

УДК 633.854.78:582.952.6

ВНУТРИПОПУЛЯЦИОННАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЗАРАЗИХИ, ПОРАЖАЮЩЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИК В РОССИИ, ВЫЯВЛЯЕМАЯ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМИ МАРКЕРАМИ

С.З. Гучетль, кандидат биологических наук
Т.С. Антонова, доктор биологических наук
Т.А. Челюстникова, старший научный сотрудник

ФГБНУ ВНИИМК
Россия, 350038, г. Краснодар, ул. им. Филатова, д. 17
Тел.: (861) 275-86-53
E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Для цитирования: Гучетль С.З., Антонова Т.С., Челюстникова Т.А. Внутрипопуляционная изменчивость заразики, поражающей подсолнечник в России, выявляемая микросателлитными маркерами // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2016. – Вып. 4 (168). – С. 10–18.

Ключевые слова: подсолнечник, заразики, популяция, генетическое разнообразие, микросателлитные локусы.

Информация о структуре популяций заразики подсолнечника и динамике их изменчивости помогает селекционерам в выработке стратегии борьбы с этим паразитом. Целью настоящего исследования было изучение дискриминационного потенциала системы микросателлитных маркеров для определения внутрипопуляционной изменчивости *O. cumana*, паразитирующей на подсолнечнике в России, анализ генетического разнообразия, структуры, степени сходства и различия современных её популяций и их сравнение с популяциями из Испании и Румынии. Для работы использованы зрелые семена *O. cumana* восьми популяций, собранных в 2003–2014 гг. на полях подсолнечника Краснодарского, Ставропольского краёв, Ростовской области России, а также провинции Кордова в Испании и Калараша в Румынии. Исследования выполнены с применением методов определения расового состава популяций заразики, ПЦР анализа с 10 микросателлитными локусами и анализа генетического разнообразия с

помощью программы GenAIEx 6.5. Установлено, что дискриминационный потенциал использованной системы маркеров достаточно информативный для определения внутрипопуляционной изменчивости заразики, произрастающей на территории России. Основные показатели генетического разнообразия продемонстрировали небольшой уровень внутрипопуляционного полиморфизма как российских, так и иностранных популяций заразики. Не обнаружено явной связи между расовым составом и генетическим разнообразием популяций. Из российских популяций наибольшую генетическую изменчивость показали кагальницкая и крыловская, наименьшую – привольненская. Российские популяции отличались большей внутрипопуляционной изменчивостью, чем испанская и румынская. Генетические дистанции между российскими популяциями в основном были меньше, чем их расстояние от испанской и румынской. Уровень генетической дифференциации между исследованными популяциями, вычисленный при помощи AMOVA, оказался довольно высоким, большая часть выявленного генетического разнообразия (57 %) приходилась на межпопуляционную составляющую, внутрипопуляционная изменчивость составила 38 %, а дисперсия между индивидами внутри каждой популяции – 6 %. Различия между популяциями, вычисленные с помощью F-статистики Райта ($F_{st} = 0,565$), также свидетельствуют об их генетической дифференциации.

UDC 633.854.78:582.952.6

Intrapopulation variability of broomrape affecting sunflower in Russia which can be discovered by microsatellite loci.

S.Z. Guchetl, candidate of biology
T.S. Antonova, doctor of biology
T.A. Tchelustnikova, senior researcher

FGBNU VNIIMK
17, Filatova str., Krasnodar, 350038, Russia
Tel.: (861) 275-86-53
E-mail: saida.guchetl@mail.ru

Key words: sunflower, broomrape, population, genetic diversity, microsatellite loci.

Information about a structure of broomrape populations on sunflower and dynamics of its variability helps breeders to find out a strategy controlling this parasite plant. The purpose of the current research was to study a discriminating potential of a system of microsatellite markers used for determination of intrapopulation variability of *O. cumana* infesting sunflower crops in Russia, to analyze a genetic diversity, structure, similarity and discrepancy degree of modern

broomrape populations, and to compare populations from Russia and populations from Spain and Romania. For work we used the matured seeds of *O. cumana* from eight populations collected in 2003–2014 in fields of Krasnodar, Stavropol and Rostov regions, as well as in provinces Cordoba, Spain and Kalarashi, Romania. During research there was determined a race structure of broomrape populations, was done PCR-analysis with ten microsatellite loci and genetic diversity was analyzed using a program GenAEx 6.5. A discriminating potential of used marker system is ascertained to be quite informative for determination of intrapopulation variability of broomrape, growing on the territory of Russia. The general traits of genetic diversity showed to have a low level of intrapopulation polymorphism both in the Russian and foreign broomrape populations. An obvious relation between race structure and genetic diversity of populations was not observed. Among the Russian populations, kagalnitskaya and krylovskaya appeared to be the most genetic variable, and privolnenskaya one is least variable. The Russian populations were differed with more intrapopulation variability compared to Spanish and Romanian. Genetic distances between the Russian populations were generally less than the same one with Spanish and Romanian. A level of genetic differentiation between studied populations calculated by AMOVA appeared to be rather high. The most of revealed genetic diversity (57%) accrued to interpopulation part, intrapopulation variability was 38%, dispersion between individuals within each population is 6%. Differences between population calculated by Right's F-statistics ($F_{st} = 0,565$) also certify their genetic differentiation.

Введение. Заразиха, поражающая подсолнечник (*Orobancha cumana* Wallr.), – растение-паразит, в настоящее время расценивается как один из самых опасных факторов, влияющих на производство этой культуры во многих странах, где она произрастает. Образование новых, вирулентных рас заразихи происходит по мере создания и введения в производство устойчивых сортов и гибридов подсолнечника [1].

В связи с этим практический интерес представляют собой знания о процессах, происходящих в популяциях паразита. Информация о структуре популяций паразита и динамике их изменчивости помогает селекционерам в выработке стратегии борьбы с ним. Отвечая на потребность практической селекции в новых знаниях о развитии популяций

заразихи в отличающихся регионах возделывания подсолнечника, ученые разных стран проводят исследования генетического разнообразия внутри и между популяциями *O. cumana* с использованием различных типов молекулярных маркеров.

G. Gagne с соавторами [2] изучали генетическое разнообразие у восьми популяций этого вида заразихи из нескольких стран, используя RAPD-маркеры. Они определили большую межпопуляционную и слабую внутрипопуляционную изменчивость, сделали вывод о существовании двух основных генофондов: один объединяет популяции из Восточной Европы, другой включает популяции из Южной Испании. R. Pineda-Martos с соавторами [3] определены два основных генофонда *O. cumana* в Испании, состоящие из популяций из долины Гвадалквивир (Южная Испания) и провинции Куэнка (Центральная Испания) соответственно. Обе группы были генетически далеки, но внутри- и межпопуляционная изменчивость были в целом крайне низки внутри каждого генофонда. Тем не менее некоторое число популяций показало большее генетическое разнообразие, которое было связано с перекрёстным опылением между особями из обоих генофондов. Молекулярно-генетическая вариабельность популяций заразихи изучалась также в Молдавии и Турции [4; 5].

В наших работах [6; 7; 8] была изучена генетическая изменчивость между популяциями заразихи *O. cumana*, паразитирующей на подсолнечнике в России, Румынии и Казахстане с использованием различных типов молекулярных маркеров. Была обнаружена небольшая дифференциация между популяциями из стран бывшего СССР и Румынии, независимая от их расового состава.

Целью настоящего исследования было изучение дискриминационного потенциала системы микросателлитных маркеров для определения внутрипопуляционной изменчивости *O. cumana*, паразитирую-

щей на подсолнечнике в России, анализ генетического разнообразия, структуры, степени сходства и различия современных её популяций и их сравнение с популяциями из Испании и Румынии.

Материалы и методы. Зрелые семена *O. sativa* восьми популяций были собраны в 2003–2014 гг. на полях подсолнечника в Краснодарском, Ставропольском краях и Ростовской области России, а также в провинции Кордова в Испании и Калараша в Румынии и хранились при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Для определения расового состава популяций пользовались методикой, описанной в 2014 г. в нашей работе [6]. Для анализа использовали молодые цветonoсы заразики с корней растений подсолнечника сорта ВНИИМК 8883, восприимчивого ко всем современным расам заразики. Для изучения внутривидового разнообразия в качестве матрицы для амплификации ПЦР была использована ДНК из 10 индивидуальных, случайно отобранных растений.

ДНК выделяли из замороженных цветonoсов по методике J.J. Doyle и J.L. Doyle [9] с нашими модификациями. Для проведения полимеразной цепной реакции использовали 25 мкл реакционной смеси следующего состава: 67 мМ трис-HCl, pH 8,8; 16,6 мМ сульфата аммония; 1,5–3 мМ MgCl_2 ; 0,01 % Tween 20; по 0,2 мМ дезоксирибонуклеозидфосфатов; по 10 пМ праймеров; 10 нг матричной ДНК и 1 ед. рекомбинантной термостабильной ДНК полимеразы (Москва, Сибэнзим). Для амплификации применяли термоциклер S1000™ (BioRad, США). Условия амплификации: начальная денатурация при $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин, затем 30 циклов при соблюдении температурно-временного режима: отжиг при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 40 с, элонгация – 1 мин при $70\text{ }^{\circ}\text{C}$, денатурация при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ – 30 с, финальная элонгация – 2 мин. Использовали 12 SSR (simple sequence repeat) праймеров, которые были отобраны нами ранее [6].

Электрофорез продуктов амплификации проводили в полиакриламидном геле

(8 %, 1 x ТБЕ) с использованием камеры VE-20 для вертикального электрофореза (Хеликон, РФ) при 100 V. Последующее окрашивание осуществляли бромистым этидием. Визуализация результатов электрофореза с помощью ультрафиолетового излучения и их документирование обеспечивались при помощи системы цифровой документации видеоизображения BIO-PRINT (Vilber Lourmat, Франция). В качестве маркера молекулярного веса использовался 100-bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific Inc, Lithuania). Подсчет размеров фрагментов после электрофореза был выполнен при помощи программного обеспечения Bio-Capture (Vilber Lourmat, Франция).

Индекс полиморфного содержания (PIC) [10] и эффективное число аллелей (n_e) [11] для всех популяций в целом вычисляли по формулам:

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2, \quad (1)$$

где – P частота j паттерна для локуса i и суммирование распространяется на n паттернов;

$$n_e = 1 / \sum_{j=1}^n P_{ij}^2, \quad (2)$$

Основные показатели генетической изменчивости популяций (число аллелей на locus N_a , эффективное число аллелей N_e , полиморфность P , наблюдаемая H_o и ожидаемая H_e гетерозиготность, информационный индекс Шеннона I), а также анализ молекулярной вариации AMOVA (Analysis of Molecular Variance), показатели F статистики Райта, генетические дистанции и генетическое сходство по Нею определяли с помощью программы GenAlEx 6.5 [12].

Результаты и обсуждение. В результате идентификации расового состава популяций заразики для каждого изучаемого варианта были определены расы, преобладающие в образце семян (табл. 1). Наименее вирулентная раса E была выявлена в образце семян заразики, собранных

в окрестностях станции Привольная Краснодарского края в 2003 г. Также раса Е встречалась в образце семян, собранных в Ростовской области, в Азовском районе в 2012 г. Здесь же присутствовали также расы F и G. Только раса F была обнаружена в популяции заразики из провинции Кордоба, Испания. В остальных популяциях преобладали расы F и G. В образцах семян из Новоалександровского ГСУ (Ставропольский край) и Калараша (Румыния), кроме выше указанных рас, встречалась и раса H. В общем расовый состав семян заразики из разных популяций отличался разнообразием.

Таблица 1

Характеристика образцов *O. ситана*, использованных для анализа

Место сбора семян заразики	Страна	Год сбора	Расы, преобладающие в образце семян
Ростовская область, Кагальницкий район	Россия	2012	G
Краснодарский край, ст. Привольная	Россия	2003	E
Ставропольский край, ГСУ Новоалександровск	Россия	2014	F, G, H
Волгоградская область, Новоаннинский район	Россия	2013	F, G
Краснодарский край, Крыловский район	Россия	2012	G
Ростовская область, Азовский район	Россия	2012	E, F, G
Калараша	Румыния	2014	F, G, H
Кордоба	Испания	2014	F

Из 12 микросателлитных праймеров, использованных в работе, были отобраны 10, показавшие полиморфизм амплифицированных фрагментов ДНК. В результате амплификации десяти микросателлитных локусов у заразики из восьми популяций было выявлено 22 аллеля, от 2 до 4 аллелей на локус. Для определения дискриминационного потенциала использованной системы маркеров были вычислены наблюдаемое и эффективное число аллелей и индекс полиморфного информационного содержания (PIC) по всем популяциям в целом (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика 10 микросателлитных локусов ДНК, использованных для оценки внутривидовой генетической различий восьми популяций *O. ситана*

Локус	Размер фрагмента ДНК (пн)	Количество аллелей	Эффективное число аллелей	PIC*
Ocum-52	114, 131	2	1,92	0,48
Ocum-59	90, 100	2	2,00	0,50
Ocum-70	120, 127	2	2,00	0,50
Ocum-81	72, 90	2	1,54	0,35
Ocum-87	132, 136, 134, 138	4	2,77	0,64
Ocum-108	144, 152	2	2,00	0,50
Ocum-141	186, 191	2	1,92	0,48
Ocum-196	192, 197	2	2,00	0,50
Ocum-197	104, 113	2	1,92	0,48
Ocum-174	186, 190	2	1,11	0,10
Среднее		2,2	1,91	0,45

*PIC – индекс полиморфного информационного содержания

Среднее число аллелей на локус для использованной системы маркеров составило 2,2. Показатели эффективного числа аллелей варьировали от 1,11 у локуса Ocum-174 до 2,77 у Ocum-87, со средним значением 1,91. Средняя величина эффективного числа аллелей немного ниже, чем среднее число аллелей по всем популяциям, что согласуется с результатами популяционных исследований у других видов животных и растений. Полученные величины PIC находились в диапазоне от 0,10 у локуса Ocum-174 до 0,64 у Ocum-87. Среднее значение индекса полиморфного информационного содержания для изученной группы генотипов 0,45, что свидетельствует о достаточной информативности используемой маркерной системы. Наиболее высокий полиморфизм у изученных популяций выявила праймерная пара Ocum-87.

При изучении внутривидового генетического разнообразия было установлено, что процент полиморфных локусов для каждой российской популяции составил от 40 у привольненской до 80 у кагальницкой и крыловской (табл. 3). В сравнении с популяциями из России у популяций из Испании и Румынии – 0 и 20 %

соответственно. В среднем процент полиморфных локусов составил 50.

Таблица 3

Основные показатели генетического разнообразия популяций *O. citana*, выявленные по десяти микросателлитным локусам ДНК

Популяции	Na	Ne	I	Ho	He	% P
Кагальницкая	1,80 ± 0,13	1,60 ± 0,12	0,49 ± 0,08	0,05 ± 0,02	0,34 ± 0,06	80
Привольненская	1,40 ± 0,16	1,14 ± 0,06	0,16 ± 0,07	0,04 ± 0,02	0,09 ± 0,04	40
Новоалександровская	1,70 ± 0,15	1,46 ± 0,12	0,39 ± 0,09	0,01 ± 0,01	0,27 ± 0,06	70
Новоаннинская	1,70 ± 0,30	1,35 ± 0,14	0,30 ± 0,12	0,00 ± ,00	0,19 ± 0,07	50
Крыловская	2,00 ± 0,25	1,64 ± 0,18	0,50 ± 0,11	0,00 ± 0,00	0,32 ± 0,06	80
Азовская	1,60 ± 0,16	1,34 ± 0,13	0,30 ± 0,09	0,11 ± 0,04	0,20 ± 0,06	60
Кордоба	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0
Калараши	1,20 ± 0,13	1,16 ± 0,11	0,12 ± 0,08	0,02 ± 0,02	0,09 ± 0,06	20

Примечание: Na – число аллелей на локус; Ne – эффективное число аллелей; I – информационный индекс Шеннона; Ho – наблюдаемая гетерозиготность; He – ожидаемая гетерозиготность; % P – процент полиморфных микросателлитных локусов

Отдельно для каждой популяции были вычислены основные показатели их генетической изменчивости, а также молекулярная дисперсия AMOVA (Analysis of Molecular Variance), F статистика Райта и генетические дистанции и сходство по Нею.

Анализ генетической изменчивости для российских популяций показал, что число аллелей на локус колебалось от 1,4 у популяции заразики из станицы Привольной до двух у популяции из станицы Крыловской. Эффективное число аллелей составило от 1,14 у популяции заразики из станицы Привольной до 1,64 у популяции из станицы Крыловской. Наибольшая величина информационного индекса Шеннона, отражающего внутривидовое генетическое разнообразие, у крыловской популяции (0,50), наименьшее – в станице Привольной (0,16) (табл. 3). У азовской популяции паразита было самое высокое значение наблюдаемой гетерозиготности *Ho* (0,11), в то время как у новоаннинской и крыловской оно равня-

лось 0,00. Значения ожидаемой гетерозиготности *He* (оценка уровня генетической изменчивости в популяции) колебались от 0,09 у привольненской популяции до 0,34 у кагальницкой. Все образцы заразики из Испании были гомозиготны и монотипны, следствием чего явились низкие показатели генетической изменчивости. Продемонстрирована их внутривидовая однородность (табл. 3). Популяция из Румынии в основном показала меньшее разнообразие, чем российские популяции.

Уровень генетической дифференциации между популяциями количественно оценили с помощью вычисления генетических дистанций *Nei* (табл. 4). Наименьшее расстояние среди российских популяций обнаружилось между крыловской и новоалександровской (0,126), наибольшее – между азовской и крыловской (0,940). Значительные дистанции от российских показала популяция из Испании – от 0,456 с кагальницкой до 0,970 с привольненской. У румынской популяции дистанции с российскими менее значительны – от 0,150 с крыловской до 0,894 с новоаннинской. Также значительна генетическая дистанция между румынской и испанской популяциями заразики – 0,981.

Таблица 4

Показатели генетического расстояния (под диагональю) и сходства (над диагональю) между изучаемыми популяциями по микросателлитным маркерам

Популяция	Pop1	Pop2	Pop3	Pop4	Pop5	Pop6	Pop7	Pop8
Pop1*	-	0,752	0,769	0,634	0,761	0,788	0,773	0,740
Pop2	0,285	-	0,682	0,379	0,676	0,687	0,650	0,530
Pop3	0,263	0,383	-	0,603	0,765	0,882	0,664	0,656
Pop4	0,273	0,392	0,267	-	0,692	0,668	0,391	0,861
Pop5	0,238	0,376	0,126	0,329	-	0,404	0,778	0,558
Pop6	0,257	0,431	0,409	0,407	0,940	-	0,251	0,327
Pop7	0,456	0,970	0,507	0,501	0,720	0,665	-	0,409
Pop8	0,301	0,635	0,421	0,894	0,150	0,584	0,981	-

*Обозначения: Популяции: Pop1 – кагальницкая; Pop2 – привольненская; Pop3 – новоалександровская; Pop4 – новоаннинская; Pop5 – крыловская; Pop6 – азовская; Pop7 – Кордоба; Pop8 – Калараши

Распределение общей генетической изменчивости между исследованными популяциями и в их пределах изучали методом анализа молекулярной дисперсии (AMOVA). Анализ молекулярной дисперсии продемонстрировал существенные различия между популяциями и несколько меньшие внутри популяций. Большая часть дисперсии (57 % от общей) была обусловлена различиями между популяциями. Значительная часть дисперсии (38 %) обусловлена различиями внутри популяций. И, наконец, дисперсия между индивидами внутри каждой популяции составила наименьшую величину – 6 % (табл. 5). Таким образом, уровень дифференциации между исследованными популяциями оказался довольно высоким, большая часть выявленного генетического разнообразия приходится на межпопуляционную составляющую.

Таблица 5

Результаты AMOVA анализа общего генетического разнообразия в восьми популяциях *O. cyma*

Источник разнообразия	Число степеней свободы df	Сумма квадратов	Доля в общей дисперсии		P*
			абс. значения	%	
Между популяциями	7	204,156	1,361	57	<0,001
Внутри популяций	72	140,350	0,903	38	
Между индивидами	80	11,500	0,144	6	
Всего	159	356,006	2,407	100	

* P – вероятность

Вычисление показателей структуры подразделенной популяций (F-статистика Райта) показало высокое значение F_{is} , отражающего инбридинг особи относительно популяции. Это свидетельствует о том, что в изученных популяциях заразики наблюдается дефицит ($F_{is} = 0,863$) гетерозиготных генотипов, вызванный инбридингом. Также значителен показатель, отражающий инбридинг особи относительно вида в целом: $F_{it} = 0,940$. Различия между популяциями ($F_{st} = 0,565$; табл. 6) свидетельствуют об их генетической дифференциации.

Значения показателей F-статистики Райта: F_{is} , F_{it} , F_{st} для восьми популяций

F-статистика	Значение	Вероятность (P)
F_{st}	0,565	0,001
F_{is}	0,863	0,001
F_{it}	0,940	0,001

Таким образом, основные показатели генетического разнообразия, выявленные по десяти микросателлитным локусам, продемонстрировали, что практически во всех популяциях эффективное число аллелей было ниже, чем число аллелей на локус. Наблюдаемая гетерозиготность H_o у всех популяций не превышала ожидаемую. Анализ молекулярной дисперсии AMOVA также показал, что дисперсия между индивидами внутри каждой популяции составила всего 6 %. Эти данные свидетельствуют о небольшом уровне внутривидового полиморфизма как двух иностранных, так и шести российских популяций заразики. Не обнаружено явной связи между расовым составом и генетическим разнообразием популяций. При этом отмечено, что по показателям $\% P$, I и H_e среди популяций из России наибольшее генетическое разнообразие показывают кагальницкая и крыловская, в состав которых входит лишь вирулентная раса G. Наименьшими значениями обладает популяция из окрестностей станицы Привольная, в состав которой входит лишь раса E. В сравнении с популяциями из России, испанская и румынская показали меньшую генетическую изменчивость. Все образцы заразики из Испании были гомозиготны и мономорфны. Показатели генетического разнообразия популяции из Румынии выше, чем у испанской, но ниже, чем у российских. Полученные данные о крайне низкой внутривидовой изменчивости испанской популяции согласуются с результатами, полученными R. Pineda-Martos с соавторами [3]. В исследовании L. Molinero-Ruiz с соавторами [13], молекулярный анализ методом RAPD среди высоко вирулентных популяций *O. cyma*

на из Центральной Испании, Венгрии, Южной Испании и Турции выявил внутривидовую генетическую однородность паразита. Авторы предполагают, что малое генетическое меж- и внутривидовое разнообразие испанских популяций возбудителя возникло на основе общего их происхождения от ограниченного числа растений-родоначальников (эффект основателя).

Большее генетическое разнообразие российских популяций возбудителя, в сравнении с румынскими, было отмечено в исследовании [6], выполненном для *O. citrana*, паразитирующей на подсолнечнике в России, Румынии и Казахстане, с использованием кодоминантных микросателлитных маркеров. Было высказано предположение, что внутривидовый полиморфизм российских популяций возбудителя базируется на генетическом разнообразии сортов подсолнечника, которые возделывались в республиках бывшего СССР. В том же исследовании генетическое расстояние между объединенными пулами – российско-казахским и румынским, составило 0,137. В данной работе дистанция у российских популяций от испанской более значительна – от 0,456 до 0,970. У румынской популяции дистанция от российских менее значительна – от 0,150 до 0,894. G. Gagne с соавторами [2] при использовании RAPD-маркеров для изучения генетической изменчивости у популяций из Болгарии, Турции, Румынии и Испании установили, что испанские популяции были генетически отдалены от других восточноевропейских популяций. Наши исследования также показали значительную дистанцию между румынской (Калараша) и испанской (Кордоба) популяциями возбудителя (0,981). В своем исследовании R. Pineda-Martos с соавторами [3] предполагают, что большое генетическое расстояние между популяциями из разных мест, географически отдаленных, может объясняться происхождением семян, интродуцированных из разных областей.

Полученные нами данные о генетических дистанциях свидетельствуют в пользу этой гипотезы.

Проведенные нами исследования выявили, что российские популяции паразита имеют большее генетическое родство по отношению друг к другу (за небольшим исключением) и меньшее – по отношению к иностранным. Это согласуется с данными ряда ученых, установивших, что популяции *O. citrana* группируются соответственно географического происхождения, независимо от расового состава [2; 3; 6; 13].

Уровень генетической дифференциации между исследованными популяциями, вычисленный при помощи AMOVA и F-статистики Райта, оказался довольно высоким, большая часть выявленного генетического разнообразия приходится на межпопуляционную составляющую. Ранее в нашей работе [7] не было выявлено существенной дифференциации между популяциями возбудителя юга России, Казахстана и Румынии, проанализированных с использованием RAPD-локусов. Микросателлитные маркеры позволили с большей точностью дифференцировать генетические пулы возбудителя, показав различия между популяциями из Румынии и стран бывшего СССР [6], хотя эти различия были признаны также незначительными. Результаты данной работы показали большую дифференциацию между исследованными восемью популяциями. Это может объясняться несколькими причинами. Во-первых, изучение внутривидовой структуры методом анализа отдельных особей позволяет точнее определить различия внутри и между популяциями. Во-вторых, для анализа был использован другой набор популяций возбудителя. Использование в сравнительном исследовании популяции из Испании, наиболее удаленной от российских, увеличило значение показателя генетической дифференциации. Свой вклад внесла и популяция из станции Привольная. Образец её семян был соб-

ран более 10 лет назад, чем семена других популяций, и она отличалась наименьшими вирулентностью и внутривидовым генетическим разнообразием. Таким образом, высокий уровень дифференциации может быть обусловлен пространственной и временной изоляцией данных популяций друг от друга. Высокая оценка F_{st} (0,565) также характерна для видов самоопылителей [2; 14]. И хотя недавнее исследование с использованием гена, который определяет отсутствие антоциановой пигментации, выявило возникновение относительно высокой частоты перекрестного опыления у растений *O. cumana* (от 14,8 до 40,0 %) [15], основываясь на малом внутривидовом генетическом разнообразии [2] и структуре цветка [16] ранее было сделано заключение о преобладании у заразики процессов самоопыления. Наше исследование подтверждает этот вывод.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что дискриминационный потенциал использованной системы маркеров достаточно информативный для определения меж- и внутривидовой изменчивости заразики, произрастающей на территории России. В целом популяции характеризуются невысоким уровнем внутривидового генетического разнообразия и высокой степенью межвидовой дифференциации. Из российских популяций наибольшую генетическую изменчивость показывают кагальницкая и крыловская, наименьшую – привольненская. Российские популяции отличаются большей внутривидовой изменчивостью, чем испанская и румынская. Генетические дистанции между российскими популяциями в основном меньше, чем их расстояние от испанской и румынской.

Список литературы

1. Antonova T.S., Araslanova N.M., Strelnikov E.A., Ramazanova S.A., Tchelustnikova S.A., Guchetl S.Z. Distribution of highly virulent races of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in the south-

ern regions of the Russian Federation // Russian Agricultural Sciences. – 2013. – Т. 39. – С. 46.

2. Gagne G., Roeckel-Drevet P., Grezes-Besset B., Shindrova P., Ivanov P., Grand-Ravel C., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Charmet G., Nicolas P. Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries // Theor. and Appl. Genet. – 1998. – V. 96. – P. 1216–1222.

3. Pineda-Martos R., Velasco L., Fernandez-Escobar J., Fernandez-Martinez J. M., and Perez-Vich B. Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers // Weed Research. – 2013. – V. 53. – P. 279–289.

4. Şestacova T., Cucereavii A., Tabără O., Port A., Duca M. Genetic variability of broomrape populations from republic of Moldova // Proc. of 19th International Sunfl. Conf., Edirne, Turkey, June. – 2016. – P. 608.

5. Ziadi S., Aydin Y., Evcı G., Altinkut Uncuoğlu A. The molecular genetic diversity of the broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations of Turkey // Proc. of 19th Intern.l Sunfl. Conf., Edirne, Turkey. – 2016. – P. 702.

6. Гучетль С.З., Антонова Т.С., Челюстникова Т.А. Межвидовая генетическая дифференциация *Orobanche cumana* Wallr. из России, Казахстана и Румынии, с использованием молекулярно-генетических маркеров // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2014. – Вып. 1 (157–158). – С. 108–114.

7. Гучетль С.З., Челюстникова Т.А., Рамазанова С.А. Межвидовая изменчивость *Orobanche cumana* Wallr., поражающей подсолнечник в регионах юга России, выявляемая молекулярно-генетическими маркерами // Масличные культуры. Науч.-тех. бюл. ВНИИМК. – 2011. – № 1 (146–147). – С. 119–122.

8. Челюстникова Т.А., Гучетль С.З., Антонова Т.С. Молекулярно-генетическая дифференциация популяций *Orobanche cumana* Wallr. различного географического происхождения с использованием RAPD локусов ДНК // Наука Кубани. – 2015. – № 4. – С. 50–55.

9. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochem. Bull. – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

10. Использование ПЦР-анализа в генетико-селекционных исследованиях: Научно-методическое руководство / Под ред. Сиволопа Ю.М. – Киев: Аграрна наука, 1998 – 156 с.

11. Айала Ф., Кайзер Д. Современная генетика. – М.: Мир, 1988. – Т. 3. – 332 с.

12. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research update // Bioinformatics. – 2012. – P. 1–3.

13. Molinero-Ruiz L., García-Carneros A. B., Collado-Romero M., Raranciuc S., Domínguez J. and

Melero-Vara J.M. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe // *Weed Research*. – 2014. – V. 54 (1). – P. 87–96.

14. Hamrick J.L. and Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. – Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S. – Eds.: Sinauer Associates, Sunderland, MA. – 1989. – P. 43–63.

15. Rodríguez-Ojeda M.I., Fernández-Martínez J.M., Velasco L., Pérez-Vich B. Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. // *Biologia Plantarum*. – 2013. – Vol. 53. – Is. 3. – P. 559–562.

16. Satovic Z., Joel D.M., Rubiales D., Cubero J.I., Roman B. Population genetics in weedy species of *Orobanche* // *Australian Plant Pathology*. – 2009. – V. 38. – P. 228–234.

References

1. Antonova T.S., Araslanova N.M., Strel'nikov E.A., Ramazanova S.A., Tchelusnikova S.A., Guchetl' S.Z. Distribution of highly virulent races of sunflower broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) in the southern regions of the Russian Federation // *Russian Agricultural Sciences*. – 2013. – T. 39. – S. 46.

2. Gagne G., Roeckel-Drevet P., Grezes-Besset B., Shindrova P., Ivanov P., Grand-Ravel S., Vear F., Tourvieille de Labrouhe D., Charmet G., Nicolas P. Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries // *Theor. and Appl. Genet.* – 1998. – V. 96. – P. 1216–1222.

3. Pineda-Martos R., Velasco L., Fernández-Escobar J., Fernández-Martínez J. M., and Pérez-Vich B. Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers // *Weed Research*. – 2013. – V. 53. – P. 279–289.

4. Şestacova T., Cucereavîi A., Tabără O., Port A., Duca M. Genetic variability of broomrape populations from republic of Moldova // *Proc. of 19th International Sunfl. Conf., Edirne, Turkey, June*. – 2016. – P. 608.

5. Ziadi S., Aydin Y., Evci G., Altinkut Uncuoğlu A. The molecular genetic diversity of the broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) populations of Turkey // *Proc. of 19th Intern.l Sunfl. Conf., Edirne, Turkey*. – 2016. – P. 702.

6. Guchetl' S.Z., Antonova T.S., Chelyustnikova T.A. Mezhpopyatsionnaya geneticheskaya differentsiatsiya *Orobanche cumana* Wallr. iz Rossii, Kazakh-

stana i Rumynii, s ispol'zovaniem molekulyarno-geneticheskikh markerov // *Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK*. – 2014. – Vyp. 1 (157–158). – S. 108–114.

7. Guchetl' S.Z., Chelyustnikova T.A., Ramazanova S.A. Mezhpopyatsionnaya izmenchivost' *Orobanche cumana* Wallr., porazhayushchey podsolnechnik v regionakh yuga Rossii, vyyavlyaemaya molekulyarno-geneticheskimi markerami // *Maslichnye kul'tury. Nauch.-tekh. byul. VNIIMK*. – 2011. – № 1 (146–147). – S. 119–122.

8. Chelyustnikova T.A., Guchetl' S.Z., Antonova T.S. Molekulyarno-geneticheskaya differentsiatsiya populyatsiy *Orobanche cumana* Wallr. razlichnogo geograficheskogo proiskhozhdeniya s ispol'zovaniem RAPD lokusov DNK // *Nauka Kubani*. – 2015. – № 4. – S. 50–55.

9. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – V. 19. – P. 11–15.

10. Ispol'zovanie PTsR-analiza v genetiko-selektionnykh issledovaniyakh: Nauchno-metodicheskoe rukovodstvo / Pod red. Sivolapa Yu.M. – Kiev: Agrarna nauka, 1998 – 156 s.

11. Ayala F., Kayger D. *Sovremennaya genetika*. – M.: Mir, 1988. – T. 3. – 332 c.

12. Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research update // *Bioinformatics*. – 2012. – P. 1–3.

13. Molinero-Ruiz L., García-Carneros A. B., Collado-Romero M., Raranciuc S., Domínguez J. and Melero-Vara J.M. Pathogenic and molecular diversity in highly virulent populations of the parasitic weed *Orobanche cumana* (sunflower broomrape) from Europe // *Weed Research*. – 2014. – V. 54 (1). – P. 87–96.

14. Hamrick J.L. and Godt M.J.W. Allozyme diversity in plant species // In: *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. – Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L. and Weir, B.S. – Eds.: Sinauer Associates, Sunderland, MA. – 1989. – P. 43–63.

15. Rodríguez-Ojeda M.I., Fernández-Martínez J.M., Velasco L., Pérez-Vich B. Extent of cross-fertilization in *Orobanche cumana* Wallr. // *Biologia Plantarum*. – 2013. – Vol. 53. – Is. 3. – P. 559–562.

16. Satovic Z., Joel D.M., Rubiales D., Cubero J.I., Roman B. Population genetics in weedy species of *Orobanche* // *Australian Plant Pathology*. – 2009. – V. 38. – P. 228–234.