношений возбудителя бурой ржавчины и пшеницы / Под ред. акад. РАСХН М.М. Левитина. СПб.: ВИЗР, 2006. 80 с.
- Сорокина Г.К. Использование эффективных *Lr*-генов в селекции пшеницы на устойчивость к бурой ржавчине // Г.К. Сорокина, Л.А. Смирнова, В.К. Лангава и др. // Методические рекомендации. Москва: ВНИИФ, ВАСХНИЛ, 1990. 31 с.
- Bolton M.D. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* / M.D. Bolton, J.A. Kolmer, D.F. Garvin // Molecular Plant Pathol. 2008. V. 9. N 5. P. 563–575.
- Burdon J.J. Isozyme uniformity and virulence variation in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* and *P. recondita tritici* in Australia / J.J. Burdon, N.H. Luig, D.R. Marshall // Austr. J. Biol. Sci. 1983. V. 36. P. 403–410.
- Burdon J.J. Isozyme and virulence variation in sexually reproducing populations of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* on wheat / J.J. Burdon, A.P. Roelfs // Phytopathology. 1985. V. 75. P. 907–913.
- Dadrezai S.T. Molecular genetic diversity in Iranian populations of *Puccinia triticina*, the causal agent of wheat leaf rust / S.T. Dadrezai, S. Lababidi, K. Nazari, E. M. Goltapeh, F. Afshari, F. Alo, M. Shams-Bakhsh, N. Safaie // Amer. J. Plant Sci. 2013. V. 4. P. 1375–1386.
- Duan, X. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina* / X. Duan, J. Enjalbert, D. Vautrin, C. Solignac, T. Giraud // Mol. Ecol. Notes. 2013. V. 3. P. 65–67.
- Dyck P.L. Genetics of resistance to leaf rust (*Puccinia recondite*) in the common wheat varieties Webster, Loros, Brevit, Carina, Malakoff and Centario / P.L. Dyck, D.J. Samborski // Can. J. Genet. Cytol. 1968. V. 10. P. 7–17.
- Goyeau H. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina* / H. Goyeau, F. Halkett, M.F. Zapater, J. Carlier, C. Lannou // Fungal Genetics and Biology. 2007. V. 44. P. 474–483.
- Gulyaeva E.I. Regional diversity of Russian populations of *Puccinia triticina* in 2007 / E.I. Gulyaeva, A.P. Dmitriev, E. Kosman // Canadian J. Plant Pathology. 2012. V. 34. N 2. P. 213–224.
- Gulyaeva E.I. Virulence of *Puccinia triticina* on *Triticum* and *Aegilops* species / E.I. Gulyaeva, E.L. Shaydayuk, N.P. Goncharov, A. Akhmetova, K.M. Abdullaev, M.H. Belousova, E. Kosman // Australasian Plant Pathology. 2016. V. 45. N 2. P. 155–163.
- Gulyaeva E.I. Microsatellite analysis of *Puccinia triticina* from *Triticum* and *Aegilops* hosts / E.I. Gulyaeva, E.L. Shaydayuk, I.A. Kazartsev, A. Akhmetova, E. Kosman // Austr. Plant Pathol. 2018. V. 47. N 2. P. 163–170.
- Keiper F.J. Molecular genetic variability of Australian isolates of five cereal rust pathogens / F.J. Keiper, M.J. Hayden, R.F. Park, C.R. Welling // Mycol. Research. 2003. V. 107. N 5. P. 545–556.
- Kolmer J. A. Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in Canada / J.A. Kolmer, J.Q. Liu, M. Sies // Phytopathology. 1995. V. 85. P. 276–285.
- Kolmer J.A. Virulence and molecular polymorphism in international collections of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* / J.A. Kolmer, J.Q. Liu // Phytopathol. 2000. V. 90. N 4. P. 427–436.
- Kolmer J.A. Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada / J. A. Kolmer // Can. J. Bot. 2001. V. 79. P. 917–926.
- Kolmer J.A. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus / J.A. Kolmer, M.E. Ordonez // Phytopathol. 2007. V. 97. P. 1141–1149.
- Kolmer, J. A. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in the Middle East and genetic similarity with populations in Central Asia / J.A. Kolmer, M.E. Ordonez, J. Manisterski, Y. Anikster // Phytopathol. 2011. V. 101. P. 870–877.
- Kolmer J.A. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe / J.A. Kolmer, A. Hanzalova, H. Goyeau, R. Bayles, A. Morgounov // Plant Pathol. 2013. V. 62. N 1. P. 21–31.
- Kolmer J.A. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype / J.A. Kolmer, M.G. Kabdulova, M. A. Mustafina, N. Zhemchuzhina, V. Dubovoy // Plant Pathol. 2015. V. 64. N 2. P. 328–336.
- Kovalenko E.D. Effect of wheat cultivars on variability of leaf rust populations / E.D. Kovalenko, A.I. Zhemchuzhina, N.N. Kurkova // Abstracts of oral and posters presentations 8th International Wheat Conference. June 1–4, 2010. St. Petersburg, Russia. P. 278.
- Long D.L., Kolmer J. A., Leonard K.J., Hughes M.E. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2000 // D.L. Long, J.A. Kolmer, K.J. Leonard, M.E. Hughes // Plant Dis. 2002. V. 86. P. 981–986.
- Mains E.B. Physiologic specialization in the leaf rust of wheat; *Puccinia triticina* Erikss. / E.B. Mains, H.S. Jackson // Phytopathol. 1926. V. 16. P. 89–120.
- Mantovani P. Virulence phenotypes and molecular genotypes in collections of *Puccinia triticina* from Italy / P. Mantovani, M. Maccaferri, R. Tuberosa // Plant Dis. 2010. V. 94. P. 420–424.
- Membrate S. A. Molecular diversity in *Puccinia triticina* isolates from Ethiopia and Germany // S.A. Membrate, H.W. Dehne, K. Pillen, E.C. Oerke // Phytopathol. 2006. V. 154. P. 701–710.
- Newton M. Specialization and hybridization of wheat stem rust, *Puccinia graminis tritici* in Canada / M. Newton, T. Johnson // Dom. Can. Dept. Agr. Bull. 1932. 160 p.
- Ordonez M. E. Genetic differentiation within the *Puccinia triticina* population in South America and comparison with the North American population suggests common ancestry and intercontinental migration / M.E. Ordonez, S.E. German, J.A. Kolmer // Phytopathol. 2010. V. 100. P. 376–383.
- Ordonez M. E. Differentiation of molecular genotypes and virulence phenotypes of *Puccinia triticina* from common wheat in North America / M.E. Ordonez, J.A. Kolmer // Phytopathol. 2009. V. 99. P. 750–758.
- Ordonez M.E. Simple sequence repeat diversity of a world-wide collection of *Puccinia triticina* from durum wheat / M.E. Ordonez, J.A. Kolmer // Phytopathol. 2007. V. 97. P. 574–583.
- Park R. F. Population structure of *Puccinia recondita* in Western Europe during 1995 as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers / R.F. Park, A. Jahoor, F.G. Felsenstein // J. Phytopathol. 2000. V. 148. P. 169–179.
- Sipahi H. Development of novel markers, using computationally extracted class type EST-SSRS, in wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* / H. Sipahi, A. Yumurtaci, Z.R. Mert // Genetika. 2015. V. 47. N 3. P. 917–926.
- Szabo L. S. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina* / L.S. Szabo, J.A. Kolmer // Mol. Ecol. Notes. 2007. V. 7. P. 708–710.
- Wang X. Development of EST-derived simple sequence repeat markers for wheat leaf rust fungus, *Puccinia triticina* Erikss. / X.Wang, B. Mulock, G. Bakkeren, B. McCallum // Canad. J. Plant Pathol. 2010. V. 32. P. 98–107.
- Wu J.Q. Comparative genomics integrated with association analysis identifies candidate effector genes corresponding to Lr20 in phenotype-paired *Puccinia triticina* isolates from Australia / J.Q. Wu, S. Sakthikumar, C. Dong, P. Zhang, C.A. Cuomo, R.F. Park // Front Plant Sci. 2017. V. 8: 148

Translation of Russian References

- Amanov A. Population study of the causative agent of leaf rust of wheat in Central Asia and Southern Kazakhstan and creation development of resistant material in irrigation condition / A. Amanov // Avtoreferat dis. na soiskanie uchenoy stepeni kandidata biologicheskikh nauk. Leningrad. 1984. (In Russian).
- Berlyand-Kozhevnikov. Wheat resistance to leaf rust / V.M. Berlyand-Kozhevnikov, A.P. Dmitriev, E.B. Budashkina, I.T. Shitova, V.G. Reiter // Genetic diversity of fungus and host plant populations. Novosibirsk: Nauka, 1978. 442 p. (In Russian).
- Gulyaeva E.I. Virulence and population structure of *Puccinia triticina* In Russian Federation in 2007 / E.I. Gulyaeva, O.A. Baranova, A.P. Dmitriev // Plant Protection News. 2009. N 4. P. 333–338. (In Russian).
- Gulyaeva E.I. The structure of *Puccinia triticina* populations determined by virulence and DNA-markers in the North-West Russia in 2007 / E.I. Gulyaeva, E. Kosman, A.P. Dmitriev, O.A. Baranova // Mycologiya and phytopathologiya. 2011. V. 45. N 1. P. 70–81. (In Russian).
- Gulyaeva E.I. Structure of Russian populations of *Puccinia triticina* / E.I. Gulyaeva, E.L. Shaidayuk, I.A. Kazartsev, M.K. Aristova // Plant Protection News. 2015. V. 3. N 85. P. 5–10. (In Russian).
- Dmitriev A.P. Study of the races and genotypic composition of the Derbent population of *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. in 1972–1973 / A.P. Dmitriev, L.A. Mikhailova, L.F. Shelomova, A.I. Derevyankin // Mycologiya i fitopatologiya. 1976. V. 10. N 4. P. 61–64. (In Russian).
- Kovalenko E.D. Current state of leaf rust populations and creation of germplasm of wheat donors and sources resistant to disease / E.D. Kovalenko, A.I. Zhemchuzhina, M.I. Kiseleva, T.M. Kolomiets, I.F. Lapochkina, Zh.N. Khudokormova, H. Bokkelman // Immunogenic control of plant diseases in agriculture: the theory and practice. Proceeding of the International scientific conference, devoted to the 125-year anniversary of

- N.I. Vavilov's birth. Bolshie Vyazemy, Moscow region. July 17–21, 2012. P. 69–80. (In Russian).
- Kudinova O.A. Virulence and DNA polymorphism of *Puccinia triticina* isolates from the North Caucasus and the Leningrad Region / O.A. Kudinova, O. Yu. Kremneva, G.V. Volkova // Scientific journal of KubSU. 2010. N 62 (08). (In Russian).
- Kudinova O.A. Dynamics of the North Caucasian population of leaf rust of wheat (causative agent – *Puccinia triticina*) by virulence and DNA polymorphism / O.A. Kudinova // Proceedings of the Orenburg State Agrarian University. 2011. V. 6. N 68. P. 63–65. (In Russian).
- Mikhailova L.A. Changes in the structure of the population of *Puccinia recondita* Rob. ex Desm. f. sp. *tritici* in the vicinity of Derbent (Dagestan) in 1970–1995 / L.A. Mikhailova, K.M. Abdullaev, L.F. Shelomova // Mycologiya and phytopathologiya. 1997. V. 31. N 2. P. 71–77. (In Russian).
- Mikhailova L.A. Research methods for genetic diversity of populations the activator of wheat leaf rust *Puccinia recondita* of Rob. ex Desm. f. sp. *tritici*. / L.A. Mikhailova, E.I. Gulytaeva, N.V. Mironenko // St. Petersburg: VIZR, 2003. 24 p. (In Russian).
- Mikhailova L.A. Genetics of relationship of leaf rust activator and wheat. / Ed. by acad. RASHN M.M. Levitin. – SPb.: VIZR, 2006. (In Russian).
- Sorokina G. K. The use of effective Lr-genes in wheat selection for resistance to leaf rust / G.K. Sorokina, L.A. Smirnova, V.K. Langavaya et al. // Methodical recommendations. VNIIF, VASKhNIL. M., 1990. 31 p. (In Russian).

Plant Protection News, 2018, 2(96), p. 5–12

MOLECULAR-GENETIC APPROACHES TO STUDYING WHEAT LEAF RUST POPULATIONS

E.I. Gulytaeva, I.A. Kazartsev

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

Population studies of the leaf rust agent *Puccinia triticina* Erikss. have a long-time history. This review describes the traditional phytopathological and modern molecular methodological approaches used in *P. triticina* studies. The results of the analysis of *P. triticina* Russian populations according with virulence and intrapopulation and interpopulation diversity studies of the pathogen by DNA polymorphism are summarized. The advantages and disadvantages of RAPD, AFLP and SSR analyses for studies of *P. triticina* populations are discussed. The original results of analysis of *P. triticina* populations using RAPD and SSR markers are presented. Since the middle of 2010, new SNP markers have been developed for coevolution studies in *P. triticina* populations existed on the common and durum wheats. The possibility and perspective of using a new methodological approach for assessing the degree of phylogenetic relationship between Derbent isolates of *P. triticina* obtained from *Triticum* sp. and *Aegilops* sp. different ploidy are discussed. Prospects for the creation and practical use of new molecular genetic diagnostic systems for monitoring populations, tracking the emergence of new races, their distribution and migration are presented.

Keywords: *Puccinia triticina*; RAPD; SNP; SSR marker; virulence; Lr-gene.

Сведения об авторах

Всероссийский НИИ защиты растений, шоссе Подбельского, 3, 196608 Санкт-Петербург, Пушкин, Российская Федерация
 *Гультяева Елена Ивановна. Ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук, доцент, e-mail: eigulytaeva@gmail.com
 Казарцев Игорь Александрович. Старший научный сотрудник, кандидат биологических наук, e-mail: kazartsev@inbox.ru

* Ответственный за переписку

Information about the authors

All-Russian Institute of Plant Protection, Podbelskogo Shosse, 3, 196608, St. Petersburg, Pushkin, Russian Federation
 *Gulytaeva Elena Ivanovna. Leading Researcher, PhD in Biology, associate professor, e-mail: eigulytaeva@gmail.com
 Kazartsev Igor' Alexandrovich. Senior Researcher, PhD in Biology, e-mail: kazartsev@inbox.ru

* Corresponding author