

Таким образом, плазмиды группы IncP-9, широко распространенные в природной среде обитания, представляют существенный теоретический и практический интерес и могут быть успешно использованы для генетического анализа различных грамотрицательных бактерий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта БРФФИ Б07-170 и Б08Р-102.

1. Sevastsyanovich Y. R., Krasowiak R., Bingle L. E. H., Haines A. S., Sokolov S. L., Kosheleva I. A., Leuchuk A. A., Titok M. A., Smalla K., Thomas C. M. Diversity of IncP-9 plasmids of *Pseudomonas* // Microbiol. – 2008. – V.154, №29. – p.2929-2941.
2. Sevastsyanovich, Y.R., Titok, M.A., Krasowiak, R., Bingle, L.E.H., Thomas, C.M. Ability of IncP-9 plasmid pM3 to replicate in *Escherichia coli* is dependent on both rep and par functions. Mol. Microbiol., 200557 (3), 819-833.
3. Yarmolinsky M. Transcriptional silencing in bacteria // Curr. Opin. Microbiol. – 2000. - Vol. 3, № 2. - P. 138-143.
4. Василенко С. Л. Туток М. А. Особенности наследования плазмид биодеградаци в клетках гомо- и гетерологичных хозяев. // Микробиология.-2008.-Т.77, №1.- с. 16-22.
5. Fernandez-Tresguerres M.E., Martin M., Garcia de Viedma D. Host growth temperature and a conservative amino acid substitution in the replication protein of pPS10 influence plasmid host range. // J. Bacteriol. – 1995. Vol. 177, № 15. – P. 4377-4384..
6. Туток М.А. Свойство температурной нестабильности плазмиды рMT2 (IncP-9) // Вестник БГУ. – 2005. – Сер. 2, № 1. – С. 26-31
7. Туток М.А. Использование плазмиды широкого круга хозяев рM3 (IncP-9) для генетического анализа бактерий семейства *Enterobacteriaceae* // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 12. – с. 1606-1611.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИАГНОСТИКА ФИТОПАТОГЕННОГО ООМИЦЕТА *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

А.М. Ходосовская, А.Н. Евтушенков

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

hodosovskaya@bsu.by

Фитопатоген *Phytophthora infestans*, относящийся к классу Оомицетов, поражает представителей рода *Solanum* – картофель и томаты, вызывая фитофторозы. *P. infestans* образует межклеточный мицелий с гаусториями и использует эндогенные метаболиты растения на стадиях вегетативного роста, полового и бесполого размножения. Зооспорангии, а также вышедшие из них зооспоры переносятся ветром, водными потоками, что приводит к быстрому заражению всего посева [1]. Поэтому при эпифитотиях фитофтороз может приводить к потере большей части урожая, принося существенный экономический ущерб. Впервые эпидемия фитофтороза картофеля возникла в Европе в середине XIX столетия. Наиболее пострадало от нее население Ирландии, для которого картофель являлся основной сельскохозяйственной культурой. Гибель всех посевов привела к массовому голоду и миграции населения [2].

Несмотря на разработку новых фунгицидов, *P. infestans* продолжает наносить серьезный урон сельскому хозяйству и спустя полтора столетия после появления. В настоящее время мировой ущерб от потери урожая картофеля, включая расходы на защиту растений, составляют около трех миллиардов долларов ежегодно [3].

Появление в 80-х годах прошлого столетия в европейских странах и США у возбудителя фитофтороза возможности полового процесса путем спаривания антеридия и оогония, образованных разными мицелиями, привело к увеличению генетического разнообразия в популяции оомицета. Для разграничения «новых» и «старых» штаммов был введен термин «тип совместимости» (тип спаривания) – A2 и A1 соответственно. Тип совместимости выявляется при совместном культивировании изолятов *P. infestans* с тестерными штаммами с известным типом спаривания. В Беларуси выявлены оба типа совместимости *P. infestans* – A1 и A2, а также самофертильный тип A1A2, что делает возможным наличие в цикле развития патогена полового процесса и формирования ооспор, обладающих повышенной устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды [4].

Различные популяции *P. infestans* отличаются также набором генов вирулентности, обуславливающих агрессивность той или иной расы патогена. Возбудитель фитофтороза в Беларуси представлен 464 расами, включающими комбинации из 13 генов вирулентности. Большая часть этих рас не сохраняется в популяции возбудителя болезни дольше одного сезона, что указывает на сильную изменчивость вирулентности патогена [5].

Значительный уровень генетической вариабельности среди природных штаммов патогена позволяет ему успешно преодолевать защитные мероприятия и достижения селекционной работы.

Молекулярно-биологические исследования *P. infestans* начаты два десятилетия назад. Геном данного оомицета более чем на 50% состоит из повторяющихся последовательностей, часть из которых представлена ретротранспозоновыми элементами. Кроме этого, нестабильность генома *P. infestans* может быть связана с конверсией генов и митотической рекомбинацией [3, 6].

В связи с вышеизложенным, актуальной задачей является молекулярная диагностика патогена с целью мониторинга изменений, происходящих в популяции.

Методы сравнительного анализа популяции *P. infestans* включают исследование генов вирулентности, типов спаривания, изоферментных спектров двух белков – пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы. Более широк спектр методов диагностики, основанный на анализе ДНК. В настоящее время используется метод анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов с последующей гибридизацией с пробой RG 57 (RFLP-RG 57), амплификация со случайными праймерами (RAPD), анализ микросателлитных повторов (SSR), анализ полиморфизма длин амплифицированных рестрикционных фрагментов (AFLP), амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных генетических элементов, а также анализ гаплотипов митохондриальной ДНК [6, 7].

В настоящее время на кафедре молекулярной биологии биологического факультета БГУ начато исследование гаплотипов митохондриальной ДНК (мтДНК) изолятов *P. infestans*, собранных на территории Беларуси в 2003 – 2008 гг. Метод выявления гаплотипов мтДНК разработан в 1998 G.W.Griffith & D.V.Shaw [8], что стало возможным после секвенирования митохондриального генома *P. infestans*. В геноме выявлено четыре области полиморфизма (P1 – P4). Наряду со штаммами, имеющими митохондриальный геном размером 36,2 т.п.н. (обозначен как I тип), было обнаружено сравнительно небольшое количество штаммов, содержащих в мтДНК инсерцию длиной около 2 т.п.н (обозначен как II тип). Большинство таких штаммов характеризовалось A2 типом спаривания. Использование рестриктазы *MspI* позволило разбить I тип мтДНК на две вариации: преобладающую Ia и сравнительно редкую (хотя и обнаруживаемую по всему ареалу) Ib. Гаплотипы Ia/Ib наиболее часто ассоциированы с A1 типом спаривания. С помощью рестриктазы *HpaI* в составе II типа мтДНК выявлены также две вариации: IIa и IIb. IIb тип, вероятно отличается лишь точечной мутацией, он очень редок и представлен исключительно изолятами, выделенными в ряде районов Северной Америки. Для выявления двух полиморфных областей P2 и P4 были сконструированы соответствующие праймеры. Последующее расщепление амплифицированных продуктов с рестриктазами *MspI* и *EcoRI* позволяет идентифицировать все четыре возможных гаплотипа мтДНК *P. infestans* [8].

Генетический мониторинг состава популяции *P. infestans* на территории Республики Беларусь с привлечением достаточных выборок является необходимым этапом контроля распространения фитофтороза и оценки эффективности разработки и применения фунгицидных средств борьбы с заболеванием.

1. Новотельнова Н.С. Фитофторовые грибы. (Сем. *Phytophthoraceae*). -Л.: Наука, 1974.-208 с.
2. Дьяков Ю.Т. Фитофтороз - глобальные и внутрироссийские проблемы // Природа.-2002.-№1. – С. 1 – 10.
3. Kamoun S. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes // Eucariotic cell.-2003.-V.2, №2.-P.191-199.

