

На правах рукописи

Милютина Дарья Игоревна

**ГЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ ПОПУЛЯЦИЙ
И УСТОЙЧИВОСТЬ К НЕКОТОРЫМ ФУНГИЦИДАМ
ШТАММОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT) de BARY ИЗ
РЕСПУБЛИКИ МАРИЙ-ЭЛ И МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

Специальность 03.00.24 – Микология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2008

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии Биологического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова в 2004-2008 годах.

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Еланский Сергей Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ткаченко Олег Борисович

кандидат биологических наук
Зейрук Владимир Николаевич

Ведущая организация: ГНУ Всероссийский научно
исследовательский институт
овощеводства РАСХН, г. Москва

Защита диссертации состоится «__» _____ 2008 г.

в _____ на заседании Диссертационного совета Д.053.05.65
Биологического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова по адресу: 119899
Москва Воробьевы горы, МГУ, Биологический факультет, аудитория М 1.
Факс (495) 939-39-70

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета
МГУ им. М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного

совета, к.б.н.



М. А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) deBary — возбудитель фитофтороза картофеля и томата — уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившись в Европе в середине XIX столетия, он вызвал эпифитотию картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений. Но и по прошествии 150 лет проблема фитофтороза во всем мире далека от разрешения. Чтобы меры борьбы оставались эффективными, необходимо всестороннее изучение возбудителя фитофтороза, эпидемиологии заболевания, проведение постоянного мониторинга изменений, происходящих в его популяциях.

На территории России фитофтороз встречается практически во всех регионах, занимающихся производством картофеля и томата. Причем структура популяций возбудителя фитофтороза в них различается. Популяции, распространенные на территории сибирской и дальневосточной частей России, состоят из ограниченного числа клонов, генетические обмены между которыми крайне редки. Популяции европейской части России отличаются очень высоким генотипическим разнообразием: практически каждый штамм имеет свой уникальный генотип. Популяции *P. infestans* исследованы на территории Центрального, Северо-Кавказского, Северо-Западного и некоторых других регионов европейской части России, в то же время практически нет данных о структуре популяций в среднем и нижнем Поволжье.

Цель и задачи. Целью предлагаемой работы было исследование генотипической структуры популяций и устойчивости к фунгицидам штаммов *P. infestans* из республики Марий Эл в сравнении с Московской областью и другими регионами России. Для выполнения поставленной цели были сформулированы следующие задачи исследований:

1. Выделение изолятов в чистую культуру. Создание коллекции штаммов.

2. Тестирование независимых маркерных признаков: тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, гаплотип митохондриальной ДНК (далее мтДНК), структура микросателлитных повторов.

3. Изучение устойчивости штаммов к фунгицидам металаксил и манкоцеб.

4. Исследование возможности присутствия генетически различных митохондрий в мицелии одного штамма (гетероплазмоз) и их распространения в природных популяциях *P. infestan*.

5. Сравнение структуры популяций в республике Марий Эл и в других регионах России.

Научная новизна. Впервые подробно описаны популяции из Республики Марий Эл, определена генотипическая структура, проведен сравнительный анализ с популяциями из других картофелеводческих регионов России и сопредельных государств. Подобран удобный минимальный набор маркерных признаков для оценки генотипического разнообразия популяций. Проведено генотипирование большой выборки популяций с помощью предложенного тест-набора (тип спаривания и два локуса пептидазы). Впервые сделано предположение и доказано экспериментально присутствие в мицелии одного штамма генетически различающихся митохондрий, получены данные о распространении гетероплазмонов среди российских популяций *P. infestans*.

Практическая значимость. Информация об изменениях в популяциях *P. infestans* и знание внешних факторов, влияющих на внутри- и межпопуляционные перестройки, могут внести существенный вклад в лучшее понимание эпидемиологии фитофтороза и, тем самым, сократить потери урожая. Мониторинг генотипической структуры важен для понимания генетических изменений в популяциях патогена, что может привести к переоценке стратегий контроля развития болезни.

Апробация работы. Основные результаты исследования были представлены на конференции молодых ученых «Ломоносов-2005» (Москва,

2005), на международной конференции «Грибы и водоросли в биоценозах – 2006» (Москва, 2006), на Международном конгрессе «Картофель. Россия. 2007» (Москва, 2007), на 15 конгрессе Европейских микологов (Санкт-Петербург, 2007), на 2 съезде микологов России (Москва, 2008), а также на заседании кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ (Москва, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на ___ страницах, состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», выводов, списка литературы, включающего ___ источника, и приложения. Работа содержит ___ рисунков и ___ таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы. В этой главе содержатся сведения о биологических особенностях и вредоносности возбудителя фитофтороза, мерах борьбы с заболеванием, о фунгицидных препаратах, приведен обзор работ по изучению генотипической структуры популяций и анализу маркеров, применяемых для популяционных исследований *P. infestans*.

2. Материалы и методы.

Сбор пораженных фитофторозом образцов проводился в 2004-2007 годах в Москве, московской области и республике Марий Эл. С одного растения брали не более одного образца, по возможности на поле выбирали растения, отстоящие друг от друга не менее, чем на 10 м.

Выделение изолятов *P. infestans* производилось в лабораторных условиях из пораженных фитофторозом органов растений (листьев, плодов, стеблей, клубней) с использованием метода влажных камер.

Определение типов спаривания проводили методом попарного сращивания исследуемого изолята с тестерными штаммами с известными типами спаривания (A1 либо A2) на агаризованной овсяной среде.

Спектр изоферментов определяли на целлюлозоацетатных гелях согласно рекомендации производителя Helena Laboratories inc. (Hebert, Beaton, (1993) с небольшими модификациями (Elansky, Smirnov 2003)

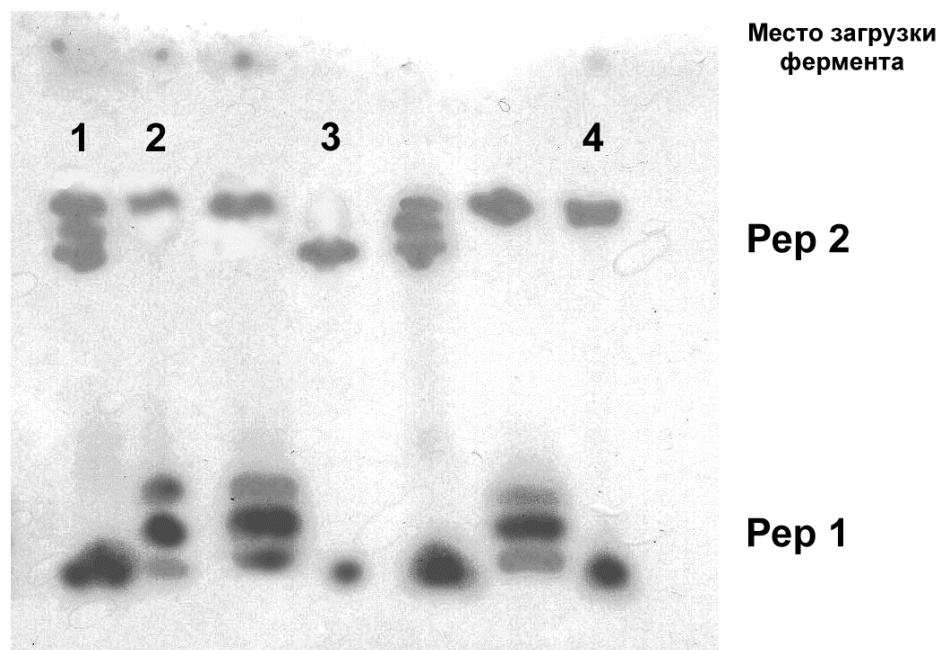


Рис. 1. Спектр изоферментов пептидазы после электрофоретического разделения. Генотипы для Pep1*Pep2: 1 – 100/100*100/112; 2 – 92/100*100/100; 3 – 100/100*112/112; 4 – 100/100*100/100.

Гаплотипы митохондриальной ДНК идентифицировали согласно методике разработанной Griffith и Shaw (1998). Для выявления гетероплазмонов амплифицировали генную вставку размером 709 пн, характерную для 2 типа мтДНК в штаммах, определенных по традиционному тесту PCR-RFLP как имеющие 1 тип МтДНК. Для амплификации вставки использовали праймеры VSF_{or}: 5' GCAGCCCAAATATCTCGAAA 3' и VSRev: 5' GCAATGGCGCATCAATTATT 3'. Продукты амплификации разделяли в 0,8% агарозном геле, продукты рестрикции - в 1,5%, приготовленном на трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия.

Анализ микросателлитных повторов (SSR) проводили с помощью двух групп праймеров на локусы Pi4B и Pi4G соответственно:

F: 5' - AAAATAAAGCSTTTGGTTCA и R: 5' - GCAAGCGAGGTTTGTAGATT

F: 5' - CGCTGTGTGGATGACAAGTA и R: 5' - TCGACCTGACATACGAGCTA

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).

Определение устойчивости к металаксилу проводили на овсяной агаризованной среде с добавлением фунгицида. Чувствительность изолятов оценивалась по скорости радиального роста колонии на среде с фунгицидом и без него. Изолят считался чувствительным (S), если относительная скорость роста его колонии на среде с фунгицидом (при концентрации действующего вещества 10 мкг/мл) в сравнении со средой без фунгицида была менее 0,1; слабоустойчивым (SR) — при относительной скорости роста от 0,1 до 0,4; и устойчивым (R) – более 0,4, причем устойчивые штаммы должны были расти на среде с концентрацией действующего вещества 100 мкг/мл. Тест проводился в трех повторностях для каждого изолята. Для изучения устойчивости к **манкоцебу** тест проводили также на овсяной агаризованной среде с добавлением фунгицида в концентрациях 1, 10 и 50 мкг/мл. На основании полученных данных по относительной скорости роста вычисляли показатель EC_{50} — концентрацию фунгицида, ингибирующую рост анализируемого изолята на 50%. При исследовании штаммов из Марий Эл показатель EC_{50} вычисляли также и для металаксила.

Для **получения монозооспоровых потомков** молодой мицелий наращивали в чашках Петри, затем делали смывы, которые помещали на 2-4 часа в холодильник для стимуляции выхода зооспор из зооспорангиев. Суспензию зооспор высевали на голодный агар в чашки Петри или на жидкую сильноразбавленную среду в колбу, инкубировали в течении 1-3 дней.

Проросшие зооспоры отбирали (просматривая в поле микроскопа или бинокля) при помощи стерильной иглы и высаживали на чашки Петри с овсяным агаром.

Статистическую обработку данных проводили при помощи электронных пакетов программ Excel, RCEXACT, STATISTICA. Для выявления статистически достоверных отличий признаков вычисляли коэффициент ранговой корреляции Спирмена, для выявления гетерогенности маркерных признаков в популяциях вычисляли χ^2 . Поиск гомологий полиморфных регионов ДНК проводили на основании данных Genbank и программы BLAST.

Кодировка генотипов проводилась в двоичной системе с учетом порядка следования признаков.

1 знак – тип спаривания: 0-A1, 1-A2.

2 и 3 знаки – генотипы локуса пептидазы Pep1: 00 – 100/100, 10 – 92/100.

4 и 5 знаки - генотипы локуса пептидазы Pep2: 00 – 100/100, 01 – 100/112, 11 – 112/112.

6 и 7 знаки – генотипы SSR: 10 – L, 01 – H, 11 – LH.

8 знак – гаплотип митохондриальной ДНК. 0 – 1a, 1 – 2a.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика маркерных признаков штаммов *P. infestans*

Тип спаривания. За период с 2003 по 2007 годы тип спаривания был изучен у 919 изолятов, собранных с плодов и листьев томата и листьев и клубней картофеля в Московской области (791 изолят) и в республике Марий Эл (128). Штаммы с разными типами спаривания были найдены практически во всех обследованных популяциях. Изоляты группы A1A2 были выявлены только в 2003 году в 5 разных полевых популяциях. Наибольшее их число обнаружено среди штаммов, выделенных на поле ВНИИ фитопатологии в Голицыно (таблица 1). В нескольких случаях отмечены разные соотношения

типов спаривания штаммов, выделенных с разных органов растений или с разных растений на одной и той же делянке. Так, среди штаммов, выделенных из листьев картофеля на поле ВНИИФ, преобладали изоляты с типом спаривания А2, в то время как среди выделенных из клубней на этом же поле преобладал А1 (строки 4 и 5). Существенная разница долей типов спаривания среди штаммов, выделенных с картофеля и томата на одной делянке, отмечена в Воскресенском районе (строки 2 и 3), в Одинцовском районе (строки 7 и 8, 18 и 19). В 2004 году на делянке в Москве были выявлены различия в распределении типов спаривания среди изолятов, выделенных с картофеля разных сортов на одной делянке (строки 9 и 10). Выявленные закономерности свидетельствуют в пользу селекции генотипов при заражении разных растений - хозяев и даже разных органов и разных сортов одних и тех же растений.

Таблица 1.

Доли штаммов с разными типами спаривания в полевых популяциях

Популяция	Растение орган	Количество проанализированных изолятов	Доля штаммов с ТС (%):		
			А1А2	А1	А2
2003					
1. Одинцовский р-н, ВНИИССОК	ТЛ*	30	3	40	57
2. Воскресенский р-н	ТП	29	0	0	100
3. Воскресенский р-н	КЛ	12	0	100	0
4. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КЛ	51	12	6	82
5. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КК	7	0	86	14
6. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	ЛХЛ	31	3	97	0
7. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	87	1	75	24
8. Одинцовский р-н, ЗБС	ТЛ	36	2	90	8
2004					
9. Москва, Ботсад МГУ, сорт Санте	КЛ	58	0	50	50
10. Москва, Ботсад МГУ, сорт Луговской	КЛ	31	0	7	93
11. Одинцовский р-н, ЗБС, сорт	КЛ	27	0	19	81

Санте					
12. Одинцовский р-н, ЗБС, сорт Луговской	КЛ	39	0	49	51
13. Одинцовский р-н, ВНИИССОК	КЛ	25	0	68	32
14. Одинцовский р-н, Троицкое	КЛ	32	0	34	66
15. Шаховской р-н, Лобаново	КЛ	24	0	33	67
16. Одинцовский р-н, Волково	ТЛ	8	0	25	75
17. Одинцовский р-н, Волково	КЛ	16	0	19	81
18. Одинцовский р-н, Голицино	ТП	13	0	85	15
19. Одинцовский р-н, Голицино	КЛ	25	0	60	40
20. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	ТП	17	0	35	65
2005					
21. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	21	0	5	95
2006					
22. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	73	0	95	5
23. Одинцовский р-н, ЗБС	КК	13	0	100	0
24. Одинцовский р-н, Голицино	КЛ	49	0	2	98
25. Москва, Ботсад МГУ	КЛ	67	0	39	61
2007					
26. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	КЛ	20	0	25	75
27. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	ТП	87	0	43	57
28. Одинцовский р-н, Волково	КЛ	4	0	75	25
Всего проанализировано 932 изолята					

Прим. * - КЛ – листья картофеля, ТЛ – листья томата, ТП – плоды томата, КК – клубни картофеля, ЛХЛ – листья диких *Lycopersicon hirsutum*.

Спектр изоферментов пептидазы. При сравнительном генотипическом анализе традиционно используются спектры изоферментов (генотипы) глюкозо-6-фосфат изомеразы (GPI) и пептидазы (PER). При анализе российских популяций выяснилось, что по GPI все российские штаммы имеют только один генотип – 100/100. Также низким полиморфизмом отличается и первый locus пептидазы Per1, традиционно используемый в сравнительном анализе. Более высокий полиморфизм отмечен у изозимов второго locus пептидазы Per2. При электрофорезе на целлюлозоацетатных гелях locus Per2 окрашивается одновременно с locus Per1. Поэтому при выполнении

настоящей работы мы отказались от изучения спектра изоферментов GPI, и изучали только изоферменты локусов Pep1 и Pep2.

Спектр изоферментов пептидазы изучен у 337 изолятов, выделенных в 2003-2007 годах. Лocus Pеп1 был представлен двумя генотипами: 100/100 и 92/100, причем 92/100 встречался достаточно редко. Генотип 92/92 среди исследованных штаммов не был обнаружен. Лocus Pеп2 был представлен тремя генотипами: 100/100, 100/112 и 112/112, причём значительно чаще встречались штаммы с генотипами 100/100 и 100/112. Результаты тестирования приведены в таблице 2.

Таблица 2

Доли штаммов с разными генотипами по локусам Pеп1 и Pеп2

Популяция	Растение орган	Кол-во проанал. изолятов	Pеп1		Pеп2		
			92/100	100/100	100/100	100/112	112/112
2003							
1. Одинцовский р-н, ВНИИССОК	ТЛ	14	0	100	14	36	50
2. Воскресенский р-н	КЛ	5	60	40	100	0	0
3. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КЛ	14	0	100	0	100	0
4. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КК	5	0	100	60	40	0
5. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	ЛХЛ	9	0	100	11	89	0
6. Одинцовский р-н, ЗБС	К	32	28	72	90	10	0
7. Одинцовский р-н, ЗБС	Т	11	9	91	100	0	0
2005							
8. Одинцовский р-н, ЗБС	К	19	0	100	100	0	0
2006							
9. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	62	0	100	100	0	0
10. Одинцовский р-н, ЗБС	КК	11	0	100	100	0	0
11. Одинцовский р-н, Голицыно	КЛ	29	34	66	36	32	32
12. Шаховской р-н, Лобаново	ТП	5	20	80	40	40	20
13. Москва, Ботсад МГУ	КЛ	52	4	96	52	48	0
2007							
14. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	КЛ	15	7	93	60	40	0
15. Р. Марий Эл, г.	ТП	51	0	100	48	9	43

Йошкар-Ола							
16. Одинцовский р-н, Волково	КЛ	3	0	100	67	33	0
Всего проанализировано 337 изолятов							

Гаплотип митохондриальной ДНК определен у 241 изолята. Используемый в работе метод последовательной амплификации двух фрагментов митохондриальной ДНК позволяет идентифицировать 4 гаплотипа: Ia, IIa, Ib, IIb. Однако среди протестированных штаммов отмечались только гаплотипы Ia и IIa. В большинстве исследованных популяций встречены штаммы с обоими гаплотипами (таблица 3).

Таблица 3.

Доли штаммов с разными гаплотипами МтДНК

Популяция	Растение	Количество проанализированных изолятов	Доля штаммов с ТС (%)	
			Ia	IIa
2004				
Москва, Ботсад МГУ	КЛ	25	20	80
Одинцовский р-н, Одинцово	ТЛ	9	78	22
Одинцовский р-н, Троицкое	КЛ	8	25	75
Шаховской р-н, Лобаново	КЛ	11	82	18
Одинцовский р-н, Голицино	ТП	8	63	37
Одинцовский р-н, Голицино	КЛ	7	86	14
Одинцовский р-н, ЗБС	ТЛ	5	0	100
Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	16	0	100
2005				
Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	22	100	0
2006				
Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	25	24	76
Одинцовский р-н, ЗБС, перезим. клубни	К	12	83	17
Одинцовский р-н, Голицино	К	13	31	69
Москва, Ботсад МГУ	К	25	52	48
2007				
Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	КЛ	44	89	11

Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	ТП	11	18	82
Всего проанализирован 241 изолят				

Генотипический состав популяций по 3 маркерным признакам.

Генотипический состав по 3 маркерным признакам (тип спаривания, генотипы локусов Per1 и Per2) определен у 195 изолятов из Московской области и у 57 изолятов из Марий Эл. Наибольшее генотипическое разнообразие отмечено в популяциях 9 и 10 (по 6 различных генотипов), а также в популяциях 1 и 5 (по 4 генотипа) из Московской области. В популяциях из Марий Эл также отмечено высокое генотипическое разнообразие: популяция, выделенная с листьев картофеля, представлена 5-ю различными генотипами, а популяция с листьев томата – 6-ю. В разных популяциях наиболее часто встречались генотипы 00000 (в 8 популяциях), 10001 (в 7), 10000 (в 7), 00001 (в 6) (таблица 4).

Таблица 4.

Генотипический состав популяций по 3 маркерным признакам

Популяция	Растение орган	Кол-во проанал. изолятов	Генотипы (доля в%)
2003			
1. Одинцовский р-н, ВНИИССОК	ТЛ	14	00001 (28%), 10001 (7%), 10000 (15%), 10011 (50%)
2. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КЛ	8	10001 (100%)
3. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	КК	5	00000 (60%), 00001 (20%), 10001 (20%)
4. Одинцовский р-н, Голицыно, ВНИИФ	ЛХЛ	9	00000 (11%), 00001 (89)
5. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	31	00000 (31), 01000 (16%), 01001 (10%), 11000 (3%)
2005			
6. Одинцовский р-н, ЗБС	К	14	10000 (100%)
2006			
7. Одинцовский р-н, ЗБС	КЛ	55	00000 (93), 10000 (7%)
8. Одинцовский р-н, ЗБС	КК	8	00000 (100%)

9. Одинцовский р-н, Голицино	КЛ	25	10001 (28%), 10000 (12%), 10011 (24%), 11000 (24%), 11001 (4%), 11011 (8%)
10. Москва, Ботсад МГУ	КЛ	26	00000 (20%), 00001 (38%), 10000 (31%), 10001 (8%), 11000 (4%), 11001 (4%)
2007			
11. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	ТП	44	00000 (9%), 00001 (2%), 10001 (7%), 00011 (39%), 10000 (39%), 10011 (4%)
12. Р. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	КЛ	13	00000 (8%), 00001 (8%), 10001 (38%), 10000 (38%), 11000 (8%),

Сравнив генотипы всех исследованных изолятов в 2003-2007 гг с ранее изученными в 1999 – 2002 годах (таблица 5) видим, что в обоих случаях наиболее часто встречались штаммы с генотипами 00000, 10000, 10001 и 00011, причем бесспорное лидерство принадлежит 00000. Остальные генотипы встречались достаточно редко. В Марий Эл чаще других встречались генотипы 10000 и 00011, причем последний не был выявлен в Московской области в 2003-2007 годах, но проявлялся в более ранних сборах.

Таблица 5

Сравнение генотипов в популяциях Московской области и Марий Эл

Кодировка	Всего С 2003 по 2007		Всего с 1999 по 2002
	Московская область	Марий Эл	Московская область
00000	90*	9	59
10000	32	18	49
10001	27	8	20
00001	23	3	31
00011	0	17	11
10011	13	2	3
11000	8	1	1
01000	5	0	2
01001	3	0	0
11001	2	0	1
11011	2	0	0
01011	1	0	1
всего	206	58	177

Прим. * - количество изолятов, у которых был идентифицирован данный генотип.

Устойчивость к металаксилу. Все выделенные изоляты тестировались на устойчивость к фунгициду металаксил. Всего за период исследований протестирован 861 изолят. Среди изолятов, выделенных на делянках ЗБС, преобладали чувствительные к металаксилу, а среди выделенных на опытном поле ВНИИФ и в Ботаническом саду МГУ – устойчивые и слабоустойчивые (таблица 6). Ни на одной из исследуемых делянок металаксилосодержащие препараты не применяли.

При сравнении популяций 2003-2007 годов, по степени устойчивости к металаксилу была выявлена высокая гетерогенность ($X^2 = 611,2$ при $\nu=52$), но по грубым предварительным оценкам их можно объединить в 6 групп (Табл.6). Группы между собой гетерогенны ($X^2 = 345,23$ при $\nu=52$).

Таблица 6

Процентное соотношение штаммов с разной степенью устойчивости к металаксилу в популяциях на картофеле и на томате

Группа	Популяция	Доля штаммов в %			Всего
		S	SR	R	
1	2003. ВНИИСОК томаты	88,5	0	0	23
	2003 ВНИИФ МО томаты	84	16	0	25
	2003 Воскр р-н, ЛК	92,3	7,7	0	13
	2003 воскр р-н ПТ.	100	0	0	28
	2006 МО ЗБС К	98	2	0	50
	2006 ЗБС перезим кл.	87,9	0	0	51
2	2004 МО Шаховская	32	16	40	22
	2004 МО Раменка карт.	20	10	60	9
	2004 МО ЗБС перез.клубни	40	40	0	8
	2006 МО Раменка карт.	35,3	39,2	23,5	50
	2006 М.О. Шаховская Т.	0	80	20	5
	2007 Марий Эл Т	30	30	36	48
3	2003 ВНИИФ МО карт.	49,2	38,5	7,7	62
	2003 ЗБС лист картоф	54,9	32,9	0	72
	2004 МО ЗБС томат	45	35	5	17
4	2003 ЗБС лист том	10,7	78,6	0	25
5	2006 Ботсад МГУ карт.	13,5	35,1	45,9	70

6	2004 Ботсад МГУ	40,6	22,6	17,9	86
	2004 ВНИИСОК томаты	58,3	16,6	11,1	31
	2004 Йошкар-Ола томат	66,6	20	6,6	14
	2004 МО Троицкое	43,2	21,6	8,1	27
	2004 МО Волково томат	66,6	6,6	13,3	13
	2004 МО Волково картоф.	47,06	0	17,6	11
	2004 МО ЗБС картоф	49,2	16,9	21,5	57
	2005 МО ЗБС карт	66,6	14,8	0	22
	2007 Марий Эл карт	73,3	26,7	0	14

Сильные различия долей устойчивых и чувствительных изолятов наблюдаются между популяциями *P. infestans* на крупных коммерческих полях и на частных огородах (ЛПХ). Устойчивые и слабоустойчивые штаммы встречаются в ЛПХ значительно реже. По-видимому, это связано с тем, что Ридомил МЦ до 2007 года не продавался в мелких фасовках и практически не применялся в ЛПХ. Если учесть, что в ЛПХ производится более 90% урожая картофеля в России, то частные огороды можно рассматривать как существенный ресурс чувствительных генотипов.

Рост количества крупных хозяйств, занимающихся производством картофеля и практикующих систематическое применение фениламидных фунгицидов, а также начало реализации препарата Ридоми Голд МЦ в мелкой фасовке (для ЛПХ), вызвало в последнее время рост устойчивых штаммов.

Популяции в Республике Марий Эл. Представляемая работа является первым исследованием структуры популяций возбудителя фитофтороза в республике. Поэтому изоляты, выделенные в окрестностях города Йошкар Ола с картофеля и томата, были проанализированы наиболее подробно. В работе использовался набор независимых маркерных признаков, включающий тип спаривания, генотипы локусов Per 1 и Per 2, гаплотип митохондриальной ДНК и анализ микросателлитных повторов. Это позволило определить генотипический состав популяций по пяти маркерным признакам. Кроме того,

все изученные изоляты были протестированы на устойчивость к 2-м фунгицидам – металаксилу и манкоцебу, для них определён показатель ЕС₅₀.

У штаммов, выделенных с плодов томата, **соотношение типов спаривания** было близким к 1:1: A1:A2=43:57, а у выделенных с листьев картофеля доля типа спаривания A2 была значительно больше — 75%, а A1 — 25%. Штаммов, образующих ооспоры с обоими тестерными штаммами (A1A2) не было выявлено. Три изолята не образовали ооспор ни с одним из тестерных штаммов.

Изучение **изоферментов пептидазы** показало, что по локусу Per1 все марийские изоляты были 100/100, кроме одного, выделенного с картофеля, который имел генотип 92/100. По локусу Per2 разнообразие оказалось шире: 26 изолятов имели спектр 100/100 (50%); 9 изолятов были 100/112 (17%); и 17 изолятов – 112/112 (33%). Интересно, что среди штаммов, выделенных с картофеля, не было выявлено ни одного с генотипом по Per 2 112/112, в то время как изолятов с таким генотипом было довольно много среди «томатных».

Анализ микросателлитных повторов марийских изолятов показал присутствие в популяции 3-х различающихся по этому признаку типов штаммов, несущих генотипы L, L+N, и N. В популяциях из республики Марий Эл доля штаммов с генотипом L составляет 100% на картофеле и 65% на томате, доля N составляет 29% на томате, L+N – 6% на томате.

Доля изолятов с **гаплотипом митохондриальной ДНК Ia** составила 89% среди выделенных с картофеля и 18% среди выделенных с томата, Pa – 11% и 82% соответственно. Таким образом, применение этого маркера показало существенные различия между «картофельной» и «томатной» популяциями.

Анализ популяций по 5 маркерным признакам выявил высокое генотипическое разнообразие в популяциях *P. infestans*, выделенных в Марий Эл как с картофеля, так и с томата. Среди штаммов, выделенных с картофеля, идентифицировано 5 генотипов (проверено 10 изолятов), а среди выделенных с

томата – 12 генотипов (проверено 34 изолятов). Всего же среди штаммов, выделенных в Марий Эл, было выявлено 13 генотипов (таблица 7). Большое разнообразие «томатной» популяции объясняется, видимо, большим объёмом выборки. Так, генотипы N 2, 4, 8, 10, 11 и 12 отмеченные у единичных «томатных» изолятов, не обнаружены на «картофельных». Однако интересно, что генотип N 5, выявленный у 8 томатных изолятов, не обнаружен у «картофельных», а генотип N 13, найденный у 4 из 10 «картофельных», не обнаружен у «томатных».

Таблица 7

Генотипический состав популяций Марий Эл по 5 маркерным признакам

№	Кодировка	Доля штаммов с данным генотипом в популяции (%)	
		на картофеле	на томате
1	00000010	10	3
2	00000110	0	3
3	00001011	10	3
4	00011011	0	3
5	00011100	0	23
6	00011110	0	6
7	10000010	10	44
8	10001010	0	3
9	10001011	30	3
10	10001101	0	3
11	10011011	0	3
12	10011100	0	3
13	10000011	40	0
Всего проанализировано изолятов		10	34

Все изоляты из Марий Эл отличались низкой устойчивостью к металаксилу, показатель EC_{50} варьировал от 0,5 ppm до 4 ppm, причем у большинства штаммов он не превышал 1 ppm (рис. 2).

Устойчивость штаммов *P. infestans* к манкоцебу варьировала почти в 50 раз: значения показателя EC_{50} для разных образцов различались от 0.527 до 27

ppm (рис.2). Сильные вариации значения EC₅₀ были выявлены как среди «картофельных», так и среди «томатных» штаммов, хотя большая часть изолятов с повышенным уровнем устойчивости была выделена в республики Марий Эл с плодов томата. Сравнительный корреляционный анализ значений EC₅₀ по металаксилу и по манкоцебу, взаимосвязи двух этих параметров не выявил ($r_s = 0,0686$, при $P=0,6256$, для $n=53$).

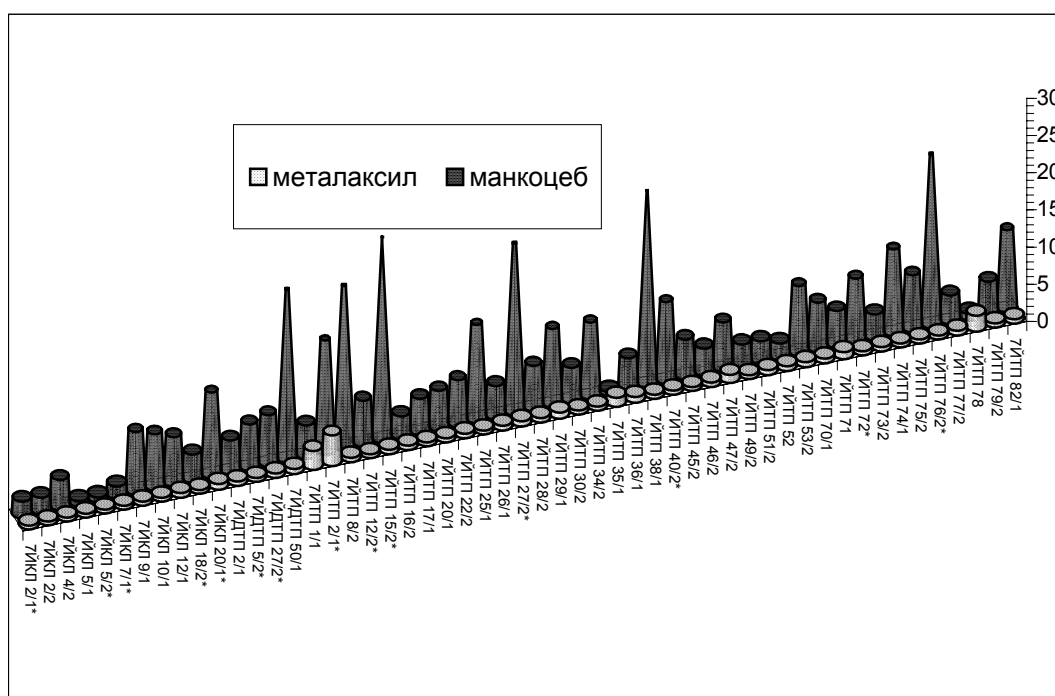


Рис 2. Уровни устойчивости (EC₅₀) штаммов из Марий Эл к фунгицидам.

Средняя устойчивость к манкоцебу для групп штаммов с разными мультилокусными генотипами варьировала от 2,5 до 27 ppm (таблица 8). Для большинства генотипов EC₅₀ не превышал 10 ppm. Только у двух генотипов наблюдался высокий уровень устойчивости: N 2 – 27 ppm, и N 5 – 14,3 ppm. Однако если к первому генотипу принадлежал только один исследованный изолят (самый устойчивый из всех проверенных), то ко второму – 8 штаммов, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости. Уровень устойчивости к металаксилу для всех генотипов был ниже, чем к манкоцебу, в большинстве случаев показатель EC₅₀ не превышал 1,0 ppm. Только у 3 генотипов EC₅₀ был больше 1: N 1 – 1,3 ppm, N 8 – 1,1 ppm и N 11 – 2,5 ppm.

Таблица 8

Устойчивость штаммов с различными генотипами к манкоцебу и металаксилу

№	Кодировка	Уровень устойчивости ЕС ₅₀ (ppm)	
		ЕС ₅₀ (манкоцеб)	ЕС ₅₀ (металаксил)
1	00000010	2,5	1,3
2	00000110	27	0,6
3	00001011	6,3	0,6
4	00011011	6,8	0,6
5	00011100	14,3	0,6
6	00011110	7,7	0,6
7	10000010	4,5	0,7
8	10001010	6,5	1,1
9	10001011	3,7	0,5
10	10001101	н/д	0,5
11	10011011	4,4	2,5
12	10011100	5,3	0,5
13	10000011	7,1	0,6
Среднее для всех генотипов		7,3	0,7

Присутствие штаммов с высоким значением ЕС₅₀, вероятно, связано с интенсивным применением манкоцеба в сельскохозяйственных областях страны. Поскольку резистентность к мультисайтовым препаратам контролируется большим числом слабо экспрессивных генов, приобретение устойчивости происходит постепенно, а не скачкообразно, что подтверждают данные этого исследования. Вероятно, у устойчивых штаммов, постепенно происходило накопление мутаций и шел отбор на механизмы, обеспечивающие устойчивость к манкоцебу.

Изучение гетероплазмоза у *P. infestans*. В процессе работы по изучению гаплотипов митохондриальной ДНК, были обнаружены штаммы, при разделении продуктов рестрикции которых в агарозном геле были

визуально заметны слабые полосы, соответствующие другому типу митохондриальной ДНК (рис. 3). Поэтому было решено провести дополнительное исследование, касающееся изучения возможности одновременного присутствия в одном мицелии генетически разных митохондрий. Второй тип митохондриальной ДНК отличается от типа I присутствием вставки размером 1881 пн и другим расположением сайтов рестрикции в регионах P2 и P4.

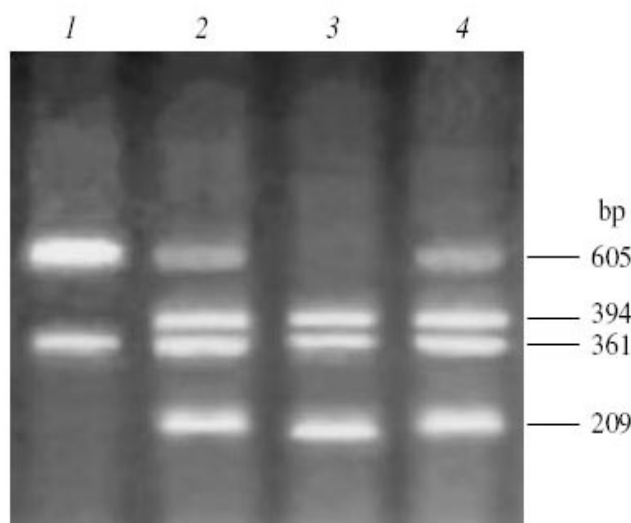


Рис. 3. Продукты рестрикции после электрофоретического разделения.

1 – контрольный штамм с гаплотипом IIa, 2 и 4 – штаммы содержащие полосы гаплотипов Ia и IIa, 3 – штамм с гаплотипом Ia (без вставки).

К фрагменту вставки длиной 709 пн (рис. 4) были сконструированы праймеры VSF_{or} и VSRev. Если в геноме штамма, имеющего тип mtDNA Ia согласно пробе PCR-RFLP, обнаруживали фрагмент вставки, то штамм считали гетероплазматическим, в противном случае - гомоплазматическим.

```

5195
5221 aatttcactt ggagaatcta ttgatgttgt tgttgtaaat ggaatagtcg gtattattga
5281 acgcattata actccaccta tagggggtaa acccattgaa cttaatgcca tagaacctaa
5341 aataccaacc ccctcataaa ctagtcttcg tctatttaaa gaaattctag aatcaatttc
5401 cctattaaac tcatcaactc tttgttgaag ctgttcttca ttaactaatc gaatttgatt
5461 taaatattca tcataattat ctacttgagt atttaaaatt gaaaaaattt aattattatt
5521 ataaactacc attgattttc tcatattttg aataaagtct cttataacta attcatctat
5581 atctaaatta gatctagtat ataaaaatat attacctatt cgatataagt cttcttctga
5641 tatatttaaa tcattcgaag atcgaattaa taaatcatgt aaatatgtcc taacttgtaa
5701 tgaactattt cttattagta ataaactaat ttcttgatta ttttgataat ttaaaatgtt
5761 ttgcattaac tctatacgtt cttcagatga agtcctatta ttaatattaa taacaccttc
5821 actatctaaa acttcagtat ttcccatttg ttctacccat ggaatcctat atcgagttga

```

5881 atgtaataat tgatgcgcca ttgc

Рис.4. Последовательность нуклеотидов фрагмента МтДНК гаплотипа Ia (5195-5904), амплифицируемого праймерами VSFor и VSRev (подчеркнуты) (по данным Genbank)

Для доказательства гетероплазматической природы штаммов, несущих вставку, изолят ЗМОБТЛ139, содержащий вставку и имеющий Ia тип mtDNA согласно пробе PCR-RFLP, был расклонирован на 4 монозооспоровых клон. Все они содержали вставку. Далее один из клонов был еще раз расклонирован на 16 изолятов (К1 – К16). Все монозооспоровые клоны и родительский штамм показали тип Ia при тестировании методом PCR-RFLP. Анализ вставки выявил различия в количестве ПЦР-продукта (рис. 5), причем один клон (9) не содержал вставки. Вероятно, в процессе монозооспорового клонирования в этот изолят попали только митохондрии с геномом типа Ia.



Рис. 5. Амплификация вставки (709 пн) у монозооспорового потомства штамма ЗМОБТЛ139. Прим.: 1-16 – монозооспоровые потомки штамма ЗМОБТЛ139.

Исследование штаммов, выделенных в природных очагах фитофтороза и имеющих тип митохондриальной ДНК Ia, показало, что большинство являются гетероплазмами (таблица 9).

Таблица 9.

Гетероплазматические штаммы в природных популяциях

Место выделения	Год выделения	Растение -хозяин	Кол – во протестированных изолятов	Содержали вставку – гетероплазмы
Одинцовский р-н	2003	КЛ	11	10
Одинцовский р-н	2003	ТЛ	4	4
респ. Мордовия	2003	ТП	2	0

Одинцовский р-н	2004	КЛ	10	10
Одинцовский р-н	2004	ТЛ	9	8
Одинцовский р-н	2004	ТП	8	8
Шаховской р-н	2004	КЛ	9	9
г. Москва	2004	КЛ	2	2
респ. Марий-Эл	2004	КЛ	1	1
г. Москва	2005	КЛ	20	19
Итого:	—	—	75	71

Возможно, массовое появление гетероплазмонов в полевых популяциях – это еще одно звено в цепи глобальных изменений, происходящих в популяциях возбудителя фитофтороза, и связано оно с появлением полового процесса и ооспорообразования в полевых популяциях европейской части России.

ВЫВОДЫ

1. В большинстве исследованных полевых популяций отмечено высокое генотипическое разнообразие, присутствуют штаммы обоих типов спаривания, выявлены два гаплотипа митохондриальной ДНК, разные генотипы локусов *Per1* и *Per2*. Наибольшее разнообразие выявлено у локуса *Per2*.

2. Устойчивость к металаксилу штаммов, выделенных на частных огородах, была практически всегда ниже, чем у выделенных с крупных коммерческих полей, где применяли этот фунгицид. Однако не всегда прослеживается связь между применением металаксила и устойчивостью. По-видимому, устойчивость, накопленная в процессе непосредственного контакта с препаратом, может сохраняться в течение длительного времени и при отсутствии обработок.

3. Анализ устойчивости к манкоцебу в популяциях из Марий Эл показал сильное варьирование показателя ЕС50 (более, чем в 50 раз). В популяциях из Московской области и Беларуси (данные не приведены) различия штаммов по устойчивости были менее выражены.

4. Выявлены штаммы, имеющие генетически разные митохондрии в одном мицелии (гетероплазмы). Гетероплазмы были обнаружены в большинстве популяций Европейской части России.

5. Генотипирование популяций по трем маркерным признакам, позволило выявить 12 генотипов. Наиболее часто встречались штаммы с четырьмя генотипами. Остальные генотипы встречались достаточно редко.

6. Популяции, выделенные в Республике Марий Эл как с картофеля, так и с томата, имели высокое генотипическое разнообразие. Генотипирование на основании 5 независимых маркерных признаков позволило выявить как общие для «картофельных» и «томатных» популяций генотипы, так и специфические, часто встречающиеся среди «картофельных» штаммов, и отсутствующие на «томатных», и наоборот.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Апрышко В.П., Милютина Д.И. Популяции *Phytophthora infestans* на картофеле и томате //Материалы докладов XII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», М.: СП "Мысль", 2005. – С. 235.
2. Еланский С.Н., Апрышко В.П., Милютина Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к системным фунгицидам //Материалы международной конференции «Грибы и водоросли в биоценозах – 2006», М., МАКСпресс, 2006. – С. 56-58.
3. Еланский С.Н., Апрышко В.П., Милютина Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к фунгицидам металаксил и диметоморф //Вестник московского университета, серия 16. Биология, 2007, N 1. – С. 14-18.
4. Еланский С.Н., Милютина Д.И. Гетероплазмоз у *Phytophthora infestans* //Генетика, 2007, т. 43, N 3. – С. 333-336.

5. Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т., Милютина Д.И., Апрышко В.П., Побединская М.А., Филиппов А.В., Козловский Б.Е., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Стацюк Н.В. Популяции возбудителя фитофтороза в России// Картофелеводство России. Актуальные проблемы науки и практики. Материалы Международного конгресса «Картофель. Россия. 2007», М. 2007. – С. 211–222.
6. S.N. Elansky, Yu.T. Dyakov, D.I. Milyutina, V.P. Apryshko, M.A. Pobedinskaya, A.V. Filippov, B.E. Kozlovsky, M.A. Kuznetsova, A.N. Rogozhin, N.V. Statsyuk Late blight of potato in Russia //Potato production and innovative technologies. Ed. A.J. Havenkort, B.V. Anisimov, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 2007. – P. 262-274.
7. S.N. Elansky, D.I. Milyutina Mitochondrial haplotypes of Russian *Phytophthora infestans* strains //XV Congress of European Mycologists. S.-Pb., Russia, September 16-21, 2007. Book of Abstracts. – P. 245.
8. Милютина Д.И., Шеин С.А., Апрышко В.П., Еланский С.Н. Популяции *Phytophthora infestans* в Республике Марий Эл //Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. – С. 193.
9. Еланский С.Н., Пляхневич М.П., Шеин С.А., Романова С.С., Александрова А.В., Милютина Д.И. Устойчивость к манкоцебу штаммов *Phytophthora infestans* и *Alternaria sp.* из России и Беларуси //Современная микология в России. Том 2. Материалы 2-го Съезда микологов России. М.: Национальная академия микологии, 2008. – С. 290.