

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ БЕЛОРУССКИХ ИЗОЛЯТОВ
PHYTOPHTHORA INFESTANS, УСТАНОВЛЕННЫЙ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА RAPD-PCR**

Conducted investigation revealed very high level of genetic polymorphism of belarusian strains of *P. infestans*. Genetic similarity coefficients among strains varied wide-ranging from 0,071 to 0,893. Correlation between clusterization pattern and mating type as well as attachment of genetically similar strains to definite geographical territories were not detected. High level of genetic heterogeneity of belarusian pathogen strains is possibly conditioned by several mechanisms existent in their populations – recombination during sexual reproduction, strain selection during asexual generation, genotype migration.

На протяжении более полутора столетий оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary привлекает внимание сельхозпроизводителей и фитопатологов всего мира, так как вызывает самую вредоносную болезнь картофеля и томатов – фитофтороз. Ежегодные общие потери картофеля от заболевания и затраты на борьбу с ним стремительно растут и на данный момент оцениваются примерно в 3 млрд долларов [1]. Вредоносность заболевания на томатах также очень высока [2]. В благоприятных для развития болезни условиях потери урожая картофеля в Беларуси в годы эпифитотий могут превышать 50 %, причем эпифитотийное развитие болезни в последнее время наблюдается через 1–1,5 года [1, 3].

Основные меры борьбы с фитофторозом – выращивание сортов с повышенным уровнем устойчивости к патогенам и обработка вегетирующих растений фунгицидами [4]. Однако методы химической защиты имеют существенные недостатки. С экономической точки зрения они являются дорогостоящими, так как требуют больших затрат на закупку препаратов и проведения химических обработок значительных площадей, занятых под картофелем, с биологической – могут приводить к нарушению естественных биоценозов, что отражается на состоянии окружающей среды. Создание устойчивых сортов дает возможность существенно сократить применение химических обработок фунгицидами. Однако, как известно, устойчивость к фитофторозу новых сортов обычно недолговечна из-за высокой изменчивости самого возбудителя болезни [5]. Так, многочисленные исследования показали, что существует значительный уровень генетической вариабельности в природных популяциях данного патогена [6, 7]. Часто изменчивость *P. infestans* приводит к образованию более вирулентных и агрессивных форм паразита, способных преодолевать защитные реакции ранее устойчивых сортов, а также к появлению устойчивости к некоторым фунгицидам.

В связи с этим изучение микроэволюционных процессов, протекающих на уровне региональных популяций, позволяет приблизиться к пониманию закономерностей формирования новых генотипов патогена и на этой основе прогнозировать динамику его свойств, а также с учетом полученных сведений планировать систему защитных мероприятий [5].

Известно, что все оомицеты характеризуются очень сильной пластичностью и нестабильностью генома [7], *P. infestans* не является исключением [8]. Это свойство называют генетическим полиморфизмом, который обуславливает существование множества рас и генотипов с различными уровнями вирулентности и агрессивности по отношению к своим хозяевам [9].

Существует множество механизмов внутрипопуляционной изменчивости *P. infestans*. Наряду с общеизвестными, такими как мутационный процесс, половая рекомбинация, изоляция, миграции, в изменчивость патогена вносят вклад транспозоноподобные элементы, генная конверсия, митотическая рекомбинация, способность давать жизнеспособные анеуплоиды и полиплоиды [7, 10]. Все эти механизмы, присущие *P. infestans*, совместно с половым процессом эффективно работают для создания генетического разнообразия.

Для сравнительного исследования штаммов *P. infestans* используются методы, основанные на изучении фенотипических признаков: типа спаривания, спектра изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы, агрессивности, вирулентности и структуры ДНК: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), анализ микросателлитных повторов (SSR и InterSSR), амплификация со случайными праймерами (RAPD), амплификация рестрикционных фрагментов (AFLP), амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов (Inter SINE PCR), определение гаплотипов митохондриальной ДНК [10].

Одним из широко применяемых методов оценки генетической вариабельности *P. infestans* является метод RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) – амплификация со случайными праймерами [10, 11].

При помощи данного метода показана возможность выявления различных генотипов (клональных линий) *P. infestans* [12], а также филогенетических отношений сравниваемых изолятов [13]. Кроме того, RAPD-анализ позволяет проводить оценку степени генетического разнообразия изучаемой выборки штаммов [14].

Целью данной работы является молекулярная дифференциация методом RAPD-PCR природных изолятов *P. infestans*, собранных в различных регионах Республики Беларусь.

Материал и методика

Изоляты *P. infestans*, использованные в работе, выделены из листьев картофеля в 2007 г. (таблица).

Штаммы *P. infestans*, использованные в работе

Штамм	Область	Район	Населенный пункт	Дата сбора	Сорт картофеля	Тип спаривания
071/621	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Рикея	A2
071/122	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Атлант	A1
071/214	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Атлант	A1
071/534	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Криница	A1
071/549	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Криница	A1
071/748	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Скарб	A1
071/736	Брест	Пружанский	Белоусовщина	17.08.2007	Скарб	A1
075/021	Минск	Копыльский	–	2007	–	A2
075/7033	Минск	–	–	2007	–	A2
075/31	Минск	Узденский	Озеро	29.08.2007	Скарб	A2
075/92	Минск	Минский	Прилуки	25.07.2007	Одиссей	A2
075/1133	Минск	Молодечненский	–	2007	Скарб	A2
075/22	Минск	Минский	Самохваловичи	29.08.2007	Гибрид	A1
075/74	Минск	–	–	2007	–	A2
072/1121	Витебск	Верхнедвинский	Освея	15.07.2007	Дельфин	A1
072/161	Витебск	Верхнедвинский	Освея	15.07.2007	Дельфин	A2
072/1197	Витебск	Верхнедвинский	Освея	15.07.2007	Дельфин	A1
072/0185	Витебск	Верхнедвинский	Дерновичи	27.08.2007	Скарб	A1
064/011	Гродно	Гродненский	Зарица	20.08.2007	Скарб	A1
064/023	Гродно	Гродненский	Зарица	2006	Скарб	A1
073/1134	Гомель	Гомельский	Урицкое	21.08.2007	Криница	A2
073/1133	Гомель	Гомельский	Урицкое	21.08.2007	Криница	A2
073/1142	Гомель	Гомельский	Урицкое	21.08.2007	Криница	A2
073/1221	Гомель	Гомельский	Урицкое	21.08.2007	Скарб	A1
076/042	Могилев	Могилевский	Дашковка	24.08.2007	Скарб	A1

Типы спаривания определяли методом попарного срачивания исследуемых изолятов на овсяной агаризованной среде с тестерными штаммами с известными типами спаривания. Чашки инкубировали в темноте при 18 °C в течение 14 дней, после чего определяли наличие или отсутствие ооспор в месте контакта гиф между штаммами с помощью светового микроскопа. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры с тестером A2 и не образовывал с тестером A1, то его относили к типу совместимости A1, если наоборот – то к A2.

Мицелий *P. infestans* выращивали в жидкой ржаной среде (5 мл), приготовленной по методике Кейтона [15] без добавления агара.

Для выделения тотальной ДНК из *P. infestans* использовали экстрагирующий буфер следующего состава: NaCl (3 M) – 16,6 мл, Tris pH 8 (1 M) – 10 мл, SDS (20 %) – 1,25 мл, ЭДТА (0,5 M) – 10 мл, β-меркаптоэтанол – 0,7 мл, доведенный до 100 мл дистиллированной водой.

Мицелий *P. infestans*, выращенный в жидкой ржаной среде, помещали в чистую пробирку и замораживали при –20 °C, а затем быстро растирали с песком прямо в эппендорфе. К пробам добавляли 500 мкл экстрагирующего буфера, перемешивали, выдерживали 1 ч при 65 °C, добавляли 165 мкл 5 M ацетата калия, перемешивали и помещали на лед на 20 мин. Пробы центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. Супернатант переносили в чистые пробирки, добавляли 400 мкл ледяного изопропанола, перемешивали и выдерживали на льду 30 мин. Центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. Супернатант сливали. Осадок промывали в 200 мкл 70 % раствора этанола, выдерживали на льду 30 мин. Центрифугировали 10 мин при 14 тыс. об/мин. Супернатант сливали, пробирки подсушивали 30 мин при комнатной температуре, осадок ДНК ресуспензировали в 100 мкл ТЕ буфера.

В работе было использовано 4 декамерных праймера со следующей нуклеотидной последовательностью: C4 – CCGCATCTAC, C5 – GATGACCGCC, C15 – GACGGATCAG и C16 – CACACTCCAG.

Полимеразную цепную реакцию проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей: 10 mM Tris – HCl (pH – 8,3); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,001 % gelatin; 1 ед. Taq полимеразы; 0,2 mM праймера (C4, C5, C15, C16); 0,2 mM dNTP; 1 мкл матричной ДНК. Параметры амплификации: 1 цикл 94 °C – 1 мин; 40 циклов 94 °C – 30 с, 36 °C – 30 с, 72 °C – 1,3 мин; 1 цикл 72 °C – 5 мин. Амплификацию осуществляли на приборе фирмы Px2 Thermo Hybaid.

Электрофорез молекулярной ДНК проводили в 1,5 % агарозном геле с использованием буфера TAE при 20 °C и 100 В. Для окраски ДНК использовали бромистый этидий. Результаты электрофореза документировали с помощью прибора фирмы Amersham.

Результаты и их обсуждение

При анализе штаммов на принадлежность к типу спаривания соотношение A1 к A2 составило 56 : 44 %, что близко к соотношению 50 : 50 %, при котором наиболее высока вероятность половой рекомбинации в природных условиях.

Для молекулярной дифференциации имеющихся штаммов выбранный метод RAPD-PCR имеет чувствительность, отвечающую требованиям исследований, касающихся изменчивости внутри вида *P. infestans*. При его помощи была осуществлена амплификация тотальной ДНК 25 штаммов *P. infestans* с 4 декамерными праймерами C4, C5, C15 и C16. Электрофореграммы продуктов амплификации, полученные при использовании праймера C5, приведены на рис. 1.

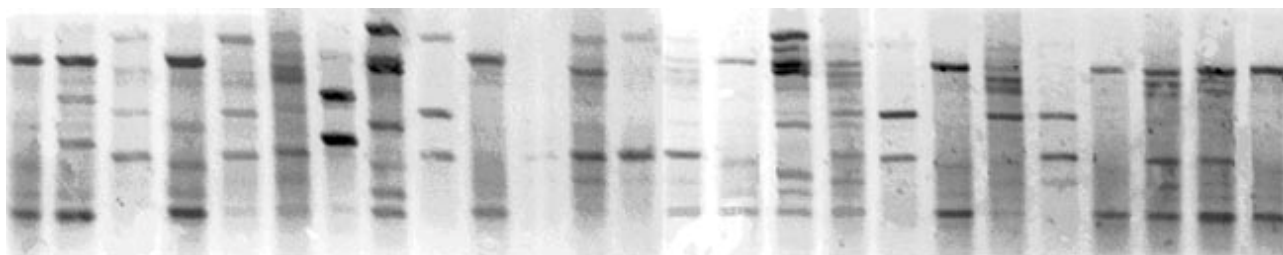


Рис. 1. RAPD-профиль штаммов *P. infestans*, полученный с праймером C5. Слева направо: 071/621, 071/122, 071/214, 071/534, 071/549, 071/748, 071/736, 075/021, 075/7033, 075/31, 075/92, 075/1133, 075/22, 075/74, 072/1121, 072/161, 072/1197, 072/0185, 064/011, 064/023, 073/1134, 073/1133, 073/1142, 073/1221, 076/042

На основании полученных данных построили бинарную матрицу, принимая наличие конкретного фрагмента ДНК за 1, а его отсутствие за 0. На ее основе были рассчитаны коэффициенты генетического сходства по методу [16]. Кроме того, при помощи метода кластерного анализа UPGMA [16] построена дендрограмма, отражающая филогенетические отношения между штаммами. Для расчетов коэффициентов генетического сходства использовали компьютерную программу Phyltools; для построения дендрограмм – программу PAST [18]. Все дендрограммы обладали сходной топологией, но наиболее устойчивой оказалась дендрограмма, составленная на основе анализа суммарной матрицы по всем профилям амплификации (рис. 2).

Проведенные исследования выявили очень высокую степень генетического полиморфизма белорусских штаммов *P. infestans*. Так, коэффициенты генетического сходства между штаммами варьировали в широких пределах значений – от 0,071 до 0,893. В результате амплификации ДНК 25 штаммов *P. infestans* с 4 RAPD-праймерами было получено 44 фрагмента, из которых 43 оказались полиморфными. Уровень полиморфизма для всех образцов составлял от 90 (1 праймер) до 100 % (3 праймера).

В результате проведенных исследований не было выявлено достоверной корреляции между паттерном кластеризации штаммов и типом их половой совместимости. Из рис. 2 видно, что в различных кластерах дендрограммы представлены штаммы обоих типов спаривания. Такие результаты анализа произвольной выборки штаммов и установленное соотношение типов спаривания косвенно указывают на то, что на территории Беларуси в популяциях *P. infestans* наряду с бесполом размножением может иметь место половая рекомбинация, что согласуется с данными генотипического анализа популяций патогена из Московской области, проведенного Ю.Т. Дьяковым и соавторами в 1999–2007 гг. [10]. Напротив, RAPD-анализ изолятов, собранных на территории Северной Ирландии, выявил относительно небольшое разнообразие. Такой результат объясняется тем, что североирландские изоляты занимают небольшую территорию и относительно изолированы от штаммов Великобритании и европейского материка [14]. В то же время данные AFLP- и RAPD-анализа изолятов, собранных в долине Толука (Мексика), являющейся центром происхождения патогена, демонстрируют огромное генетическое разнообразие [19].

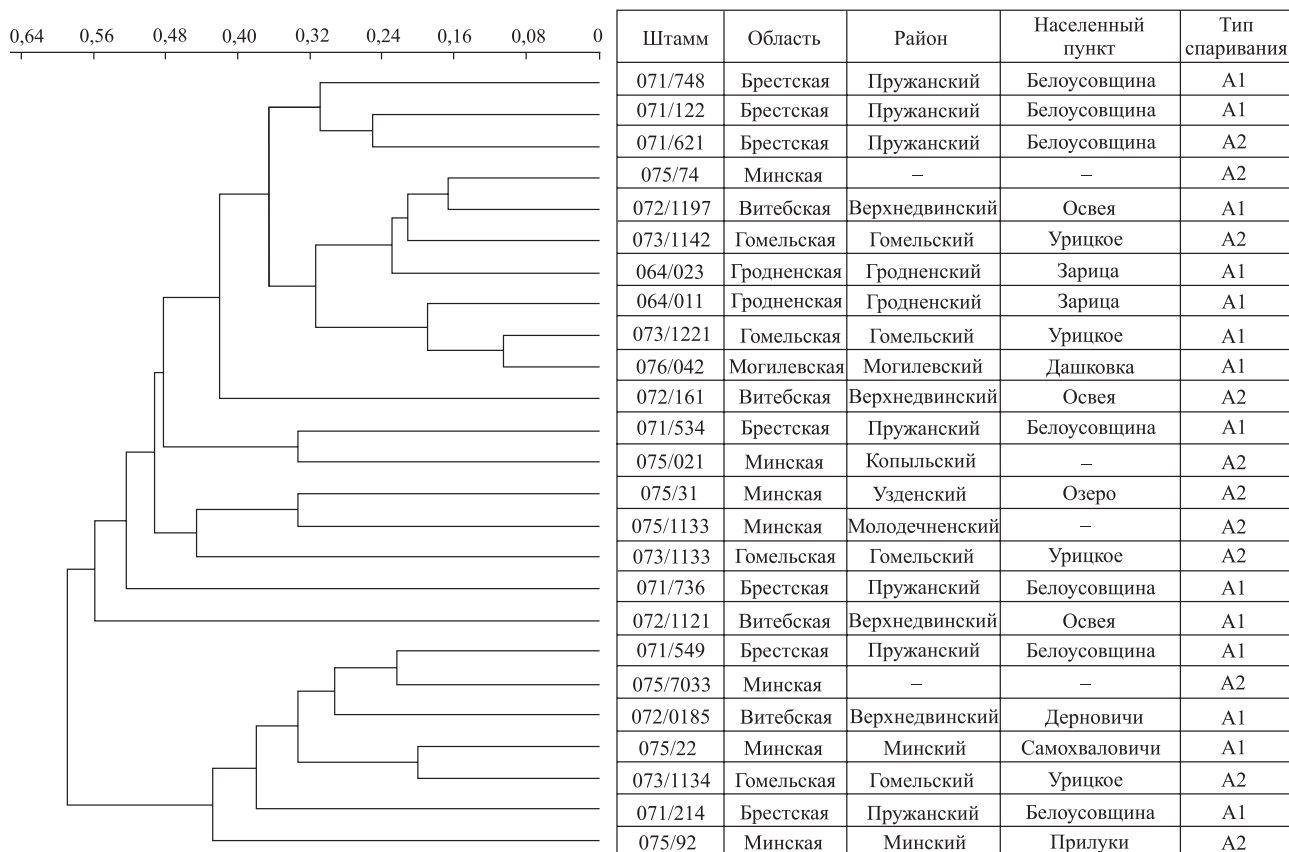


Рис. 2. UPGMA-дендрограмма филогенетических отношений между белорусскими штаммами *P. infestans*

Нами не было установлено приуроченности генетически сходных штаммов к определенным географическим территориям. Так, не выявлено четкой кластеризации штаммов в соответствии с местом их изоляции. Формы, выделенные с одного поля, часто оказывались генетически удаленными друг от друга и на дендрограмме были разнесены по далеко отстоящим кластерам. Напротив, некоторые изоляты одного типа спаривания, выделенные из разных мест, оказались генетически сходными: 076/042 (Могилевская обл.) и 073/1221 (Гомельская обл.) – на 89 %; 075/74 (Минская обл.) и 072/1197 (Витебская обл.) – на 82 % (см. рис. 2). Это может указывать на селекцию наиболее приспособленных к определенным условиям генотипов (клонов). Тем не менее некоторые штаммы, выделенные из одной точки, характеризовались близким положением на дендрограмме, например изоляты 071/748, 071/122, 071/621, собранные на одном поле (окрестности д. Белоусовщина Брестской области), что указывает на их вероятное клональное происхождение либо происхождение от рекомбинации общих родительских штаммов.

При анализе отдельных RAPD-маркеров показано, что присутствие некоторых из них в RAPD-профиле изолята может коррелировать с принадлежностью к определенному месту выделения. Так, в RAPD-профиле, полученном с праймером C5, один из фрагментов был представлен только среди брестских изолятов.

Высокая степень генетической гетерогенности белорусских штаммов *P. infestans* может быть обусловлена несколькими механизмами, одновременно происходящими в популяциях патогена, – половой рекомбинацией, селекцией штаммов в бесполой генерации, миграцией клонов вследствие перевозок семенного материала, зараженного *P. infestans*, по территории республики.

Возможной исходной причиной высокой генетической вариативности является миграция в 1980–1990 гг. на территорию Беларуси штаммов *P. infestans* типа спаривания A2 и, как следствие, появление полового процесса, вносящего вклад в генетическое разнообразие. Вероятно, вредоносность фитофтороза в Беларуси, существенно возросшая в конце прошлого столетия, связана именно с появлением этого способа размножения.

Мы предполагаем, что полученные данные могут быть полезными при изучении генетического разнообразия и миграции клональных линий *P. infestans*.

1. Пляхневич М.П. // Весці НАН Беларусі. 2006. № 5. С. 138.
2. Псарева В.В. Фитопатологические основы оценки и отбора томатов при селекции на фитофтороустойчивость: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Мн., 1979.
3. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Мн., 2005.
4. Пляхневич М.П., Еланский С.Н. <http://kartofel.org/download/elansky2008.pdf>
5. Кравцов А.С. Некоторые особенности структуры популяции *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary на Европейской территории Российской Федерации: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2003.
6. Samen F.M. Abu-El, Secor G.A., Gudmestad N.C. // Plant pathology. 2003. Vol. 52. № 3. P. 314.
7. Kamoun S. // Eukaryotic Cell. 2003. Vol. 2. № 3. P. 191.
8. Lee T., Testa A., Robold A. et al. // Genetics. 2004. Vol. 167. № 4. P. 1643.
9. Samen F.M. Abu-El, Secor G.A., Gudmestad N.C. // Phytopathology. 2003. Vol. 93. № 3. P. 293.
10. Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н. // Микология сегодня. 2007. № 1. С. 107.
11. Daayf F., Bud Platt H.W., Mahuku G., Peters R.D. // American journal of potato research. 2001. Vol. 78. № 2. P. 129.
12. Akino S., Shirasawa Y., Kondo N., Naito S. // Journal of general plant pathology. 2008. Vol. 74. № 2. P. 125.
13. Ochwo M.K.N., Kamoun S., Adipala E. et al. // Journal of phytopathology. 2002. Vol. 150. P. 541.
14. Carlisle D.J., Cooke L.R., Brown A.E. // European journal of plant pathology. 2001. Vol. 107. № 3. P. 291.
15. Caten C.E., Jinks J.L. // Can. J. Bot. 1968. Vol. 46. P. 329.
16. Nei M., Li W.H. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1979. Vol. 76. № 10. P. 5269.
17. Fitch W.M., Margoliash E. // Science. 1967. Vol. 155. P. 279.
18. Hammer O., Harper D., Ryan P.D. // Paleontologia electronica. 2001. Vol. 4. № 1. P. 1.
19. Flier W.G., Grunwald N.J., Kroon L.P.N.M. et al. // Phytopathology. 2003. Vol. 93. № 4. P. 382.

Поступила в редакцию 05.05.10.

Виктор Николаевич Викторovich – аспирант кафедры молекулярной биологии. Научный руководитель – А.Н. Евтушенков.

Михаил Петрович Пляхневич – младший научный сотрудник Научно-практического центра НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.

Олег Владимирович Софьин – младший научный сотрудник Научно-практического центра НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству.

Александр Леонидович Лагоненко – кандидат биологических наук, доцент кафедры молекулярной биологии.

Анатолий Николаевич Евтушенков – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой молекулярной биологии.