

УДК 582.244.2 : 581.15(471.343)

© С. А. Шейн, Д. И. Милютина, И. Н. Козловская, Е. В. Морозова,  
М. А. Побединская, С. Н. Еланский

### ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* В РЕСПУБЛИКЕ МАРИЙ ЭЛ

SHEIN S. A., MILYUTINA D. I., KOZLOVSKAYA I. N., MOROZOVA E. V.,  
POBEDINSKAYA M. A., ELANSKY S. N. GENOTYPIC DIVERSITY OF *PHYTOPHTHORA*  
*INFESTANS* ISOLATES FROM MARI EL

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — возбудитель фитофтороза картофеля и томата — уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившийся в Европе в середине XIX столетия патоген вызвал эпифитотию фитофтороза картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений.

На территории России фитофтороз встречается практически во всех регионах, занимающихся производством картофеля и томата. Нашими предыдущими исследованиями показано, что структура популяций возбудителя фитофтороза в разных регионах России различается (Elansky et al., 2001; Аманханова и др., 2004; Elansky, Smirnov, 2003). Так, популяции, распространенные на территории сибирской и дальневосточной частей России, состоят из ограниченного числа клонов, генетический обмен между которыми крайне редок. В то же время популяции Московской обл. и Северного Кавказа 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 популяции в среднем и нижнем Поволжье, хотя в этом регионе не только интенсивно возделывается картофель, но и базируются крупные семеноводческие компании, реализующие семенные клубни во многих регионах Центральной России.

В предлагаемой работе впервые представлены результаты исследования популяций возбудителя фитофтороза картофеля и томата в Республике Марий Эл. Для сравнительного анализа использовали набор независимых маркерных признаков, включающих тип спаривания, генотипы локусов *Per-1* и *Per-2*, гаплотип митохондриальной ДНК и анализ микросателлитных повторов. Все изученные изоляты протестированы на устойчивость к фунгицидам — манкоцебу и металаксилу, проведено изучение вирулентности к образцам картофеля с различными генами устойчивости.

#### Материал и методы

Сбор пораженных фитофторозом образцов проводили в 2007 г. в окрестностях г. Йошкар-Ола с посадок картофеля и томата. Брали не более одного образца с одного

растения; по возможности на поле выбирали растения, отстоящие друг от друга не менее чем на 10 м.

Выделение изолятов *P. infestans* из пораженных фитофторозом органов растений (листьев, плодов, стеблей, клубней) проводили в лабораторных условиях с использованием метода влажных камер. Всего из собранных фитофторозных образцов было выделено в чистую культуру 44 изолята.

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

Определение вирулентности к сортам-дифференциаторам с различными генами устойчивости, полученными из Международного картофельного центра в Лиме (Перу), проводили по методике, описанной в работе Ф. Х. Ахматхановой с соавторами (2004). Исследовали вирулентность к образцам с генами R1—R11.

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

Гаплотипы митохондриальной ДНК идентифицировали согласно методике, разработанной Гриффит и Шоу (Griffith, Shaw, 1998). Продукты амплификации разделяли в 0.8%-м агарозном геле, продукты рестрикции — в 1.5%-м. Гели готовили на трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия.

Анализ микросателлитных повторов (SSR) проводили с помощью праймеров на locus Pi4G F: 5'-CGCTGTGTGGATGACAAGTA и R: 5'-TCGACCTGACATACGAGCTA. После электрофоретического разделения продуктов амплификации исследованных образцов были выявлены несколько фрагментов различной длины. Для анализа в настоящей работе были выбраны два фрагмента, четко видимые и легко идентифицируемые при анализе ПЦР-продуктов всех исследуемых изолятов. Первый фрагмент длиной около 160 пн был обозначен как L, 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 манкоцебу и металаксилу проводили на овсяной агаризованной среде с добавлением фунгицида в концентрациях 1, 10 и 50 мг<sup>-1</sup>. На основании полученных данных по относительной скорости роста вычисляли показатель EC<sub>50</sub> — концентрацию фунгицида, ингибирующую рост мицелия анализируемого изолята на 50 %.

Кодировку генотипов проводили в двоичной системе, с учетом порядка следования признаков: знаки 1 и 2 — типы спаривания 10-A1, 01-A2; 3 и 4 — генотипы локуса пептидазы Pep-1: 00 — 100/100, 10 — 92/100; 5 и 6 — генотипы локуса пептидазы Pep-2: 00 — 100/100, 01 — 100/112, 11 — 112/112; 7 и 8 — генотипы SSR: 10 — L, 01 — H, 11 — LH; знаки 9 и 10 — гаплотип митохондриальной ДНК: 10 — 1a, 01 — 2a.

## Результаты и обсуждение

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

Изучение изоферментов пептидазы показало, что по локусу Pep-1 у всех марийских изолятов спектр соответствовал 100/100, кроме одного, выделенного с картофеля, который имел генотип 92/100. По локусу Pep-2 разнообразие оказалось шире: 26 изолятов имели спектр 100/100 (50 %), 9 изолятов — 100/112 (17 %) и 17 — 112/112 (33 %). Интересно, что среди штаммов, выделенных с картофеля, не было выявлено ни одного с генотипом 112/112 по локусу Pep-2, в то время как их было довольно много среди «томатных» штаммов.

Таблица 1

**Генотипический состав популяций *Phytophthora infestans*  
из Марий Эл по 5 маркерным признакам**

Номер	Кодировка генотипа	Доля штаммов с указанным генотипом в популяции, %	
		на картофеле	на томате
1	1000001010	10	3
2	1000001110	0	3
3	1000011001	10	3
4	1000111001	0	3
5	1000110110	0	23
6	1000111110	0	6
7	0100001010	10	44
8	0100010101	0	3
9	0100011001	30	3
10	0100011010	0	3
11	0100110110	0	3
12	0100111001	0	3
13	0100001001	40	0
Всего проанализировано изолятов		10	34

Анализ микросателлитных повторов марийских изолятов показал присутствие в популяции трех различающихся по этому признаку типов штаммов, несущих генотипы L, L + H и H. Доля штаммов с генотипом L составляла 100 % на картофеле и 65 % на томате, доля H — 29 %, L + H — 6 % на томате.

Доля изолятов с гаплотипом митохондриальной ДНК Ia составляла 89 % среди выделенных с картофеля и 18 % с томата, IIa — 11 и 82 % соответственно. Таким образом, применение этого маркера показало существенные различия между «картофельной» и «томатной» популяциями. Штаммы с другими гаплотипами не были выявлены.

Анализ генотипической структуры показал высокое разнообразие в популяциях *Phytophthora infestans*, выделенных как с картофеля, так и с томата. Среди штаммов с картофеля идентифицировано 5 генотипов (проверено 10 изолятов), а среди выделенных с томата — 12 генотипов (проверено 34 изолята). Всего среди штаммов, выделенных в Марий Эл, было выявлено 13 генотипов (табл. 1). Большее разнообразие «томатной» популяции объясняется, видимо, большим объемом выборки. Так, генотипы № 2, 4, 8, 10, 11 и 12, отмеченные у единичных «томатных» изолятов, не обнаружены среди «картофельных». Однако генотип № 5, выявленный у 8 томатных изолятов, не обнаружен у «картофельных», а № 13, найденный у 4 из 10 «картофельных», не обнаружен у «томатных».

Все изоляты из Марий Эл отличались низкой устойчивостью к металаксилу; показатель  $EC_{50}$  варьировал от 0.5 до 4 млн<sup>-1</sup>, причем у большинства штаммов он не превышал 1 млн<sup>-1</sup>.

Устойчивость штаммов *P. infestans* к манкоцебу варьировала почти в 50 раз: значения показателя  $EC_{50}$  для разных образцов различались от 0.527 до 27 млн<sup>-1</sup>. Сильные вариации значения  $EC_{50}$  были выявлены как среди «картофельных», так и среди «томатных» штаммов, хотя большая часть изолятов с повышенным уровнем устойчивости была выделена с плодов томата. Сравнительный корреляционный анализ значений  $EC_{50}$  по металаксилу и манкоцебу взаимосвязи двух этих параметров не выявил ( $r_s=0.0686$ ,  $P=0.6256$ ,  $n=53$ ).

Средняя устойчивость к манкоцебу для групп штаммов с разными мультилокусными генотипами варьировала от 2.5 до 27 млн<sup>-1</sup> (табл. 2). Для большинства генотипов  $EC_{50}$  не превышала 10 млн<sup>-1</sup>. Только у двух генотипов (№ 2 и 5) наблюдался высокий уровень устойчивости — 27 и 14.3 млн<sup>-1</sup> соответственно. Однако если к перво-

Таблица 2

**Устойчивость штаммов *Phytophthora infestans* с различными генотипами к манкоцебу и металаксилу**

Номер	Кодировка генотипа	Уровень устойчивости EC <sub>50</sub> , млн <sup>-1</sup>	
		манкоцеб	металаксил
1	1000001010	2.5	1.3
2	1000001110	27	0.6
3	1000011001	6.3	0.6
4	1000111001	6.8	0.6
5	1000110110	14.3	0.6
6	1000111110	7.7	0.6
7	0100001010	4.5	0.7
8	0100010101	6.5	1.1
9	0100011001	3.7	0.5
10	0100011010	н/д	0.5
11	0100110110	4.4	2.5
12	0100111001	5.3	0.5
13	0100001001	7.1	0.6
Среднее для всех генотипов		7.3	0.7

му генотипу принадлежал только один исследованный штамм (самый устойчивый из всех проверенных), то ко второму — 8 штаммов, большинство из которых обладали высоким уровнем устойчивости. Присутствие штаммов с высоким значением EC<sub>50</sub>, вероятно, связано с интенсивным применением манкоцеба в сельскохозяйственных областях страны. Поскольку резистентность к мультисайтовым препаратам контролируется большим числом слабоэкспрессивных генов, приобретение устойчивости происходит постепенно, а не скачкообразно, что подтверждают данные этого исследования. Вероятно, у устойчивых штаммов постепенно происходило накопление мутаций и шел отбор механизмов, обеспечивающих устойчивость к манкоцебу.

В исследованных популяциях преобладали сложные расы с числом генов вирулентности, близким к максимальному. Все изоляты были протестированы на вирулентность к 11 генам устойчивости картофеля. Средняя вирулентность «картофельных» штаммов составляла 9.4, «томатных» — была несколько ниже (8.9). Гены R1, R2, R3 были отмечены у всех исследованных штаммов. Наиболее редкими оказались R5 и R9, остальные гены встречались практически у всех протестированных штаммов (табл. 3). Это совпадает с результатами исследований, выполненных для других регионов России (Elansky et al., 2001; Аманханова и др., 2004).

Проведенные исследования показывают, что популяции *P. infestans* из Марий Эл, как и популяции из других частей Европейской России, Белоруссии (Пляхневич, Еланский, 2008), Западной Европы, отличаются высоким генотипическим и фенотипическим разнообразием. В них обнаружены изоляты с A1 и A2 типами спаривания, все три возможных аллельных состояния (две гомозиготы и гетерозигота) по локусу

Таблица 3

**Частота отдельных генов вирулентности в исследованных популяциях *Phytophthora infestans* из Марий Эл**

Популяции	Гены вирулентности										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Картофель	100	100	100	100	64	91	100	82	10	100	91
Томаты	100	100	100	89	50	94	94	78	10	83	94

Рер-2, разные генотипы мтДНК и микросателлитных повторов. Генотипический анализ, проведенный на основании комплекса независимых маркерных признаков, выявил 5 генотипов среди 10 исследованных штаммов, выделенных с картофеля, и 12 — среди 34, выделенных с томата. Особо следует отметить наличие генотипов, распространенных только среди «томатных» или только среди «картофельных» штаммов.

Отдельного внимания заслуживают результаты, показывающие высокие различия в уровне устойчивости штаммов к манкоцебу, поскольку это один из наиболее популярных в России фунгицидов, широко используемый как отдельно, так и в смесевых препаратах и на картофеле, и на томате. Появление высокоустойчивых штаммов в среднем Поволжье, где сосредоточены многие семеноводческие хозяйства, может способствовать их быстрому распространению в других регионах России с семенным материалом.

Таким образом, исследования, проведенные нами в последние годы в разных регионах европейской части России и в Белоруссии, показывают повсеместное высокое внутрипопуляционное генотипическое разнообразие. Практически во всех популяциях встречаются штаммы обоих типов спаривания, несущие близкое к максимальному число генов вирулентности, которые различаются по уровню устойчивости к металаксилу и манкоцебу. В пораженных образцах часто присутствуют ооспоры (В. П. Апрышко, личное сообщение). 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.

Работа выполнена при поддержке МНТЦ (проект № 3440).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Аматханова Ф. Х., Дьяков Ю. Т., Петрунина Я. В., Побединская М. А., Еланский С. Н., Козловская И. Н., Козловский Б. Е., Морозова Е. В., Смирнов А. Н. Популяции *Phytophthora infestans* на Северном Кавказе // Микология и фитопатология. 2004. Т. 38, вып. 3. С. 71—78.

Пляхневич М. П., Еланский С. Н. Генотипический анализ белорусских штаммов возбудителя фитофтороза картофеля // Матер. II Всерос. конф. «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам». СПб., 2008. С. 79—83.

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

Elansky S. N., Smirnov A. N., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovskiy B., Koslovskaya I., Russo P., Smart C., Dry W. Genotypic analysis of Russian *Phytophthora infestans* isolates from the Moscow region, Siberia and Far East // J. Phytopathol. 2001. Vol. 149. P. 605—611.

Griffith G. W., Shaw D. S. Polymorphism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure culture or from host lesion // Appl. Env. Microbiol. 1998. Vol. 64, N 10. P. 4007—4014.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

ВНИИ фитопатологии  
Московская область  
diakov@herba.msu.ru

Поступила 22 XII 2008

#### Р Е З Ю М Е

У изолятов *Phytophthora infestans*, выделенных в 2007 г. в Республике Марий Эл, был проанализирован комплекс независимых маркерных признаков, включающий тип спаривания, спектр изоферментов двух локусов пептидазы, гаплотип митохондриальной ДНК, генотипы

микросателлитных повторов. На основании результатов тестирования признаков этого комплекса для каждого исследованного штамма был составлен мультилокусный генотип.

С помощью анализа генотипической структуры было выявлено высокое разнообразие в популяциях *P. infestans*, выделенных 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 изолята). Выявлены генотипы, встречающиеся только среди «картофельных» или только среди «томатных» штаммов.

Все штаммы также были протестированы на устойчивость к фунгицидам — металаксилу и манкоцебу. Все изоляты из Марий Эл отличались низкой устойчивостью к металаксилу, показатель  $EC_{50}$  варьировал от 0.5 до 4 млн<sup>-1</sup>, причем у большинства штаммов он не превышал 1 млн<sup>-1</sup>. Устойчивость штаммов *P. infestans* к манкоцебу варьировала почти в 50 раз: значения показателя  $EC_{50}$  для разных образцов составляли от 0.527 до 27 млн<sup>-1</sup>. Сильные вариации значения  $EC_{50}$  были выявлены как среди «картофельных», так и среди «томатных» штаммов, хотя большая часть изолятов с повышенным уровнем устойчивости была выделена с плодов томата.

Все изоляты были протестированы по вирулентности к образцам картофеля с 11 генами устойчивости. В исследованных популяциях преобладали сложные расы с числом генов вирулентности, близким к максимальному. Средняя вирулентность «картофельных» штаммов составила 9.4, «томатных» — 8.9. Гены R1, R2, R3 были отмечены у всех исследованных штаммов. Наиболее редкими оказались гены R5 и R9, остальные встречались практически у всех протестированных штаммов.

Ключевые слова: болезни картофеля, фитофтороз, генотипический анализ, манкоцеб, устойчивость к фунгицидам.

## S U M M A R Y

*Phytophthora infestans* strains collected from the Mari El during 2007 were analyzed on the mating types, resistance to fungicides metalaxyl and mankozeb, isozyme loci Pep-1, Pep-2, haplotypes of mitochondrial DNA, microsatellite (SSR) genotypes. High level of genotypic and phenotypic diversity was mentioned in populations from tomato and potato. Mating types A1 and A2 were in comparative ratio in populations from tomato, and A2 prevailed in population from potato. At locus Pep-1 the genotype 100/100 prevailed, the frequency of heterozygote 92/100 was very low (only 1 isolate from potato). At locus Pep-2 genotype 100/100 also prevailed, but 112/112 and heterozygote 100/112 occurred often, too. Mitochondrial haplotypes IIa and Ia occurred populations, other described haplotypes were not found. There were several multilocus genotypes, identified on potato or tomato only.

Complex potato races predominated in all studied populations, virulence genes R1—R4, R7, R8, R10 and R11 were often, R5 and R9 were rare. Majority of tested isolates were sensitive to metalaxyl ( $EC_{50}$  different from 10.5 to 4 ppm). Resistance to another fungicide, mankozeb, varied about 50 times,  $EC_{50}$  differed from 0.5 to 27 ppm.

Key words: potato diseases, late blight, *Phytophthora infestans*, fungicide resistance, genotypic analysis, mankozeb.