

ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БЕЛОРУССКИХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА КАРТОФЕЛЯ

М.П. Пляхневич¹, С.Н. Еланский²

1 – Научно-практический центр НАН Беларуси по картофелеводству и плодовоовощеводству, Самохваловичи, Минская область;

2 – Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва.

Введение

Фитофтороз – одна из наиболее экономически значимых болезней картофеля в Беларуси и в России. Средние потери урожая картофеля от фитофтороза в Беларуси за счет преждевременного отмирания ботвы и сгнивания пораженных клубней в период хранения составляют 30%, а в эпифитотийные годы могут превышать 50% (Иванюк и др., 2005). Основные меры борьбы с этим заболеванием — выращивание сортов с повышенным уровнем устойчивости к фитофторозу и обработки вегетирующих растений фунгицидами. Для успешной борьбы с заболеванием необходимо учитывать свойства штаммов возбудителя, генотипическую структуру его популяций и прогнозировать возможные изменения этих параметров в ближайшем будущем. Изучению генотипических особенностей штаммов возбудителя фитофтороза (*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary) из разных областей Беларуси и посвящена предлагаемая работа.

Материалы и методы.

В работе использованы 64 изолята *P. infestans*, собранные в августе 2006 и 2007 гг. в личных подсобных хозяйствах и на производственных посадках картофеля в шести областях республики (Брестская, Витебская, Гомельская, Гродненская, Минская, Могилёвская). Количество выделенных из каждой области изолятов приведено в таблице 2.

Определение типов спаривания проводили методом попарного сращивания 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 А2 и не образовывал их с тестером А1, то его относили к типу совместимости А1, если наоборот – то к А2.

Для исследования спектров изоферментов мицелий наращивали в чашках Петри с жидкой гороховой средой. Засеянные чашки инкубировали 10-14 дней при 18°C в темноте до тех пор, пока в них не нарастало достаточное количество мицелия. Спектр изоферментов определяли на целлюлозоацетатных гелях согласно рекомендации производителя Helena Laboratories Inc. (Hebert, Beaton, 1993) с небольшими модификациями (Elansky, Smirnov, 2003). В исследовании учитывали генотипы изолятов по двум локусам: Pcp1 и Pcp2.

Для выделения ДНК мицелий, выращенный в чашках с жидкой гороховой средой, растирали в жидком азоте, после чего лизировали в СТАВ-буфере. Очистку от белков проводили с использованием хлороформа. Хранили выделенную ДНК в деионизованной воде при –20°C. Микросателлитный анализ с праймерами Pi4GR и Pi4GF проводили, как описано в работе Кпарова, Gisi (2002). Визуализацию

результатов ПЦР-анализа проводили на агарозных гелях с добавлением бромистого этидия.

Для оценки генотипического разнообразия штаммов использовали нормализованный коэффициент Шеннона: $H_s = -\sum g_i * \ln(g_i) / \ln N$, где g_i – частота i -го генотипа, а N – объём выборки (Śliwka et al., 2006). Для оценки генетического разнообразия штаммов использовали коэффициент D_I : $D_I = 1 - \sum p_{lu}^2$, где p_{lu} – частота аллеля u в локусе l (Elansky, Smirnov, 2003).

Результаты и обсуждение.

Тип спаривания. Сравнительный анализ штаммов возбудителя фитофтороза картофеля, собранных в различных регионах Беларуси, показал, что соотношение изолятов А1 и А2 типа спаривания составляет, соответственно, 57,8% и 42,2% (рис. 1). Штаммы с разными типами совместимости были найдены во всех областях республики, как в производственных посадках картофеля, так и в личных подсобных хозяйствах. Ещё в 1989-1992 гг. А2 не имел широкого распространения на территории Беларуси, однако, начиная с 1993 года отмечено резкое увеличение его количества. Так, в 1993-2000 гг. его доля составляла 12,2-65,4%, в среднем 34,6% (Иванюк, Журомский, 2002). Полученные нами данные показывают, что доля А2 продолжает оставаться высокой и в современных популяциях патогена. Эти результаты сопоставимы с данными из других регионов мира. Так, в Польше доля А2 составляет 39%, в Финляндии – 15%, в Норвегии – 25%, в долине Толука (Мексика) – 50%, а в некоторых регионах России (Хабаровский край, Еврейская АО) – до 100% (Śliwka et al., 2006). В европейской части России доля А2 за период с 1993 по 1998 гг. возросла с 0 до 50%, соотношение А1:А2 примерно на уровне 1:1 установилось в 1998-2000 гг. (Кравцов, 2003). Соотношение типов спаривания белорусских штаммов *P. infestans* также близко к 1:1. В этой ситуации существенный вклад в изменчивость патогена может вносить половая рекомбинация (Дьяков, Еланский, 2007).

Спектр изоферментов пептидазы. В исследованных штаммах локус Per 1 представлен генотипами 100/100, 92/100 и 92/92, а локус Per 2 – 100/100, 100/112 и 112/112. Предыдущие исследования (Elansky, Smirnov, 2003) показали, что генетическое разнообразие локуса Per 2 выше, чем у Per 1, в связи с чем спектр Per 2 представляется более информативным маркерным признаком.

По Per 1 в Беларуси наиболее часто встречался генотип 100/100 (82,8%) (рис 1). Доля 92/100 составила 15,6%. Примечательно, что среди проанализированных штаммов была обнаружена гомозигота 92/92, чрезвычайно редко встречающаяся в России (менее 0,1%) (Дьяков, Еланский, 2007). Для установления частоты встречаемости 92/92 в белорусских популяциях *P. infestans* необходимы дополнительные исследования с большей выборкой штаммов. По Per 2 соотношение генотипов оказалось более выровненным: 100/100 – 57,8%, 100/112 – 28,1%, 112/112 – 14,1% (рис 1). Индекс разнообразия Шеннона (H_s), рассчитанный для локусов Per 1 и Per 2, составил, соответственно, 0,12 и 0,23, что также указывает на большую генетическую разнородность Per 2 по сравнению с Per 1. Индекс генетического разнообразия (D_I) для Per 1 и Per 2 составил 0,17 и 0,40, а в среднем для двух локусов – 0,29. Это выше, чем D_I по двум Per-локусам, подсчитанный для белорусских штаммов сбора 1999 г (0,18 для Per 1, 0,16 для Per 2 и 0,17 - средний для двух локусов), но ниже D_I для штаммов сбора 2000 г (0,09 для Per 1, 0,5 для Per 2 и 0,3 - средний для двух локусов) (Elansky, Smirnov, 2003).

Анализ микросателлитных повторов. SSR-анализ выборки белорусских штаммов *P. infestans* выявил высокую степень полиморфизма по локусу Pi4G. После электрофоретического разделения продуктов амплификации исследованных образцов выявлялись несколько фрагментов различной длины. Для анализа в настоящей работе были выбраны 2 фрагмента, четко видимые и легко идентифицируемые при анализе ПЦР-фрагментов всех исследуемых изолятов. Первый фрагмент длиной около 160 пн был обозначен как L, а второй (около 295 пн) – как H. Среди исследованных штаммов были выявлены как несущие оба фрагмента (генотип LH), так и один из фрагментов (генотипы L и H). Генотип L был характерен для 28,1% проанализированных штаммов, H – для 32,8%, LH – для 39,1% (рис 1). Индекс Шеннона (H_s) для полученных фенотипов составил 0,26, а индекс генетического разнообразия (D_I) – 0,50. Таким образом, SSR-анализ с учетом двух ПЦР-продуктов показал наибольшее генетическое разнообразие по сравнению с Per 1 и Per 2.

Генотипический анализ. Анализ взаимного влияния изучаемых маркеров (тип спаривания, Per 1, Per 2 и Pi4G-SSR) методом χ^2 не выявил взаимосвязи между этими признаками ($p > 0,05$). Независимость типа спаривания и SSR была также показана в работе Кпарова, Gisi (2002). Независимость исследуемых маркерных признаков позволила провести генотипический анализ изучаемых изолятов. Для удобства работы генотипы были закодированы согласно таблице 1.

Проведенное исследование выявило высокое генотипическое разнообразие во всех областях Беларуси (таблица 2), за исключением Могилёвской, где отсутствие разнообразия определяется, видимо, малым объёмом выборки. Особенно следует отметить высокое разнообразие в Витебской области: среди 10 исследованных изолятов, из которых 9 были собраны одновременно на одном поле, были выявлены 8 генотипов. Это согласуется с исследованиями, проведенными в Московской области, где почти все штаммы имели уникальные генотипы (среди 23 исследованных штаммов был выявлен 21 генотип) (Elansky et al., 2001). Высокое разнообразие отмечено и в Минской области (10 генотипов среди 20 изолятов). Столь высокое генотипическое разнообразие может объясняться разными причинами, среди которых могут иметь место интенсивный обмен семенным материалом, хорошие условия для миграции спорангиев в атмосфере, гибридизация при образовании ооспор. Высокое разнообразие в белорусской популяции возбудителя фитофтороза может иметь прямое влияние и на структуру российских популяций, т.к. на европейской территории РФ преобладают западные ветра. Кроме того, белорусский картофель массово ввозится в Россию и используется на семенные цели. Исследование выполнено при поддержке грантов РФФИ (проект 07-04-90900-моб_снг_ст) и МНТЦ (проект 3440).

Список цитированной литературы.

Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н. Популяционная генетика *Phytophthora infestans*. В кн.: Микология сегодня. Т. 1. Под ред. Дьякова Ю.Т., Сергеева Ю.В. М.: Национальная академия микологии, 2007, с. 107-139.

Иванюк В.Г., Журомский Г.К., Авдей О.В. Микроэволюция *Phytophthora infestans* в условиях Белоруссии. // Микология и фитопатология, 2002, т.36, с. 81-90.

Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. – Минск, Белпринт, 2005, 696с.

Кравцов А.С. Некоторые особенности структуры популяции *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary на Европейской территории Российской Федерации. Автореф. дисс. на соиск. уч. ст. канд. биол. наук, М., 2003, 23с.

Elansky S. N., Smirnov A. N. Second locus of Peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* //Botanica Lithuanica, 2003, 9(3), 275-283.

Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovsky B., Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. Genotypic analysis of Russian *Phytophthora infestans* isolates from the Moscow region, Siberia and Far East. // J. Phytopathol. 2001. V. 149. P. 605-611.

Hebert P. D. N., Beaton M. J. Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis. A practical handbook // Guelph, Ontario, An educational service of Helena laboratories. 1993.

Кнапова Г., Гиси У. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* populations on potato and tomato in France and Switzerland. // Plant Pathology, 2002, vol. 51, p.641-653.

Śliwka J, Sobkowiak S, Lebecka R, Avendaño-Córcoles J, Zimnoch-Guzowska E. Mating type, virulence, aggressiveness and metalaxyl resistance of isolates of *Phytophthora infestans* in Poland. // Potato Research, 2006, vol.49, p.155-166.

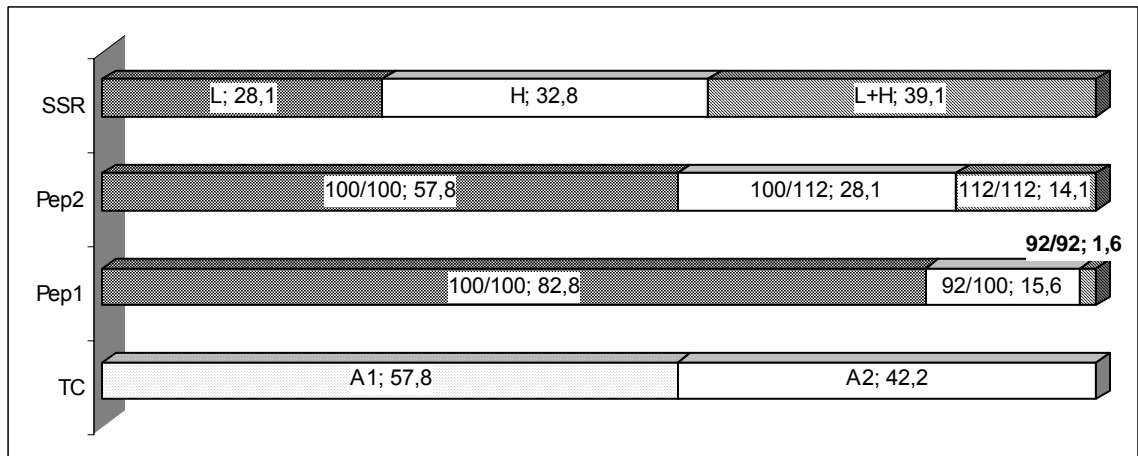


Рис. 1. Генетический анализ выборки штаммов *P. infestans* из Беларуси по четырём маркерным признакам (тип спаривания (TC), спектр изоферментов пептидазы (Pep 1 и Pep 2), микросателлитные повторы(SSR) (в %)

Таблица 1.

Использованные в работе кодировки генотипов исследуемых изолятов.

Кодировка генотипа	Исследуемые признаки			
	Тип спаривания	Рер 1	Рер 2	Pi4G-SSR
10000001	A1	100/100	100/100	L
10000010	A1	100/100	100/100	H
10000011	A1	100/100	100/100	LH
10000110	A1	100/100	100/112	H
10000111	A1	100/100	100/112	LH
10001110	A1	100/100	112/112	H
10100101	A1	92/100	100/112	L
10101111	A1	92/100	112/112	LH
01000010	A2	100/100	100/100	H
01000011	A2	100/100	100/100	LH
01000101	A2	100/100	100/112	L
01000110	A2	100/100	100/112	H
01001101	A2	100/100	112/112	L
01001111	A2	100/100	112/112	LH
01100001	A2	92/100	100/100	L
01100010	A2	92/100	100/100	H
01100011	A2	92/100	100/100	LH
01100110	A2	92/100	100/112	H
01111101	A2	92/92	112/112	L

Таблица 2.
Генотипы штаммов, выделенных в разных областях республики Беларусь.

Генотип	Всего штаммов с генотипом	Области					
		Брестская	Витебская	Гомельская	Гродненская	Минская	Могилёвская
10000001	6	3	1	0	2	0	0
10000010	12	9	1	0	2	0	0
10000011	6	1	0	0	2	3	0
10000110	2	0	1	0	0	1	0
10000111	5	0	2	0	0	0	3
10001110	2	0	0	0	0	2	0
10100101	2	0	0	2	0	0	0
10101111	2	0	2	0	0	0	0
01000010	2	0	0	1	0	1	0
01000011	6	1	0	1	0	4	0
01000101	5	1	1	0	2	1	0
01000110	3	0	0	0	0	3	0
01001101	2	0	0	0	0	2	0
01001111	2	0	0	0	0	2	0
01100001	1	0	1	0	0	0	0
01100010	1	0	1	0	0	0	0
01100011	3	0	0	3	0	0	0
01100110	1	0	0	0	0	1	0
01111101	1	0	0	1	0	0	0
Всего штаммов проанализировано	64	15	10	8	8	20	3
Всего генотипов выявлено	19	5	8	5	4	10	1