

---

# **Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowy Instytut Badawczy**

mgr inż. Grzegorz Czajowski

Autoreferat rozprawy doktorskiej

**Wirulencja i polimorfizm DNA populacji *Puccinia triticina* (Erikss.)  
występującej na pszenzycie (*xTriticosecale* Wittm.) w Polsce**

**Virulence and DNA polymorphism of *Puccinia triticina* (Erikss.)  
from triticale (*xTriticosecale* Wittm.) in Poland**

**Promotor:**

**dr hab. Paweł Czembor**, prof. Instytutu

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Genetyki i Hodowli Roślin

**Promotor pomocniczy:**

**dr Anna Woźniak-Strzembicka**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
b. Zakład Roślin Zbożowych w Krakowie

**Recenzenci:**

**Prof. dr hab. Małgorzata Jędrzycka**

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk  
Zakład Genetyki Patogenów i Odporności Roślin

**dr hab. Anna Tratwal**, prof. Instytutu

Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Zakład Monitorowania i Sygnalizacji Agrofagów

Radzików, 2020

Część badań została wykonana w ramach projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi:

**Program Wieloletni na lata 2015-2020**

*Tworzenie naukowych podstaw postępu biologicznego i ochrona roślinnych zasobów genowych źródłem innowacji wsparcia zrównoważonego rolnictwa oraz bezpieczeństwa żywnościowego kraju*

**Obszar tematyczny 3.**

Monitoring zmian zdolności chorobotwórczych populacji organizmów szkodliwych i kwarantannowych roślin uprawnych.

**Zadanie 3.2**

Monitoring zmian zdolności chorobotwórczych populacji biotroficznych patogenów zbóż podstawowych.

Wykaz doniesień konferencyjnych:

Czembor P. Cz., **Czajowski G.**, Słowacki P., Park R. F. 2018. Genetic variation of *Puccinia triticina* on triticale in Poland. International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference. Skukuza, Republika Południowej Afryki, 23-26.09.2018 r.

**Czajowski G.**, Czembor P. Cz., Słowacki P. 2019. Wirulencja i zmienność genetyczna *Puccinia triticina* na pszenżycie. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”. Zakopane, 5-8.02.2019 r.

Wykaz publikacji naukowych:

**Czajowski G.**, Czembor P., Radecka-Janusik M. 2016. Wirulencja *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej na pszenicy w Polsce w latach 2013-2015. Biul IHAR 280: 13-21.

**Czajowski G.**, Czembor P. 2019. Wirulencja populacji *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej na pszenicy i pszenżycie w Polsce w latach 2016-2017. Biul IHAR 287: 35-36.

**Czajowski G.**, Kosman E., Słowacki P., Park R. F., Czembor P. 2020. Development of new SSR markers and analysis of genetic relationship between brown rust fungi on wheat, triticale and rye. Plant Pathology, wysłano do recenzji.

**Czajowski G.**, Kosman E., Słowacki P., Park R. F., Czembor P. 2020. Pathogenic and genetic diversity of *Puccinia triticina* from triticale in Poland. Plant Pathology, wysłano do recenzji.

Współpraca międzynarodowa:

**Prof. Robert Park, The University of Sydney, Australia** – charakterystyka nowego zestawu markerów mikrosatelitarnych w wykrywaniu zmienności w obrębie *Puccinia* spp., w tym gatunku *P. triticina* będącego przedmiotem badań prezentowanych rozprawie doktorskiej.

**Dr Diane Saunders, John Innes Centre, W. Brytania** – sekwencjonowanie DNA izolatów *P. triticina*, wytypowanych do dalszych prac w oparciu o wyniki uzyskane w prezentowanej rozprawie doktorskiej, w celu poszukiwania sekwencji DNA wyróżniających grupy izolatów o odmiennej charakterystyce patogeniczności względem genotypów pszenicy i pszenżyta.

## Streszczenie

Rdza brunatna powodowana przez grzyb *Puccinia triticina* jest jedną z ważniejszych chorób grzybowych pszenicy, a także pszenżyta, które było dotąd uważane za stosunkowo odporne na rdzę brunatną. W ostatnim dziesięcioleciu w uprawach pszenżyta odnotowano znaczne straty z powodu porażenia przez *P. triticina*, który należy do grupy patogenów charakteryzujących się wysokim poziomem zmienności genetycznej. Informacje dotyczące patogeniczności, struktury populacji i częstotliwości wirulencji patogenów odpowiadających genom odporności mają ogromne znaczenie dla skutecznego ich zastosowania w programach hodowli odpornościowej. Dotychczas większość badań prowadzono wyłącznie w oparciu o izolaty uzyskane z odmian pszenicy zwyczajnej i durum. Natomiast niewiele jest prac dotyczących różnic pomiędzy populacjami *P. triticina* występującymi na pszenicy i pszenżycie. Głównym celem pracy była analiza zmienności w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce.

W pierwszym etapie prac badano przydatność nowo opracowanych markerów SSR do wykrywania zmienności gatunków grzybów z rodzaju *Puccinia*. Analizowano zestaw 24 izolatów *P. triticina* z pszenicy i pszenżyta oraz 15 izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis* z żyta. Amplifikacja 34 loci SSR wykazywała obecność produktów PCR o oczekiwanej długości. Dla izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis*, jedynie 16 markerów SSR było polimorficznych. W oparciu o wyniki analizy molekularnej, przy pomocy analizy głównych współrzędnych, izolaty podzielono na trzy grupy „pszeniczną SSR”, „pszenżytnią SSR” i „żytnią SSR”. Na wstępnym etapie badań markery SSR okazały się dobrym narzędziem dla analizy zmienności *P. triticina*.

Następnie wspomniane markery SSR zastosowano w analizie zmienności w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce. Do badań wykorzystano 242 izolaty *P. triticina* wyprowadzone z próbek porażonych liści zebranych w latach 2012-2015, w czterech lokalizacjach: Krakowie, Grodkowicach, Krzeczowicach i Małyszynie. Izolaty były również analizowane pod względem spektrum wirulencji na zestawie 33 blisko-izogenicznych linii pszenicy Thatcher, który zawierał znane geny odporności *Lr* na *P. triticina*. Bazując na wynikach analizy molekularnej izolaty podzielono na dwie grupy SSR. W grupie I SSR odnotowano wyższą częstotliwość wirulentnych izolatów wobec linii z genami *Lr2b* i *Lr2c*, niż w grupie II SSR. Ponadto w grupie II SSR zaobserwowano wyższą częstotliwość wirulencji względem linii z genami: *Lr1*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr20*, *Lr26*, *Lr32*, *Lr63* i *LrB* (RL 6061) niż w grupie I SSR. Zaobserwowano istotne statystycznie zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe pomiędzy grupami SSR, ale niski poziom zróżnicowania pomiędzy lokalnymi populacjami. Ujemne wartości współczynnika wsobności oraz średnie wartości korelacji między profilem molekularnym, a fenotypowym wskazują na to, że populacja *P. triticina* występująca na pszenżycie ma charakter klonalny. Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują na migrację oraz dryf genetyczny przy mniejszym udziale mutacji, jako główne źródło zmienności w populacji *P. triticina* na pszenżycie w Polsce.

## 1. Wstęp i cel pracy

Rdza brunatna powodowana przez *Puccinia triticina* jest ważną chorobą grzybową we wszystkich regionach geograficznych świata, w których uprawiana jest pszenica (Bolton i in., 2008). Dotychczas pszenżyto było uważane za stosunkowo odporne na rdzę brunatną (Mergoum i in., 2004). Jednak w ostatnim dziesięcioleciu w uprawach pszenżyta odnotowano znaczne straty z powodu porażenia przez *P. triticina* w Belgii, Niemczech, Polsce i Rosji (Schinkel, 2002; Ammar i in., 2004; Mikhailova i in., 2009; Audenaert i in., 2014; Arseniuk i Góral, 2015). Przypuszcza się, że wprowadzenie do uprawy nowego gatunku zboża, jakim jest *xTriticosecale* mogło mieć wpływ na selekcję zachodzącą w populacjach patogenów biotroficznych, przyczyniając się tym samym do powstawania nowych ras (Audenaert i in., 2014).

Uprawa odmian pszenżyta posiadających efektywne geny odporności jest przyjaznym środowisku sposobem ograniczenia występowania wielu chorób. *P. triticina* należy do grupy patogenów, które charakteryzują się wysokim poziomem zmienności genetycznej i znaczną zdolnością do przełamывania odporności gospodarza. Informacje dotyczące patogeniczności, struktury populacji i częstotliwości wirulencji patogenów odpowiadających genom odporności, mają ogromne znaczenie dla skutecznego ich zastosowania w programach hodowli odpornościowej (Shiferaw i in., 2013).

Ważnym elementem świadomych strategii hodowli opornościowej jest znajomość zmian zachodzących w populacjach patogenów (Boyd i in., 2013; Burdon i in., 2014). Od wielu lat badania wirulencji regularnie przeprowadzane są w: Czechach (Hanzalová i Bartoš, 2011; Hanzalová i in., 2017), Francji (Goyeau i in., 2006), Niemczech (Lind i Gulyaeva, 2007), na Węgrzech (Manninger, 2006), Litwie (Liatukas i in., 2003), w Polsce (Czajowski i in., 2011; 2016), Rosji (Gulyaeva i in., 2015), Słowacji (Hanzalová i in., 2016), Hiszpanii (Martinez i in., 2005) i Ukrainie (Babayants i in., 2015). Większość badań przeprowadzono wyłącznie w oparciu o izolaty uzyskane z odmian pszenicy zwyczajnej i durum, a niewiele prac dotyczyło różnic pomiędzy populacjami *P. triticina* występującymi na pszenicy i pszenżycie (Manninger, 2006; Woźniak–Strzembicka i Czajowski, 2009; Czajowski i in., 2011; Hanzalová i Bartoš, 2011; Czajowski i Czembor, 2019). W badaniach populacyjnych *P. triticina* stosowano również metody molekularne takie jak: losowe amplifikacje polimorficznego DNA (ang. *Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD) (Park i Felsenstein 1998, Park i in., 2000) oraz polimorfizm długości powielonych fragmentów DNA (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (Membrate i in., 2006). Jednak o wiele skuteczniejsze okazały się metody z użyciem markerów mikrosatelitarnych (ang. *Simple Sequence Repeat*, SSR), co poskutkowało ich szerszym zastosowaniem w badaniach zmienności w populacji *P. triticina* (Szabo i Kolmer, 2007; Goyeau i in., 2007; Mantovani i in., 2010; Kolmer i in., 2013; Kolmer i in., 2015; Kolmer i Avecedo, 2016; Gulyaeva i in., 2017; Kolmer i in., 2020).

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania miały na celu:

- analizę przydatności markerów mikrosatelitarnych do wykrywania zmienności dla *P. triticina* i *P. recondita* f. sp. *secalis*,
- analizę zmienności w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Analiza przydatności markerów mikrosatelitarnych do wykrywania zmienności genetycznej dla *Puccinia triticina* i *Puccinia recondita* f. sp. *secalis*

#### 2.1.1. Przygotowanie i identyfikacja tożsamości gatunkowej izolatów

W badaniach zastosowano zestaw 24 jednozarodnikowych izolatów *P. triticina* (11 z pszenicy i 13 z pszenżyta), a także 15 izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis* z żyta. Izolaty rozmnażano na podatnych odmianach: Marko (pszenżyto), Michigan Amber (pszenica) i linii TD 4076 (żyto). Tożsamość gatunkową zweryfikowano na podstawie analizy wszystkich izolatów przy pomocy markera molekularnego PtRA68, który jest specyficzny dla *P. triticina*, zgodnie z procedurą Manjunatha i współautorów (2018).

#### 2.1.2. Analiza molekularna

Analizę molekularną izolatów wykonano przy użyciu zestawu 34 par starterów mikrosatelitarnych SSR: WLR 2-14, WLR 2-25, WLR 2-37, WLR 2-42, WLR 2-48, WLR 3-37, WLR 3-44, WLR 3-46, WLR 3-48, WLR 4-22, WLR 4-29, WLR 4-43, WLR 5-5, WLR 5-10, WLR 5-12, WLR 5-16, WLR 5-18, WLR 5-23, WLR 5-35, WLR 5-36, WLR 5-45, WLR 6-2, WLR 6-24, WLR 6-31, WLR 6-37, WLR 6-38, WLR 6-39, WLR 6-43, WLR 6-45, WLR 7-12, WLR 7-17, WLR 7-18, WLR 7-28, WLR 7-44, opracowanych na Uniwersytecie w Sydney w Australii przez zespół badawczy profesora Roberta Park'a (Tab. 1).

DNA izolowano z 25 mg urediniospor przy pomocy zestawu OmniPrep (VWR International Sp. z o.o., Polska), zgodnie z protokołem producenta. Stężenie DNA oznaczano przy pomocy spektrofotometru Nano Drop ND-1000 (Thermo Scientific Sp. z o.o., Polska).

Reakcję polimerazy łańcuchowej (*ang. PCR*) amplifikacji loci SSR przeprowadzono w termocyklerze Mastercycler ep Gradient (Eppendorf GmbH, Niemcy), stosując następujący profil temperaturowy: wstępna denaturacja w 95°C przez 3 min; 15 cykli obejmujących: 94°C przez 30 s, 65°C przez 30 s ze zmniejszeniem o 1°C na cykl i 72°C przez 80 s, 30 cykli w 94°C przez 15 s, 50°C przez 15 s, 72°C przez 45 s i końcowe wydłużenie 72°C przez 5 min.

Produkty amplifikacji rozdzielono w 4,5% żelu poliakryloamidowym przy użyciu analizatora DNA ABI377XL (Applied Biosystems, St. Zjednoczone).

#### 2.1.3. Analiza statystyczna

Dla każdego spośród 34 markerów SSR określono wielkość amplifikowanego produktu i zapisano w formacie danych kodominacyjnych (określających wielkość produktu amplifikacji). Stopień polimorficzności markerów mikrosatelitarnych SSR, określono przy pomocy współczynnika polimorfizmu (*ang. Polymorphism Information Content, PIC*). W oparciu o uzyskane wyniki z analizy molekularnej izolaty *P. triticina* i *P. recondita* f. sp. *secalis* zostały pogrupowane przy użyciu analizy współrzędnych głównych (*ang. Principal Coordinates Analysis, PCoA*) w programie GenAlEx wersja 6.5.

### 2.2. Analiza zmienności w populacji *Puccinia triticina* występującej na pszenżycie

W celu wykonania badań, przygotowano 242 jednozarodnikowe izolaty *P. triticina*, które uzyskano z próbek porażonych liści zebranych w latach 2012-2015, w czterech lokalizacjach: Krakowie, Grodkowicach, Krzczowicach i Małyszynie, z podatnej odmiany pszenżyta Marko. Analiza wirulencji wykonana została w oparciu o zestaw 33 linii bliskoizogenicznych odmiany Thatcher, ze znanymi genami *Lr* oporności na rdzę brunatną (jako wrażliwą odmianę kontrolną zastosowano odmianę pszenicy Thatcher): *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr3ka*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr18*, *Lr19*,

*Lr20, Lr21, Lr23, Lr24, Lr25, Lr26, Lr28, Lr29, Lr30, Lr32, Lr33, Lr44, Lr52, Lr63, LrB* (RL 6051), *LrB* (RL 6061). Rośliny w stadium siewki, z rozwiniętym w pełni pierwszym liściem, inokulowano zawiesiną zarodników. Ocena reakcji odpornościowych wykonano po 10–12 dniach od inokulacji, stosując skalę oceny typu infekcji 0–4, w której oceny 0–2 oznaczały reakcję odpornościową rośliny (awirulencja), podczas gdy 3 i 4 wrażliwość (wirulencja) (Long i Kolmer 1989).

Do identyfikacji ras *P. triticina* użyto zestaw 16 linii blisko-izogenicznych odmiany Thatcher, które pogrupowano na zestawy po 4 linie: pierwszy zestaw: *Lr1, Lr2a, Lr2c, Lr3*, drugi zestaw: *Lr9, Lr16, Lr24, Lr26*, trzeci zestaw: *Lr3ka, Lr11, Lr17, Lr30*, a także czwarty zestaw *LrB* (RL 6051), *Lr10, Lr14a, Lr18* (Long i Kolmer, 1989).

Analiza molekularna przeprowadzona została w oparciu o wspomniany wcześniej zestaw 34 par starterów mikrosatelitarnych SSR. Procedury izolacji DNA z izolatów *P. triticina*, amplifikacji i rozdziału DNA wykonano w identyczny sposób jak na wcześniejszym etapie badań. Podział na genotypy wykonano przy pomocy funkcji *Multilocus* w programie GenAlEx wersja 6.5.

### 2.2.1. Analiza statystyczna

Wyniki analizy wirulencji konwertowano na dane binarne (0 – reakcja IT w zakresie 0–2 oraz 1 – reakcja IT w zakresie 3–4), natomiast wyniki analizy molekularnej wyrażono w postaci danych kodominacyjnych. Grupowanie wykonano w oparciu o wyniki analizy struktury populacji wykonanej w programie STRUCTURE (Pritchard i in., 2000), a także analizy współrzędnych głównych (PCoA) w programie GenAlEx wersja 6.5. Poziom heterozygotyczności obliczono w oparciu o współczynniki heterozygotyczności oczekiwanej ( $H_e$ ) i obserwowanej ( $H_o$ ). W celu określenia stopnia wsobności badanej populacji obliczono wskaźnik wsobności  $F$ . Do obliczenia różnorodności w obrębie populacji zastosowano indeks Shannon'a ( $SH$ ) i jego znormalizowaną wersję ( $Sh$ ). Współczynniki zróżnicowania genetycznego  $R_{ST}$ ,  $F_{ST}$  i  $\Phi_{PT}$ , obliczono przy pomocy analizy wariacji molekularnej AMOVA w środowisku programu komputerowego GenAlEx wersja 6.5. W analizie AMOVA zastosowano 999 permutacji. W celu określenia korelacji pomiędzy profilem molekularnym SSR a fenotypowym opartym na analizie wirulencji badanych izolatów wykonano test Mantel'a (Mantel, 1967). W analizie zastosowano 999 permutacji.

## 3. Wyniki i dyskusja

### 3.1. Analiza przydatności markerów mikrosatelitarnych do wykrywania zmienności genetycznej dla *Puccinia triticina* i *Puccinia recondita* f. sp. *secalis*

Celem niniejszej pracy była ocena zmienności w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce. W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę przydatności, a także uniwersalności nowych markerów mikrosatelitarnych (SSR), do wykrywania zmienności w przypadku dwóch gatunków grzybów z rodzaju *Puccinia*: *P. triticina* i *P. recondita* f. sp. *secalis*.

Wszystkie markery SSR badane na izolatach *P. triticina* amplifikowały w PCR produkty o oczekiwanej wielkości (Tab. 1). W przypadku izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis*, jedynie dla 21 markerów SSR uzyskano produkty amplifikacji o oczekiwanej wielkości, wśród nich tylko 16 było polimorficznych. Współczynnik PIC wynosił 0,14–0,93 dla *P. triticina* i 0–0,76 dla *P. recondita* f. sp. *secalis*. Analiza izolatów *P. triticina* wykazała, że 22 markery SSR miały wartości PIC 0,57–0,93, natomiast odnośnie izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis*, tylko trzy markery SSR miały wartości PIC 0,58–0,76. Liczba alleli na locus

wynosiła 2—24 dla *P. triticina* i 0—8 dla *P. recondita* f. sp. *secalis*. Spośród izolatów *P. triticina* zaobserwowano 9—14 alleli dla pięciu markerów: WLR3-37, WLR3-46, WLR3-48, WLR5-18, WLR5-45 i 24 allele w przypadku dwóch markerów: WLR5-10 i WLR5-12. Wśród izolatów *P. recondita* f. sp. *secalis*, dwa markery SSR: WLR3-48 i WLR5-12 miały 8 i 7 alleli. W przypadku wspomnianych markerów wartości PIC dla obu gatunków rdzy były wysokie (0,62—0,93). W badaniach przeprowadzonych przez Duan'a i współautorów (2003) oraz Szabo i Kolmer'a (2007), opracowano markery SSR dinukleotydowe i trinukleotydowe. Duan i współautorzy (2003) oceniali polimorfizm 31 markerów SSR, wśród których jedynie 12 markerów SSR było polimorficznych. Wykrywały one stosunkowo małą liczbę alleli (2—9). Tę samą liczbę alleli dla loci SSR wykryli Szabo i Kolmer (2007), gdy charakteryzowali 18 polimorficznych markerów SSR.

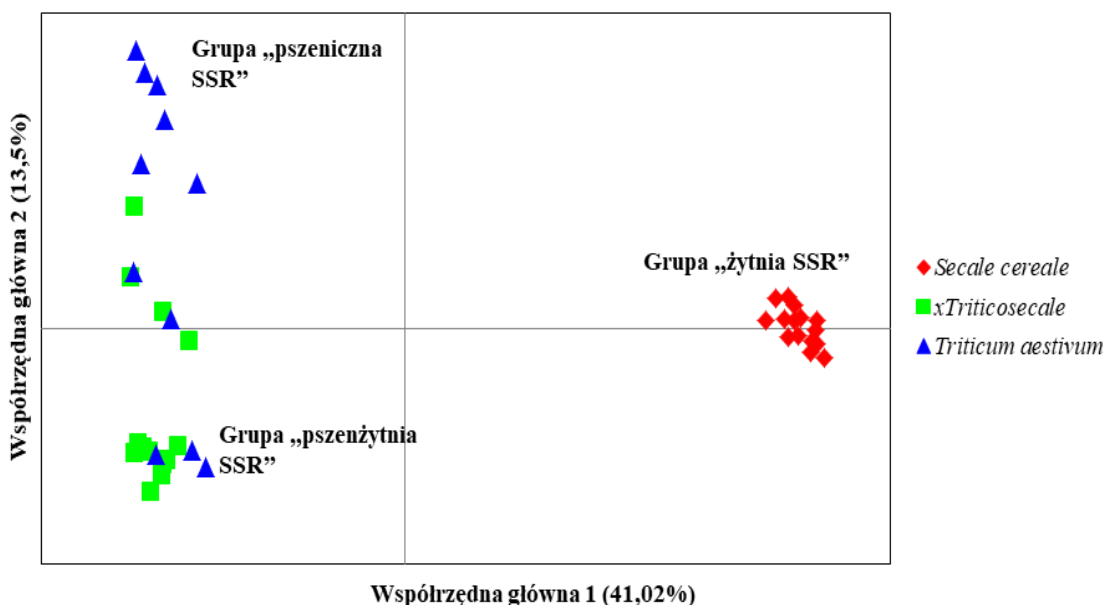
W ramach prezentowanych badań izolaty *P. triticina* i *P. recondita* f. sp. *secalis*, zostały podzielone na trzy grupy: „pszeniczną SSR”, „pszenżytnią SSR” i „żytnią SSR”. Grupy „pszeniczna SSR” i „pszenżytnia SSR” były heterogeniczne, natomiast grupa „żytnia SSR” homogeniczna pod względem gospodarza. Ponadto grupa „żytnia SSR”, była wyraźnie odrębna pod względem genetycznym (Ryc. 1).

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały podobieństwo sekwencji mikrosatelitarnych między dwoma gatunkami z rodzaju *Puccinia*. Wyniki te wskazują, że z powodzeniem można wykorzystać opisany zestaw 34 markerów SSR w analizach genetycznych, a także określenia powiązań filogenetycznych pokrewnych gatunków z rodzaju *Puccinia*.

**Tabela 1.** Charakterystyka polimorfizmu markerów mikrosatelitarnych SSR dla dwóch gatunków grzyba: *Puccinia triticina* (Pt) i *Puccinia recondita* f. sp. *secalis* (Prs).

| L.p. | Nazwa locus | Typ locus  | Sekwencja startera (5' – 3')                          | Wielkość produktu (pz) | PIC  |      | Liczba alleli |     |
|------|-------------|--|---|------------------------|------|------|---------------|-----|
|      |             |  |   |                        | Pt   | Prs  | Pt            | Prs |
| 1    | WLR2-14     | (CA) <sub>13</sub>                                       | F: GGAGGGCGGGGTATCCTTCT<br>R: AAGGCCGAAATTAGAAGAGAGA  | 178-350                | 0,53 | 0,37 | 3             | 2   |
| 2    | WLR2-25     | (AC) <sub>15</sub>                                       | F: CCGCCAGCCAATCCCCACTC<br>R: GCAAGGCCACACTATCAAG     | 295-398                | 0,61 | 0,44 | 4             | 3   |
| 3    | WLR2-37     | (AC) <sub>17</sub>                                       | F: GCCGAGAACGAAGACAACA<br>R: CCCACACCCCGAACCTTAC      | 170-220                | 0,57 | -    | 4             | 0   |
| 4    | WLR2-42     | (AG) <sub>18</sub>                                       | F: AGGACGGGATGGATCAGAAA<br>R: TGTCTGTGCGTTTTATTG      | 257-290                | 0,58 | -    | 3             | 0   |
| 5    | WLR2-48     | (AG) <sub>25</sub> (AG) <sub>28</sub>                    | F: AGGGTTGGCTTCTGGGATA<br>R: TGCCCCACACCGTTTCTTA      | 320-450                | 0,41 | -    | 3             | 0   |
| 6    | WLR3-37     | (TTC) <sub>16</sub> (TTG) <sub>13</sub>                  | F: CTCGGGCAGGTGCTCTTTGG<br>R: CCCCCAGCAAACGAAGCA      | 190-300                | 0,78 | -    | 10            | 0   |
| 7    | WLR3-44     | (GAT) <sub>22</sub> (GAT) <sub>7</sub>                   | F: GCCGAGAGGTTTCATTTTCA<br>R: TGCCAGCTTAATCACTTCA     | 195-220                | 0,59 | -    | 5             | 0   |
| 8    | WLR3-46     | (TTG) <sub>23</sub> (T) <sub>16</sub>                    | F: TCCGTTTGCGAATTTTCATCT<br>R: CAGGCGCAGGGGCAGGATGG   | 150-200                | 0,78 | -    | 9             | 0   |
| 9    | WLR3-48     | (TCA) <sub>29</sub> (GTC) <sub>6</sub>                   | F: GGCATCTGGGTTGTATCATT<br>R: TGAGGGGTTTGTGCAATTTA    | 303-350                | 0,78 | 0,76 | 9             | 8   |
| 10   | WLR4-22     | (TTAT) <sub>8</sub>                                      | F: GTGGAGTTAGTTAAGATTAG<br>R: ACCACTTCACTGACTAATAC    | 198-300                | 0,57 | -    | 3             | 0   |
| 11   | WLR4-29     | (TTTG) <sub>9</sub> (T) <sub>7</sub> (GTTT) <sub>6</sub> | F: ATTAGCGACTCCATACACAA<br>R: CAGGAGACAAGCCAGAAAAA    | 285-344                | 0,69 | 0,3  | 5             | 2   |
| 12   | WLR4-43     | (ATCA) <sub>20</sub>                                     | F: ACTCCGTGAAGATGAGGATA<br>R: TGACTGCAATACAATAAGA     | 284-350                | 0,76 | 0,58 | 8             | 4   |
| 13   | WLR5-5      | (ATTTT) <sub>6</sub>                                     | F: ATCCCGTTTTATCGTAGTTT<br>R: GGTGGCGGTGGTGGTTGAG     | 175-250                | 0,75 | -    | 7             | 0   |
| 14   | WLR5-10     | (AAATG) <sub>7</sub> (AATGA) <sub>5</sub>                | F: CAGCAGCCTAGAGACAAAGA<br>R: GGTCTATCTCTGCATTTTT     | 211-450                | 0,93 | -    | 24            | 0   |
| 15   | WLR5-12     | (AATGA) <sub>7</sub>                                     | F: CTGGGGATGGCTGTCAAAATGT<br>R: TGCGTGTGGTGTCTCTGTTTT | 243-450                | 0,91 | 0,62 | 24            | 7   |
| 16   | WLR5-16     | (TAGCG) <sub>7</sub>                                     | F: TGACCTGTAGAATCCAATTA<br>R: CACAACGGAGTTTTTCTGAC    | 212-220                | 0,41 | 0,37 | 3             | 2   |
| 17   | WLR5-18     | (AAAAG) <sub>8</sub>                                     | F: TGCGCTTGATGTTGATAGG<br>R: GGTGGGGGTGGGTTTATATG     | 217-300                | 0,75 | 0    | 9             | 1   |
| 18   | WLR5-23     | (GTAGC) <sub>8</sub>                                     | F: GTGCGCCACAGTGCCTTTAG<br>R: TCCCCTTGTAGTAGTCCAC     | 197-310                | 0,69 | 0,37 | 6             | 2   |
| 19   | WLR5-35     | (GTCCC) <sub>13</sub>                                    | F: TCCCCTCAAACCTCCTCAAT<br>R: GCGGGGACGGGAAGAAAAAG    | 200-256                | 0,45 | 0    | 7             | 1   |
| 20   | WLR5-36     | (GTAGC) <sub>14</sub>                                    | F: AACGTGTAGCGTGAATAG<br>R: AGGAAGAGGCCGACTTAAC       | 205-261                | 0,72 | 0,28 | 7             | 4   |

|    |         |   |   |         |      |      |    |   |
|----|---------|---|---|---------|------|------|----|---|
| 21 | WLR5-45 | (GTATT) <sub>20</sub>                         | F: GGCCCATCCCAGCAATACAA<br>R: ACGGGGCTTAGTTGCTTT          | 185-450 | 0,86 | -    | 14 | 0 |
| 22 | WLR6-2  | (CAAAAA) <sub>5</sub>                         | F: TCGTCGCTTTGAGGTATGT<br>R: TTCCGCCATGTCGCTTACT          | 241-290 | 0,19 | 0,37 | 2  | 2 |
| 23 | WLR6-24 | (CCCATC) <sub>7</sub>                         | F: GCGGGGGACACAACCTTCTT<br>R: GGCGGGGCAGTGGGTGGGT         | 244-260 | 0,57 | -    | 3  | 0 |
| 24 | WLR6-31 | (TGAGGA) <sub>8</sub>                         | F: ACGTGGGCCGGATTATAGTT<br>R: CCGCACCACCTACCAAGTC         | 214-245 | 0,14 | 0    | 2  | 1 |
| 25 | WLR6-37 | (CCATT) <sub>11</sub>                         | F: ACATGCAAAAAGAATGATAA<br>R: GAAGGCAAGTAAACAGAAAA        | 176-270 | 0,72 | 0,37 | 7  | 2 |
| 26 | WLR6-38 | (ACAGGA) <sub>12</sub>                        | F: GGGGGCCTGGAAGCATGTAA<br>R: AGCTGCCCCAAAAAATGTC         | 233-300 | 0,4  | 0,48 | 3  | 3 |
| 27 | WLR6-39 | (TTCTGG) <sub>12</sub> (TTG) <sub>6</sub>     | F: AAGCGGGCGGGCTTGAAGTG<br>R: CAGCGCAGGAAGAAGTTCGAT       | 230-290 | 0,67 | 0,37 | 4  | 2 |
| 28 | WLR6-43 | (AAGAAC) <sub>15</sub>                        | F: GCACGAGACCGAGTAGAAAC<br>R: TCCGTCGACTTATCCTGTT         | 250-350 | 0,36 | 0,12 | 6  | 2 |
| 29 | WLR6-45 | (GAACAA) <sub>15</sub> (GAACAA) <sub>13</sub> | F: AGCACGAGCAGACGACCGAGTAGA<br>R: TGGTTGGTTCTCCGTCGACTTAT | 250-350 | 0,36 | 0    | 6  | 1 |
| 30 | WLR7-12 | (CAC) <sub>9</sub> (CAA) <sub>5</sub>         | F: ATGCTCGCCAGTCCCTCATCA<br>R: TGGAGTTCGGCGTGGATATTA      | 220-265 | 0,4  | 0,29 | 3  | 2 |
| 31 | WLR7-17 | (CAC) <sub>11</sub>                           | F: ACGACTCCCGAACTTGTACGC<br>R: GGCGGAGAACAAAGTGGCGAAG     | 161-202 | 0,34 | -    | 2  | 0 |
| 32 | WLR7-18 | (CAC) <sub>11</sub>                           | F: ACCGCCCTCCATCCACAAAAAC<br>R: TTCCGTCGATGATGTGATGATG    | 212-270 | 0,59 | 0    | 4  | 1 |
| 33 | WLR7-28 | (AAGTG) <sub>6</sub>                          | F: GGCGAGCGAGGGTGGGGAAG<br>R: GGTGTGCCCATCTGTGTGA         | 227-290 | 0,41 | 0,37 | 3  | 2 |
| 34 | WLR7-44 | (TGGTCGA) <sub>7</sub>                        | F: GGCGGCGAGGATCTTGTGAGG<br>R: TCGGAGGGGAAGAAATGCTGGT     | 348-450 | 0,67 | -    | 5  | 0 |



**Rycina 1.** Dwuwymiarowy wykres analizy współrzędnych głównych (PCoA) dla izolatów *P. triticina* i *P. recondita* f. sp. *secalis* uzyskany w oparciu o wyniki analizy molekularnej markerów mikrosatelitarnych SSR z wyróżnieniem ich pochodzenia względem gospodarza (rośliny żywicielskiej).

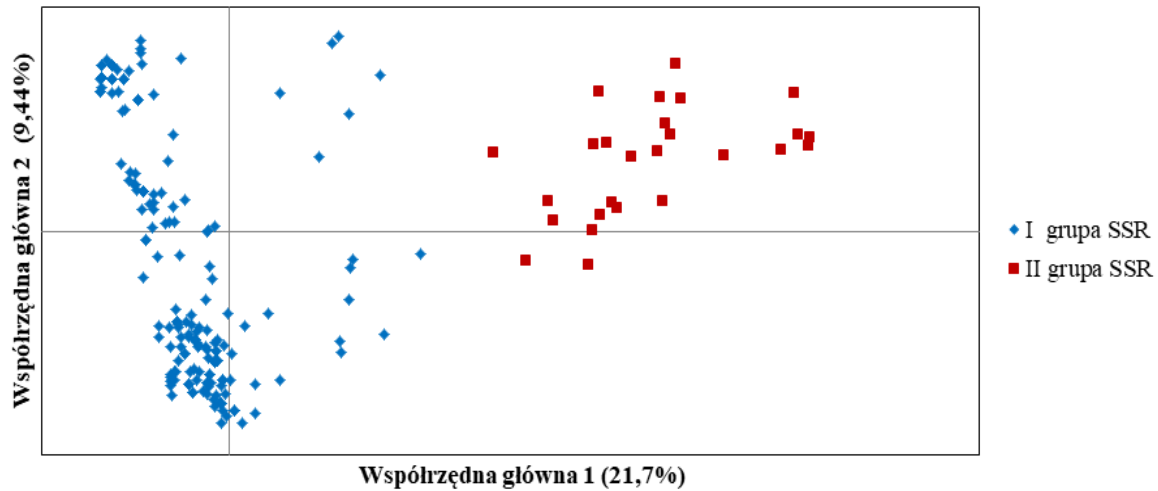
### 3.2. Analiza zmienności w populacji *Puccinia triticina* występującej na pszenżycie

Dotychczasowe badania populacji *P. triticina* wykonywano na populacjach *P. triticina* pochodzących z pszenicy zwyczajnej (*T. aestivum*) i durum (*T. turgidum* ssp. *durum*), stosując do oceny zmienności genotypowej markery SSR opracowane przez Duan'a i współautorów (2003), a także Szabo i Kolmer'a (2007). Kolmer i współautorzy (2007, 2011, 2013, 2015, 2020) przeprowadzili zakrojone na szeroką skalę badania różnicowania genetycznego populacji *P. triticina* występujących w różnych regionach świata.

W prezentowanej pracy analizowano zmienność 242 izolatów *P. triticina* pochodzących z pszenżyta. Przy pomocy oprogramowania STRUCTURE, a także analizy składowych głównych PCoA, 242 izolaty *P. triticina* zostały podzielone na dwie grupy ( $\Delta k =$



734,98): 216 izolatów przypisano do grupy I SSR, natomiast 26 izolatów do grupy II SSR. Dwie główne składowe analizy PCoA wyjaśniały kolejno 21,7% i 9,44% zmienności w badanej populacji izolatów (Ryc. 2). W oparciu o profil molekularny izolatów, zidentyfikowano 172 genotypy *P. triticina* (funkcja *Multilocus* w programie GenAIEx, wersja 6.5).



**Rycina 2.** Dwuwymiarowy wykres analizy współrzędnych głównych (PCoA) uzyskany dla 242 izolatów *P. triticina* analizowanych w 34 loci SSR.

Wszystkie badane izolaty *P. triticina* były wirulentne wobec odmiany Thatcher i awirulentne względem linii z genami *Lr9* i *Lr19*. Niską częstotliwość wirulencji w każdej grupie SSR zaobserwowano dla linii z genami *Lr2a*, *Lr23*, *Lr25*, *Lr28* i *Lr52*. Znaczące zróżnicowanie w częstotliwości wirulencji odnotowano w przypadku linii z genami: *Lr1*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr20*, *Lr26*, *Lr32*, *Lr63* i *LrB* (RL 6061). Wobec linii z genami: *Lr1*, *Lr3*, *Lr3bg*, *Lr16*, *Lr17a*, *Lr20*, *Lr26*, *Lr32*, *Lr63* i *LrB* (RL 6061) niską częstotliwość wirulencji zaobserwowano tylko w grupie I SSR, natomiast w przypadku linii z genami *Lr2b* i *Lr2c* niską częstotliwość wirulencji tylko w grupie II SSR. Na podstawie prac wykonanych wcześniej przez innych autorów można stwierdzić, że w populacji występującej na pszenicy notuje się zwykle większą częstotliwość wirulentnych izolatów wobec linii z genami: *Lr1*, *Lr3*, *Lr15*, *Lr17a* i *Lr26* niż w populacji występującej na pszenicy, w której notuje się zwykle wyższą frekwencję izolatów wirulentnych względem linii z genami *Lr2b* i *Lr2c* (Manninger, 2006; Woźniak-Strzembicka i Czajowski, 2009; Hanzalová i Bartoš, 2011). Jednak bez wiedzy na temat struktury poszczególnych patotypów występujących w danej populacji patogenu, trudno jest wyciągnąć jednoznaczne wnioski na temat preferencji pasożytniczych określonych izolatów. W związku z tym wykonana została identyfikacja poszczególnych patotypów występujących w badanej populacji *P. triticina* występującej na pszenicy.

W oparciu o wyniki uzyskane w analizie wirulencji zidentyfikowano 107 patotypów *P. triticina*. Do najczęściej występujących patotypów zaliczone zostały: DDRT (13,2%), DDHT (7,4%), a także DDRR, DBRT i DBHT, które stanowiły 3–5% populacji. Analizując rozkład patotypów można zauważyć, że grupa I SSR była wyraźnie zdominowana przez patotypy: DDRx (wirulencja wobec linii z genami: *Lr2c*, *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr24* i *Lr30*; x oznacza dowolny kod układu typów infekcyjnych), DDHx (wirulencja wobec linii z genami: *Lr2c*, *Lr11*, *Lr24* i *Lr30*), a także: BBxx (awirulencja wobec linii z genami: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3*, *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*), DBHx (wirulencja wobec *Lr2c*, *Lr11* i *Lr30*), DBRx (wirulencja wobec linii z genami: *Lr2c*, *Lr3ka*, *Lr11* i *Lr30*), DGxx (wirulencja wobec linii z genami:

*Lr2c* i *Lr16*), DJxx (wirulencja wobec linii z genami: *Lr2c*, *Lr16* i *Lr24*). Z badań przeprowadzonych przez Aoun i współautorów (2020) wynika, że wśród izolatów występujących na pszenżycie w Hiszpanii i Tunezji zidentyfikowano patotypy FBBNQ, FBBPQ, CBGNQ, które były wirulentne w stosunku do linii z genami: *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr14a*, *Lr14b* i *LrB*, natomiast awirulentne względem: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr9*, *Lr16*, *Lr26*, *Lr10*, *Lr20*, *Lr28*, *Lr11*, *Lr17* i *Lr30*. Patotypy te miały bardzo zbliżony profil wirulencji do patotypów występujących na pszenżycie w Polsce. Podczas gdy, w grupie II SSR przeważały patotypy MHxx i MKxx, których wspólną cechą była wirulencja względem linii z genami: *Lr1*, *Lr3*, *Lr16* i *Lr26*.

Z przeprowadzonej analizy molekularnej wynika, że średnia liczba alleli wynosiła 5,65 w grupie I SSR i 5,32 w grupie II SSR, a średnia liczba efektywnych alleli ( $N_e$ ) wynosiła 2,57 w grupie I SSR i 3,18 w grupie II SSR. Indeks Shannon'a ( $SH$ ) wynosił 0,9 w grupie I SSR i 1,16 w grupie II SSR. Natomiast, wartość znormalizowanego indeksu Shannon'a ( $Sh$ ) wynosiła 0,18 dla grupy I SSR i 0,36 dla grupy II SSR. Uzyskane wyniki wskazują, że polska populacja *P. triticina* pochodząca z pszenżyta odznacza się mniejszym poziomem zróżnicowania genetycznego, niż przebadana przez Kolmer'a i współautorów (2013), europejska populacja występująca na pszenicy, w przypadku której zaobserwowano zróżnicowanie na poziomie  $Sh$  0,4—0,84.

W obydwu grupach wartości  $H_o$  były wyższe niż wartości  $H_e$ , a indeks wsobności  $F$  przyjmował ujemne wartości. Zaobserwowano istotną statystycznie korelację Mantel'a ( $r = 0,51$ ;  $P = 0,001$ ) między macierzami dystansu genetycznego dla wirulencji i markerów mikrosatelitarnych SSR. Uzyskane wyniki wskazują na klonalny charakter polskiej populacji *P. triticina* pochodzącej z pszenżyta. Podobne rezultaty uzyskano w pracach innych badaczy, takich jak Goyeau i współautorzy (2007) Kolmer i współautorzy (2013; 2015) oraz Gulyaeva i współautorzy (2017), którzy prowadzili swoje prace na populacji *P. triticina* występującej na pszenicy zwyczajnej i durum.

Zróżnicowanie genetyczne pomiędzy obydwoma grupami SSR określono w oparciu o współczynniki  $R_{ST}$ ,  $F_{ST}$ . Współczynnik  $F_{ST}$  (0,26) wskazywał na wysoki poziom zróżnicowania pomiędzy analizowanymi grupami SSR. Podczas gdy, współczynnik  $R_{ST}$  (0,18) wskazywał na zdecydowanie mniejszy poziom zróżnicowania. Według Hardy'ego i współautorów (2003) identyczne wartości  $R_{ST}$  i  $F_{ST}$  mogą wskazywać na brak udziału modelu stopniowych mutacji w różnicowaniu genetycznym badanej populacji. Model  $R_{ST}$  wskazuje, że mutacja jest potencjalnym źródłem zmienności, podczas gdy model  $F_{ST}$  wskazuje na dryf genetyczny (Balloux i Lugon-Moulin, 2002; Kolmer i in., 2011). W związku z tym można przypuszczać, że uzyskana w prezentowanych badaniach różnica pomiędzy wartościami współczynników  $F_{ST}$  i  $R_{ST}$  wskazuje, że w polskiej populacji *P. triticina* związanej z pszenżycem większy wpływ na zmienność ma dryf genetyczny, aniżeli mutacje. Według Goyeau i współautorów (2007), a także Kolmer'a i współautorów (2011) dryf genetyczny może być istotnym mechanizmem wpływającym na zmienność populacji *P. triticina*. Zwłaszcza, gdy na lokalną populację patogenu mają wpływ takie zjawiska jak: ciężkie zimy, opryski fungicydami lub uprawa na dużą skalę odmian odpornych na obecne w populacji rasy patogenu, a także eliminacja alternatywnego gospodarza, które mogą doprowadzić do zahamowania rozwoju populacji. Jednak nie ma jednoznacznych dowodów na to, że dryf genetyczny może mieć bezpośredni wpływ na zmienność w populacji *P. triticina* (Kolmer i in., 2011). W związku z tym, zgodnie z prezentowaną niższą wartością  $R_{ST}$  należy również uwzględnić udział mutacji w kształtowaniu zmienności w populacji.

Zróżnicowanie fenotypowe obliczono w oparciu o profil wirulencji izolatów, przy pomocy współczynnika  $\phi_{PT}$ . Zaobserwowano średni poziom zróżnicowania fenotypowego pomiędzy grupami SSR na poziomie 0,32. Dla wszystkich wspomnianych współczynników odnotowano statystycznie istotne zróżnicowanie przy prawdopodobieństwie ( $P < 0,001$ ). W badaniach przeprowadzonym przez Kolmer'a i współautorów (2013) w Europie zmienność fenotypowa pomiędzy grupami SSR wynosiła 0,07—0,64. Przepuszczalnie poziom zmienności fenotypowej może być związany z wielkością obszaru badań i presją selekcyjną zbóż uprawianych w Europie na lokalne populacje grzyba (Goyeau i in., 2006; Gulyaeva i in., 2017).

Wspomniane współczynniki ( $R_{ST}$  i  $F_{ST}$ ) zastosowano również do obliczenia zróżnicowania genetycznego pomiędzy lokalnymi populacjami. Uzyskane wyniki wskazywały na niski poziom (0—0,04) zróżnicowania pomiędzy lokalizacjami. Statystycznie istotny poziom zróżnicowania zaobserwowano pomiędzy populacjami występującymi w Krzeczowicach i Małyszynie ( $R_{ST} = 0,02$ ,  $F_{ST} = 0,02$ , przy  $P$  na poziomie 0,001 i 0,006), a także pomiędzy populacjami z Grodkowic i Małyszyna ( $R_{ST} = 0,04$ ,  $F_{ST} = 0,03$ , przy  $P$  na poziomie 0,001 i 0,003). Współczynnik  $\phi_{PT}$  wskazywał na niewielki poziom zróżnicowania fenotypowego pomiędzy populacjami. Uzyskane wyniki wskazywały na występowanie największego zróżnicowania pomiędzy populacjami z Krakowa i Grodkowic ( $\phi_{PT} = 0,04$ ), Krzeczowic i Grodkowic ( $\phi_{PT} = 0,05$ ), a także pomiędzy populacjami z Małyszyna i Krzeczowic ( $\phi_{PT} = 0,04$ ), przy  $P < 0,001$ . W badaniach przeprowadzonych przez Park'a i współautorów (2001) w Europie, wykryto zróżnicowanie zarówno na poziomie geograficznym, jak i fenotypowym. Gulyaeva i współautorzy (2017) zaobserwowali znaczące zróżnicowanie genetyczne *P. triticina* między regionami geograficznymi w Federacji Rosyjskiej.

Podsumowując, warto zaznaczyć, że wykonane badania są pierwszymi, w których dokonano próby poznania zmienności genetycznej w populacji *P. triticina* występującej na pszenicy, bazując na polimorfizmie DNA w loci SSR i analizie wirulencji. Z przeprowadzonych analiz wynika, że badana populacja ma charakter klonalny, podobnie jak populacje *P. triticina* występujące w innych krajach i regionach geograficznych. Badaną populację można podzielić na dwie grupy SSR, pomiędzy którymi występuje umiarkowane zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe. Jednak nie zaobserwowano zróżnicowania, pomiędzy lokalnymi populacjami. Z wykonanych analiz wynika, że źródeł wykrytej zmienności można doszukiwać się w migracji, mutacji i dryfie genetycznym. Wpływ migracji można zauważyć w oparciu o niewielkie zróżnicowanie genetyczne i fenotypowe pomiędzy lokalnymi populacjami, a także występowaniu podobnych patotypów i genotypów w lokalizacjach zbioru prób, pomiędzy którymi nie ma geograficznych barier niemożliwiających migrację uredyniospor wraz z prądami powietrza. Natomiast w oparciu o uzyskane wartości dla współczynników  $F_{ST}$  i  $R_{ST}$  można przypuszczać, że na zmienność w badanej populacji może mieć dryf genetyczny przy mniejszym udziale mutacji. W oparciu o uzyskane wyniki częstotliwości wirulencji, a także znajomość profilu wirulencji poszczególnych patotypów, można wyciągnąć wstępne wnioski dotyczące preferencji pasożytniczych izolatów *P. triticina*. Najprawdopodobniej izolaty przypisane do grupy I SSR można zaklasyfikować do populacji związanej przede wszystkim z pszenicą, podczas gdy izolaty z grupy II SSR można zaliczyć do populacji związanej głównie z pszenicą.

#### 4. Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonej analizy molekularnej zróżnicowania genetycznego w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce można potwierdzić wysoką skuteczność zastosowanego w badaniach, nowego zestawu 34 markerów mikrosatelitarnych.
2. Wspomniany zestaw 34 markerów mikrosatelitarnych opracowanych na podstawie sekwencji DNA *P. triticina* odznacza się pewnym stopniem uniwersalności w stosunku do gatunku pokrewnego *P. recondita* f. sp. *secalis*.
3. W populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie, oprócz patotypów, które mogą wykazywać preferencję pasożytnictwa w kierunku pszenżyta, można również odnotować występowanie patotypów o preferencji ukierunkowanej na pszenicę.
4. Populacja *P. triticina* pochodząca z pszenżyta ma głównie charakter klonalny.
5. Z przeprowadzonych analiz zmienności wynika, że na zmienność w populacji *P. triticina* występującej na pszenżycie w Polsce prawdopodobnie największy wpływ ma dryf genetyczny przy mniejszym udziale mutacji, a także migracja urediniospor.

#### 5. Bibliografia

- Ammar K., Mergoum M., Rajaram S. 2004 The history and evolution of triticale. Triticale improvement and production FAO Plant Production and Protection Paper 179: 1-11.
- Arseniuk E., Góral T. 2015. Triticale biotic stresses-known and novel foes. W: Eudes F. (red.) Triticale. Springer, Cham str.: 83-108.
- Audenaert K., Troch V., Landschoot S., Haesaert G. 2014. Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticale (*×Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. Eur J Plant Pathol 140: 615-630.
- Babayants O., Babayants L., Gorash A., Vasilev A., Traskovetskaya V., Galaev A. 2015. Physiologic specialization of *Puccinia triticina* Erikss. and effectiveness of *Lr*-genes in the south of Ukraine during 2013–2014. Chil J Agr Res 75 (4): 443-450.
- Balloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Mol Ecol 11: 155-165.
- Bolton M., Kolmer J. A., Garvin D. F. 2008. Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* Mol Plant Pathol 9 (5): 563-575.
- Boyd L. A., Ridout C., O'Sullivan D. M., Leach J. E., Leung H. 2013. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. Trends Genet 29: 233-240.
- Burdon J. J., Barrett L. G., Rebetzke G., Thrall P. H. 2014. Guiding deployment of resistance in cereals using evolutionary principles. Evol Appl 7: 609-624.
- Czajowski G., Strzembicka A., Karska K. 2011. Wirulencja populacji *Puccinia triticina*, sprawcy rdzy brunatnej pszenicy i pszenżyta w Polsce w latach 2008–2010. Biul IHAR 260/261: 145-153.
- Czajowski G., Czembor P., Radecka-Janusik M. 2016. Wirulencja *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej na pszenicy w Polsce w latach 2013-2015. Biul IHAR 280: 13-21.
- Czajowski G., Czembor P. 2019. Wirulencja populacji *Puccinia triticina* sprawcy rdzy brunatnej na pszenicy i pszenżycie w Polsce w latach 2016-2017. Biul IHAR 287: 35-36.

- Duan X., Enjalbert J., Vautrin D., Solignac M., Giraud T. 2003. Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina*. Mol Ecol Notes DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00350.x
- Goyeau H., Park R., Schaeffer B., Lannou C. 2006. Distribution of pathotypes with regard to host cultivars and French wheat leaf rust populations. Phytopathology 96: 264-273.
- Goyeau H., Halkett F., Zapater M. F., Carlier J., Lannou C. 2007. Clonality and host selection in the wheat pathogenic fungus *Puccinia triticina*. Fungal Genet Biol 44: 474-483.
- Gulyaeva E. I., Shaidayuk E. L., Kazartsev I. A., Aristova M. K. 2015. The structure of Russian populations of *Puccinia triticina* Eriks. Vestn Zashch Rast 3 (85): 5-10.
- Gulyaeva E. I., Aristova M. K., Shaidayuk E. L., Mironenko N. V., Kazartsev I. A., Akhmetova A., Kosman E. 2017. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* Erikss. in Russia. Russ J Genet 53 (9): 998-1005.
- Hanzalová A., Bartoš P. 2011. Resistance of triticale to wheat leaf rust (*Puccinia triticina*) Czech J Genet and Plant Breed 47 (1): 10-16.
- Hanzalová A., Bartoš P., Sumíková T. 2016. Virulence of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) in the years 2013-2015 and resistance of wheat cultivars in Slovakia. Cereal Res Commun 44 (4): 585-593.
- Hanzalová A., Bartoš P., Sumíková T. 2017. Pathotypes of wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Eriks.) and resistance of registered cultivars in the Czech Republic in 2012-2015. Czech J Genet Plant Breed 53: 122-126.
- Hardy O. J., Charbonnel N., Freville H., Heuertz M. 2003. Microsatellite allele sizes: a simple test to assess their significance on genetic differentiation. Genetics 163: 1467-1482.
- Kolmer J. A., Ordoñez M. E., Manisterski J., Anikster Y. 2011. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in the Middle East and genetic similarity with populations in Central Asia. Phytopathology 101: 870-877.
- Kolmer J. A., Ordoñez M., E. 2007. Genetic differentiation of *Puccinia triticina* populations in Central Asia and the Caucasus. Phytopathology 97: 1141-1149.
- Kolmer J. A., Hanzalová A., Goyeau H., Bayles R., Morgounov A. 2013. Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. Plant Pathol 62: 21-31.
- Kolmer J. A., Kabdulova M. G., Mustafina M. A., Zhemchuzhina N. S., Dubovoy V. 2015. Russian populations of *Puccinia triticina* in distant regions are not differentiated for virulence and molecular genotype. Plant Pathol 64 (2): 328-336.
- Kolmer J. A., Acevedo M. A. 2016. Genetically divergent types of the wheat leaf fungus *Puccinia triticina* in Ethiopia, a center of tetraploid wheat diversity. Phytopathology 106: 380-385.
- Kolmer J. A., Herman A., Ordoñez M. E., German S., Morgounov A., Pretorius Z., Visser B., Anikster Y., Acevedo M. 2020. Endemic and panglobal genetic groups, and divergence of host-associated forms in worldwide collections of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* as determined by genotyping by sequencing. Heredity 124: 397-409.
- Liatukas Z. 2003. Virulence of winter wheat leaf rust isolates. Biologija 1: 77-80.
- Lind V., Gulyaeva E. 2007. Virulence frequencies of *Puccinia triticina* in Germany and the European Regions of the Russian Federation. J Phytopathol 155: 13-21.
- Long D. L., Kolmer J. A. 1989. A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. Phytopathology 79: 525-529.
- Manjunatha C., Sharma S., Kulshreshtha D., Gupta S., Singh K., Bhardwaj S. C., Aggarwal R. 2018. Rapid detection of *Puccinia triticina* causing leaf rust of wheat by PCR and loop mediated isothermal amplification. PLoS ONE. 13 (4): 1-14.
- Manninger K. 2006. Physiological specialization of *Puccinia triticina* on wheat and triticale in Hungary in 2004. Acta Phytopathol Entomol Hung 41: 93-100.
- Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res 27: 209-220.
- Mantovani P., Maccaferri M., Tuberosa R., Kolmer J. 2010. Virulence phenotypes and molecular genotypes in collections of *Puccinia triticina* from Italy. Plant Dis 94: 420-424.

- Martinez F., Sillero J. C., Rubiales D. 2005. Pathogenic specialization of *Puccinia triticina* in Andalusia from 1998 to 2000. *Phytopathology* 153: 344-349.
- Membrate S. A., Dehne H. W., Pillen K., Oerke E. C. 2006. Molecular diversity in *Puccinia triticina* isolates from Ethiopia and Germany. *J Phytopathol* 154: 701-710.
- Mergoum M., Pfeiffer W. H., Peña R. J., Ammar K., Rajaram S. 2004. Triticale crop improvement: the CIMMYT programme. Triticale improvement and production FAO. *Plant Production and Protection Paper* 179: 11-27.
- Mikhailova L., Merezhko A. F., Funtikova E. Y. 2009. Triticale diversity in leaf rust resistance. *Russ Agr Sci* 35: 320-323.
- Park R. F., Felsenstein F. G. 1998. Physiological specialization and pathotype distribution of *Puccinia recondita* in western Europe, 1995. *Plant Pathol* 47: 157-164.
- Park R. F., Jahoor A., Felsenstein F. G. 2000. Population structure of *Puccinia recondita* in western Europe during 1995, as assessed by variability in pathogenicity and molecular markers. *J Phytopathol* 148: 169-179.
- Park R. F., Goyeau H., Felsenstein F. G., Bartoš P., Zeller F. J. 2001. Regional phenotypic diversity of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* and wheat host resistance in western Europe, 1995. *Euphytica* 122: 113-127.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Schinkel B. 2002. Triticale-still a healthy crop? W: Arseniuk E., Osiński R. (red.). *Proceedings of the 5th International Triticale Symposium*. Radzików, Polska str.: 157-162.
- Shiferaw B., Smale M., Braun H. J., Duveiller E., Reynolds M., Muricho G. 2013. Crops that feed the world 10. Past successes and future challenges to the role played by wheat in global food security. *Food Secur* 5: 291-317.
- Szabo L. S., Kolmer J. A. 2007. Development of simple sequence repeat markers for the plant pathogenic rust fungus *Puccinia triticina*. *Mol Ecol Notes* 7: 708-710.
- Woźniak-Strzembicka A., Czajowski G. 2009. Wirulencja populacji *Puccinia triticina* w Polsce w latach 2002–2007. *Biul IHAR* 253: 175-183.