

УДК 632.4:635.21:582.281.257

Н. В. Мироненко, А. В. Хютти, О. С. Афанасенко

ХАРАКТЕРИСТИКА ПОПУЛЯЦИЙ *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* ПО ВИРУЛЕНТНОСТИ, АГРЕССИВНОСТИ И ДНК-МАРКЕРАМMIRONENKO N. V., KHYUTTI A. V., AFANASENKO O. S. CHARACTERISTICS OF *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* POPULATIONS ON VIRULENCE, AGGRESSIVENESS AND DNA-MARKERS

Возбудитель рака картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. включен в перечень карантинных видов 55 государств (Распространение по странам мира..., 1987). Это облигатный внутриклеточный паразит, который поражает все органы растения-хозяина, кроме корней. Заболевание проявляется в виде наростов различной формы на клубнях, корневой шейке, столонах и ростках. Иногда признаки заболевания можно обнаружить на стеблях, листьях и цветках. Паразит сохраняется в почве после сгнивания раковых наростов в виде перезимовавших зооспорангиев, которые благодаря плотным оболочкам могут более 40 лет находиться в почве в покоящемся состоянии, не теряя жизнеспособности (Laidlaw, 1985). Заражение происходит весной благодаря контакту растения-хозяина и паразита при прорастании зооспорангиев. Широкая географическая распространенность возбудителя рака картофеля, его способность длительное время сохраняться в почве и возможность образовывать новые агрессивные патотипы в результате полового процесса свидетельствуют о высокой генетической пластичности и большой опасности этого паразита.

Известно, что географические популяции *S. endobioticum* могут различаться по агрессивности к восприимчивым сортам картофеля (Бондарь, 1989; Данченко, 1989; Ламеко, Толкачев, 1991). Этот факт необходимо учитывать при подборе восприимчивого сорта для размножения инокулюма возбудителя рака картофеля.

В настоящее время, несмотря на существующий карантинный надзор, появляются новые очаги болезни, в которых отмечаются расы патогена, ранее неизвестные для этих регионов (Potocek et al., 1991; Vaayen et al., 2006). Наличие помимо картофеля других видов растений-хозяев из семейства пасленовых, таких как томаты, белена, паслены сладко-горький, черный и желтый, физалис и другие, также может способствовать возникновению новых рас (Hampson, Naard, 1980; Шариков, 1975; Тарасова, 1978). Известно, что заражение картофеля происходит сильнее при переходе *S. endobioticum* с других пасленовых (Тарасова, 1978). Поскольку до 92 % от общего объема производимого картофеля концентрируется в индивидуальных и личных подсобных хозяйствах, трудно контролировать его сортовую чистоту (Анисимов, 2001). Это способствует не только накоплению инфекции на восприимчивых сортах, но и создает благоприятные условия для микроэволюционных изменений паразита. Отсутствие популяционных исследований *S. endobioticum*, по-видимому, связано с методическими трудностями работы с этим паразитом. Поскольку раковые наросты представляют собой разросшиеся клетки растения, заполненные зооспорами паразита, ДНК, выделенная из них, является смесью ДНК паразита и растения-хозяина. Между тем изуче-

ние генетической изменчивости паразита имеет важное значение для понимания закономерностей микроэволюции популяций и в том числе механизмов расообразования *S. endobioticum*.

Целью исследований являлась характеристика изменчивости популяций возбудителя рака картофеля различного географического происхождения по признакам вирулентности, агрессивности и молекулярным маркерам.

Материал и методы

Для инокуляции растений в лабораторных условиях были использованы образцы четырех географических популяции возбудителя рака картофеля: московской (Россия, Московская обл., Люберецкий район, п. Коренево), ленинградской (Россия, Ленинградская обл., Кировский район, п. Старая Малукса), белорусской (Белоруссия, Минская обл., п. Самохваловичи) и украинской (Украина, Черновицкая обл., Новоселицкий район, с. Бояны).

Дифференциацию патотипов и оценку агрессивности московской, белорусской и украинской популяций проводили двумя методами: заражением ростков картофеля в «компосте», содержащем перезимовавшие (покоящиеся) зооспорангии *S. endobioticum*, и от свежих раковых наростов, содержащих быстро прорастающие зооспорангии патогена, образовавшиеся летом. Агрессивность ленинградской популяции изучали только к восприимчивому сорту картофеля Лиза. Во всех экспериментах в качестве инокулята использовали свежие раковые наросты или «зооспорангиевый порошок», полученные на сорте Лиза. Этот же сорт был использован и в качестве контроля.

Для определения патотипного состава различных географических популяций *S. endobioticum* (московской, белорусской и украинской) были размножены сорта картофеля, которые ранее были использованы в качестве дифференциаторов в различных наборах (Салтыкова, 1988; Potocek et al., 1991; Stachewicz et al., 1998; Мельник и др., 1999; ОЕПР/ЕРРО, 2004). Мы объединили в один набор 20 сортов-дифференциаторов картофеля (Альма, Лорх, Полесский розовый, Свитанок киевский, Львовский белый, Пролисок, Луговской, Антарес, Ора (Мира), Аполло, Гиевонт, Фонтана, Кардула, Воловецкий, Незабудка, Спадщина, Барбара, Ресурс, Темп и Божедар), имеющихся в коллекции ВИРа. С использованием этого набора сортов возможно выявить патотипы, распространенные в бывшем СССР, — 1 (D1), 11 (M1), 13 (R2), 16 (S1), 18 (I), 20, 21, 22, а также частично идентифицировать патотипы, распространенные в Германии, — 2 (G1), 4 (P1), 5 (K1), 6 (O1), 7 (S1), 8 (F1), 9 (R1), 10 (E1), 18 (T1), Норвегии, — 2 (G1), 6 (O1), 18 (T1) и Чехии, — 15 (P2), 16 (N1), 17 (M2).

Для приготовления инокулята отбирали зрелые раковые наросты, которые разламывали на кусочки размером не более 0.5 см³, укладывали тонким слоем и высушивали. Высушенные наросты растирали резиновым пестиком и просеивали через сита с отверстиями 0.25 мм. Приготовленный «зооспорангиевый порошок» хранили в воздушно-сухом состоянии.

Для приготовления «компоста» использовали легкую песчаную плодородную почву, которую перемешивали с «зооспорангиевым порошком». Для инокуляции 1 кг почвы добавляли 10—12 г «зооспорангиевого порошка». Навеску с инфекционным материалом корректировали в зависимости от жизнеспособности зооспорангиев. Оптимальной инфекционной нагрузкой считается наличие 30—40 жизнеспособных покоящихся зооспорангиев в 1 г почвы (Методические указания..., 1982; Дмитрашук, Романюк, 1999).

Известно, что покоящиеся зооспорангии возбудителя рака картофеля прорастают приблизительно на 11-е сутки после замачивания в воде (Hampson, 1986). За 10—15 суток до посадки клубней приготовленный «компост» смачивали водой и оставляли при температуре 16—18 °С. В течение этого времени не допускали его пересыхания и уплотнения.

Для стимуляции прорастания картофеля использовали воздействие переменных температур: 7 суток — при 23—25°, 5 суток — при 3—5° и в дальнейшем

при 23—25°. Для заражения *S. endobioticum* отбирали клубни с ростками до 1 мм длиной.

На дно каждого вегетационного ящика размером 40×30 см и высотой 20 см насыпали крупнозернистый песок (дренаж) слоем 3—5 см, в который, слегка вдавливая, высаживали по 10 клубней каждого сорта-дифференциатора и по 5 клубней восприимчивого сорта (контроль) в трех повторностях. После этого клубни смачивали водой и засыпали увлажненным «компостом», до получения результатов заражения поддерживали постоянную влажность компоста на уровне 70—80 % и температуру 16—18°. После того как болезнь полностью проявлялась на восприимчивом сорте, учитывали количество пораженных клубней и массу образовавшихся наростов через 2—2.5 месяца после посадки.

Здоровые, без механических повреждений образцы картофеля, имеющие ростки до 1 мм, высаживали в поддоны размером 45×35×5 см с увлажненным песком. В каждый поддон помещали по 10 клубней одного сорта в трех повторностях. До проведения инокуляции ростков на каждый клубень вокруг верхушечных ростков накладывали кольцо из изоляционной ленты шириной 2 см (SafeLine, Германия). В кольца наливали дистиллированную воду и помещали кусочек свежего нароста. Поддоны накрывали деревянными ящиками и прикрывали их влажной плотной тканью (мешковиной). Для инокуляции использовали кусочки свежих раковых наростов белого цвета размером до 1 см³ 20-суточного возраста. Инокулюм оставляли на 24 ч при температуре 12—15°, затем наросты заменяли свежими и оставляли еще на 24 ч. После этого с клубней удаляли кольца из изоляционной ленты.

Реакцию сортов картофеля на инокуляцию *S. endobioticum* оценивали через 3—4 недели по следующей шкале:

группа 1 — устойчивые. Защитный некроз охватывает отдельные эпидермальные клетки или участки ткани ростков;

группа 2 — слабовосприимчивые. Защитный некроз появляется поздно. Наличие покоящихся зооспорангиев, полностью окруженных некрозом;

группа 3 — восприимчивые. Некроз отсутствует или незначительный. Наличие покоящихся зооспорангиев без некроза. Образуются наросты или деформируются ростки.

Для ленинградской популяции возбудителя рака картофеля не проводили определения патотипного состава, а также изучение агрессивности к набору сортов вследствие недостаточного количества инокулюма.

Изучали агрессивность популяций *S. endobioticum* к шести восприимчивым сортам картофеля: Лиза, Лорх, Полесский розовый, Тулунский, Альма и Свитанок киевский (с полевой устойчивостью). Для оценки агрессивности паразита при инокуляции в компосте и свежими раковыми наростами использовали по 10 клубней каждого сорта картофеля в трех повторностях.

Изучение генетической изменчивости популяций *S. endobioticum* проводили с использованием методов генотипирования RAPD (Williams et al., 1990) и УП-ПЦР (Булат, Мироненко, 1990, 1996).

Для выделения геномной ДНК использовали только свежие раковые наросты 20—30-суточного возраста, содержащие большое количество летних тонкостенных зооспорангиев. Выделение ДНК из раковых наростов и здоровых листьев картофеля проводили по известному методу с небольшими модификациями (Bulat et al., 1998).

Наличие ДНК паразита в образцах, полученных из раковых наростов, было доказано методом ПЦР с видоспецифичными для *S. endobioticum* праймерами. Праймеры были сконструированы ван ден Бугертом с соавторами (van den Boogert et al., 2005) для обнаружения спор паразита в почве. Для анализа были отобраны образцы ДНК раковых наростов, в которых были обнаружены диагностические для паразита продукты амплификации размером 472 пар оснований (п. о.). В ДНК здорового растения этот фрагмент отсутствовал.

Поскольку ДНК, выделенная из раковых наростов, состояла из ДНК растения-хозяина и паразита, для выявления продуктов амплификации ДНК паразита использова-

ли метод, практикуемый для исследования других внутриклеточных облигатных паразитов, таких как возбудитель килы капусты *Plasmiodiophora brassicae* (Graf et al., 2004). Праймеры, использованные в работе, приведены в табл. 1.

Аmplификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси: ($\times 1$) буфер, 0.1 mM каждого dNTP, 10 пмоль праймера, 0.5 ед. Taq ДНК-полимеразы, 10—50 нг ДНК.

Видоспецифичную ПЦР с праймерами F49 и R502 проводили по протоколу (van den Boogert et al., 2005).

Условия ПЦР со случайными праймерами следующие: денатурация ДНК при 93° — 45 с (в первом цикле денатурация проходила при 95° в течение 4 мин), отжиг праймеров при 37.5° — 45 с, синтез ДНК при 72° — 90 с (в последнем цикле синтез совершался при 72° в течение 10 мин). Всего было проведено 45 циклов.

Условия ПЦР с универсальными праймерами следующие: денатурация ДНК при 93° — 50 с (в первом цикле денатурация проходила при 95° в течение 4 мин), отжиг праймеров при 50° — 70 с, синтез ДНК при 72° — 60 с (в последнем цикле синтез проходил при 72° в течение 3 мин). Всего было проведено 30 циклов.

Для амплификации использовали термоциклер MyCycler™ (BIO-RAD). Разделение продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1.7%-х агарозных гелях, окрашенных бромистым этидием.

Считали, что присутствие (1) или отсутствие (0) продуктов амплификации соответствует двум аллельным состояниям одного локуса. Только полиморфные ПЦР-продукты амплификации у представителей анализируемых популяций, воспроизводимые в 2—3 повторностях, были использованы для генотипирования.

Результаты и обсуждение

Московская, украинская и белорусская популяции *S. endobioticum* были вирулентны к восприимчивым сортам Лорх, Полесский розовый, Альма и к сорту Свитанок киевский, имеющему полевую устойчивость. Симптомы поражения не развивались ни на одном из устойчивых тест-сортов, однако реакция на заражение различными популяциями восприимчивых сортов была неодинаковой. При заражении ростков картофеля в «компосте» все популяции *S. endobioticum* поражали восприимчивые сорта Лорх, Полесский розовый и Альма, но количество пораженных клубней сорта Альма для белорусской и украинской популяций составляло 10 и 50 % соответственно, в то время как для московской популяции не менее 80 %. Сорт Свитанок киевский поражали только московская и украинская популяции (80 и 70 % соответственно). Сорт Львовский белый, обладающий полевой устойчивостью, не поражала ни одна из популяций. Таким образом, белорусская популяция обладает самой слабой агрессивностью и при заражении ростков картофеля в «компосте» может успешно развиваться и образовывать наросты лишь на сортах Лорх и Полесский розовый.

При заражении ростков сортов-дифференциаторов от свежих раковых наростов *S. endobioticum* было установлено, что все образцы популяций относятся к первому (D1) патотипу. Как и в опыте с заражением в «компосте», все географические популяции паразита были вирулентны к восприимчивым сортам и к сорту с полевой устойчивостью Свитанок киевский, но были авирулентны ко всем остальным тест-сортам.

На относительно устойчивом сорте Львовский белый наросты не развивались после инокуляции образцами всех трех популяций паразита. Сорт Свитанок киевский, который не был поражен в «компосте» при инокуляции белорусской популяцией, при заражении ростков от свежих раковых наростов был поражен на 30 %, тогда как при инокуляции московской и украинской популяциями на 80 и 90 % соответственно. Таким образом, использование двух методов инокуляции картофеля возбудителем рака позволило определить, что все образцы популяций относятся к первому патотипу. Несмотря на это, реакция восприимчивых сортов при инокуляции образцами различных популяций была неодинаковой. Для выявления и определения наиболее агрессивной и вирулентной популяции первого (D1) патотипа была изучена агрессивность различ-

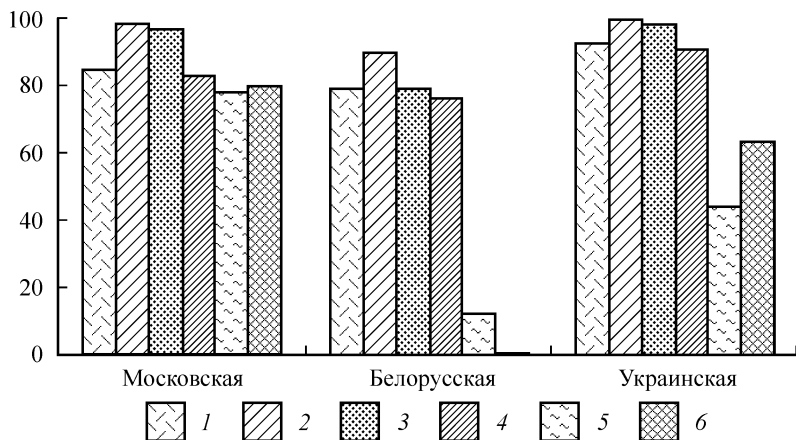


Рис. 1. Количество пораженных клубней при заражении ростков картофеля в «компосте», содержащем покоящиеся зооспорангии *S. endobioticum*.

По оси абсцисс — популяции: 1 — Лиза, 2 — Лорх, 3 — Полесский розовый, 4 — Тулунский, 5 — Альма, 6 — Свитанок киевский; по оси ординат — число пораженных клубней, %.

ных географических популяций к восприимчивым сортам картофеля (Лиза, Лорх, Полесский розовый, Тулунский, Альма) и сорту с полевой устойчивостью Свитанок киевский.

Наименьшее количество пораженных клубней было у сортов Альма и Свитанок киевский при заражении ростков картофеля в «компосте» белорусской (12 и 0 %) и украинской (42 и 62 %) популяциями соответственно. Восприимчивые сорта Лиза и Лорх были поражены на 80—99 % (рис. 1).

Средняя масса наростов, полученная при заражении клубней различными географическими популяциями *S. endobioticum*, была неодинаковой. Наибольшая масса наростов была получена на высоковосприимчивых сортах Лиза и Лорх независимо от популяции (рис. 2). При размножении ленинградской популяции в «компосте» на вос-

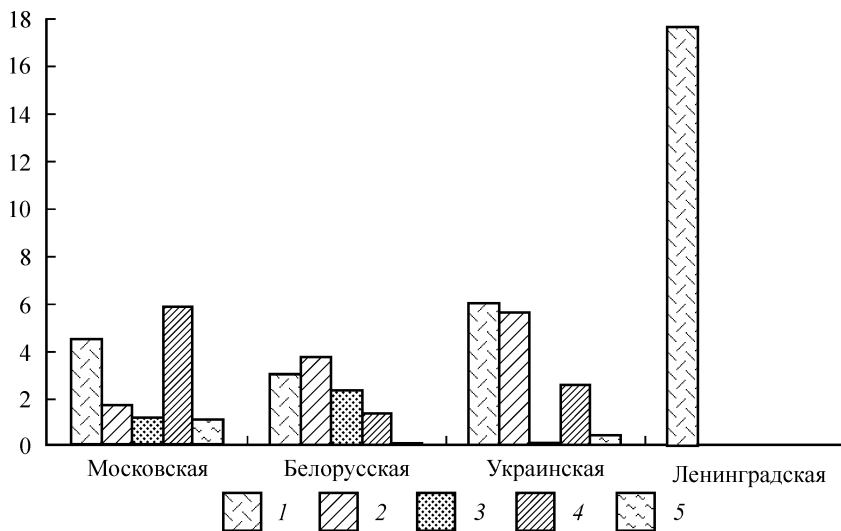


Рис. 2. Масса наростов, полученных при заражении ростков картофеля популяциями *S. endobioticum* в «компосте».

По оси абсцисс — популяции: 1 — Лиза, 2 — Лорх, 3 — Полесский розовый, 4 — Тулунский, 5 — Альма, 6 — Свитанок киевский; по оси ординат — масса наростов, г.

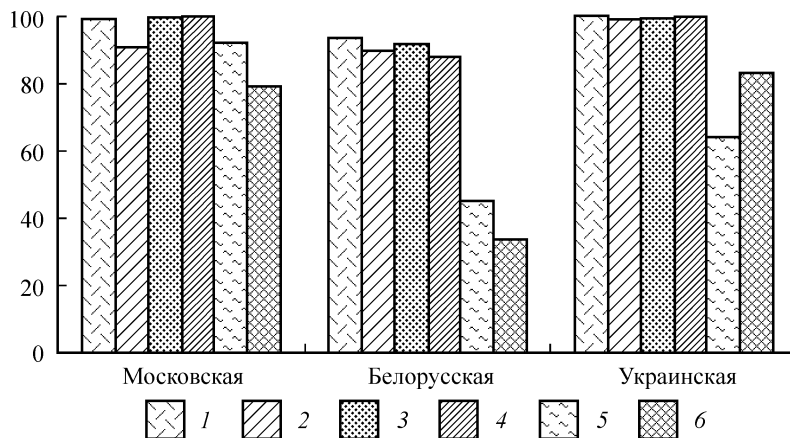


Рис. 3. Количество пораженных клубней при заражении ростков картофеля свежими раковыми наростами.

По оси абсцисс — популяции: 1 — Лиза, 2 — Лорх, 3 — Полесский розовый, 4 — Тулунский, 5 — Альяма, 6 — Свитанок киевский; по оси ординат — количество пораженных клубней, %.

приимчивом сорте Лиза в течение трех лет наблюдалось 100%-е поражение клубней, средняя масса наростов составляла 18 г, а отдельные достигали 70 г, что позволяет считать эту популяцию высокоагрессивной к данному сорту (рис. 2).

При заражении ростков восприимчивых сортов картофеля от свежих раковых наростов самая низкая агрессивность была отмечена также у белорусской популяции, которая достаточно слабо поражала восприимчивые сорта Альяма и Свитанок киевский (42 и 31 % соответственно) в отличие от московской (91 и 80 %) и украинской (62 и 83 %) популяций. Сорта Лиза, Лорх, Полесский розовый и Тулунский были поражены всеми популяциями не менее чем на 85 % (рис. 3).

Таким образом, географически отдаленные популяции возбудителя рака картофеля различаются по агрессивности, что необходимо учитывать при подборе инфекционного материала для оценки устойчивости образцов картофеля.

Протестирована способность ряда случайных и универсальных праймеров амплифицировать определенный участок генома паразита (табл. 1). Для дальнейшей работы были отобраны один универсальный (AS4) и три случайных (ОРА-09, ОРА-10, ОРИ-10) праймера, с помощью которых были получены продукты амплификации ДНК растения и паразита.

На рис. 4 приведен результат генотипирования образцов ДНК здоровых растений сорта Лиза и раковых наростов из двух популяций. Очевидно, что спектры амплифицированной ДНК раковых наростов очень сходны (или идентичны) со спектрами ДНК растения-хозяина. Только продукты амплификации раковых наростов, отсутствующие в «контрольных» спектрах ДНК здоровых растений, можно считать результатом амплификации ДНК паразита. Из четырех случайных праймеров только у одного (ОРА-09) был выявлен четкий полиморфный продукт амплификации, который отсутствовал в спектрах ДНК растений (рис. 4, образцы № 1 и 3). Этот фрагмент отсутствовал в спектре ДНК другого ракового нароста (дорожка 4) и может считаться полиморфным продуктом амплификации ДНК паразита.

В результате исследования образцов московской, ленинградской, белорусской и украинской популяций с четырьмя подобранными праймерами было получено 6 полиморфных ДНК фрагментов паразита, наличие или отсутствие которых характеризует генотип паразита, доминирующий в анализируемом наросте. В табл. 2 представлены суммарные данные генотипирования раковых наростов четырех образцов популяций паразита. Всего среди 38 взятых для анализа раковых наростов выявлено 19 генотипов.

Праймеры, использованные для амплификации ДНК *S. endobioticum*

| Наименование праймера | Последовательность | Ссылка |
|---|---------------------------------|---|
| Случайные праймеры | | |
| OPA-01 | 5'-CAg gCC CTT C-3' | Operon Technologies, Inc. (Alameda, CA) |
| OPA-08 | 5'-gTg ACg TAG g-3' | |
| OPA-09 | 5'-ggg TAA CgC C-3' | |
| OPA-10 | 5'-gTg ATC gCA g-3' | |
| OPB-11 | 5'-gTT TCg CTC C-3' | |
| OPI-9 | 5'-Tgg AgA gCA g-3' | |
| OPI-10 | 5'-ACA ACg CgA g-3' | |
| Универсальные праймеры | | |
| AS4 | 5'-TgT ggg CgC TCg ACA C-3' | Lubeck et al., 1999 |
| AS15inv | 5'-CAT TgC Tgg CgA ATC gg-3' | Bulat et al., 2000 |
| Видоспецифичные праймеры для <i>S. endobioticum</i> | | |
| F49 | 5'-CAA CAC CAT gTg AAC Tg-3' | Van den Boogert et al., 2005 |
| R502 | 5'-ACA TAC ACA ATT CgA gTT T-3' | |

Три генотипа (1G, 2G и 4G) встречались чаще, чем в одной популяции. Большинство генотипов оказалось уникальными для каждой популяции: в образце украинской популяции из 7 выявленных генотипов — 5, в Московской обл. из 3 генотипов — 2, в Ленинградской обл. из 11 генотипов — 9, в Белоруссии из 4 только один не встречался в других популяциях. Только в московской популяции выявлено доминирование одного уникального генотипа (11G), в остальных популяциях они были представлены единичными изолятами.

Полученные результаты позволяют утверждать существование генетических различий между индивидуумами паразита внутри популяции, а также различий между

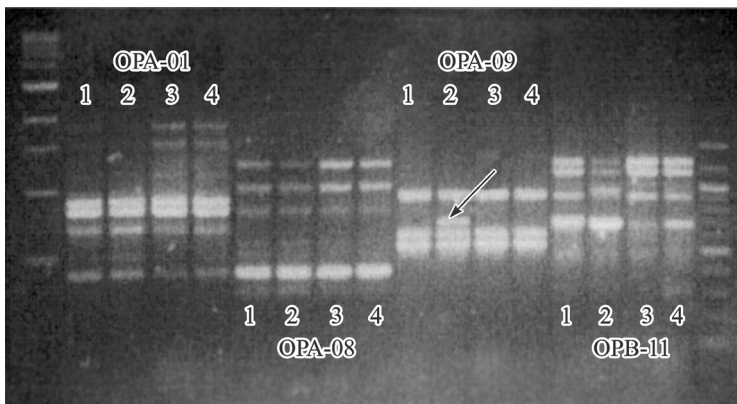


Рис. 4. Спектры ДНК растений картофеля и раковых наростов, полученные в результате амплификации со случайными праймерами.

Образцы ДНК: 1 — растение, 2 — раковый нарост из белорусской популяции, 3 — растение, 4 — раковый нарост из украинской популяции. Крайние «дорожки» — маркеры молекулярной массы. Стрелкой обозначен полиморфный ДНК фрагмент у образца из ракового нароста размером 700 п. о.

Встречаемость генотипов в образцах популяций *S. endobioticum* из Белоруссии, Украины, Московской и Ленинградской областей

| Гено-тип | Характеристика генотипов по наличию ПЦР-продуктов | | | | | | Число генотипов в образце популяции | | | |
|----------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|---|---|---|
| | ОРА-10 (750 п. о.) | ОРА-09 (700 п. о.) | ОРА-09 (730 п. о.) | ОПИ-10 (620 п. о.) | АС4 (600 п. о.) | АС4 (500 п. о.) | Б | У | М | Л |
| 1G | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | | 2 |
| 2G | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 3 | 1 |
| 3G | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | | | |
| 4G | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | | | 1 |
| 5G | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 1 | | |
| 6G | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 1 | | |
| 7G | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | | 1 | | |
| 8G | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | | 1 | | |
| 9G | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | | 1 | | |
| 10G | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | | | 1 | |
| 11G | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | | | 5 | |
| 12G | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | | | | 2 |
| 13G | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | | | | 1 |
| 14G | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | | | | 1 |
| 15G | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | 1 |
| 16G | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | 1 |
| 17G | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | | | | 1 |
| 18G | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | 1 |
| 19G | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | | | | 1 |

Примечание. Б — белорусская, У — украинская, М — московская, Л — ленинградская популяции; 1 — наличие ПЦР-продукта, 0 — его отсутствие.

популяциями. Различный сортимент возделываемого картофеля и почвенно-климатические условия являются факторами отбора наиболее приспособленных генотипов. Поскольку законодательство Российской Федерации разрешает возделывать устойчивые сорта в очагах рака, создаются условия для формообразовательных процессов, интенсивность которых будет тем выше, чем выше изменчивость природных популяций. В таких очагах существует потенциальная опасность возникновения новых патотипов с измененной вирулентностью и агрессивностью.

Данная работа является первой попыткой обнаружить генетическую изменчивость *S. endobioticum* внутри и между популяциями с использованием ДНК-маркеров. Несмотря на отсутствие отличий по вирулентности к набору сортов-дифференциаторов, образцы популяций из Московской обл., Белоруссии и Украины различались по агрессивности к 6 восприимчивым сортам картофеля. Эти популяции имели также существенные различия по генотипическому и патогинному составу. Для того чтобы проводить более детальные исследования генотипического и патогинного состава популяций в будущем, необходимы методические разработки для получения моноспоровых изолятов и поддержания генетически однородных линий паразита.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08-04-00447).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Анисимов Б. В. Сортовые ресурсы и качество семенного картофеля. М.: Наука, 2001. 140 с.
- Булат С. А., Мироненко Н. В. Видовая идентичность фитопатогенных грибов *Rylenophora teres* Drechsler. и *Rylenophora graminea* Ito and Kurib. // Микология и фитопатология. 1990. Т. 24. С. 435—441.
- Булат С. А., Мироненко Н. В. Идентификация грибов и анализ их генетической изменчивости методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с геноспецифичными и неспецифичными праймерами // Генетика. 1996. Т. 32, № 2. С. 165—183.
- Бондарь А. С. Внутривидовая неоднородность возбудителя рака картофеля // Защита растений. 1989. № 9. С. 36—37.
- Данченко М. И. Биологические особенности обычной расы возбудителя рака картофеля различного географического происхождения // Защита растений. Минск: Ураджай, 1989. Вып. 14. С. 32—35.
- Дмитрашук В. Е., Романюк О. П. Методы ракодиагностики // Защита растений. 1999. № 10. С. 39.
- Ламеко С. И., Толкачев Б. С. Усовершенствованная методика оценки картофеля на устойчивость к раку // IX Всесоюз. совещ. по иммунитету растений к болезням и вредителям. Минск: БелНИИНТИ, 1991. Т. 2. С. 229—230.
- Мельник П. А., Малахова Е. Л., Мовчан Н. А. Дополнение к международному тест-сортименту // Защита растений. 1999. № 5. С. 24—25.
- Методические указания по испытанию картофеля на ракоустойчивость / Сост. Л. П. Салтыкова, В. П. Тарасова. Л.: ВИР, 1982. 52 с.
- Распространение и по странам мира карантинных для СССР вредителей, болезней растений и сорняков. М.: Госагропром, 1987. 38 с.
- Салтыкова Л. П. Дифференциация патотипов возбудителя рака картофеля // Защита растений. 1988. № 11. С. 37—38.
- Тарасова В. П. Рак картофеля. Л.: Колос, 1978. 72 с.
- Шариков К. Е. О поражении раком различных представителей семейства пасленовых // Проблемы онкологии и тератологии растений (Итоговый сборник I Всесоюз. совещ. по проблеме патологических новообразований у растений). Л.: Наука, 1975. С. 398—399.
- Vaayen R. P., Cochijs G., Hendriks H., Meffert J. P., Bakker J., Bekker M., van den Boogert P. H. J. F., Stachewicz H., van Leeuwen G. C. M. History of potato wart disease in Europe — a proposal harmonization in defining pathotypes // *Europ. J. Plant Pathol.* 2006. Vol. 116. P. 21—31.
- Bulat S., Lubeck M., Mironenko N., Jensen D. F., Lubeck P. S. UP-PCR analysis and ITS1 ribotyping of strains of *Trichoderma* and *Gliocladium* // *Mycol. Res.* 1998. Vol. 102. P. 933—943.
- Bulat S. A., Lubeck M., Alekhina I. A., Jensen D. F., Knudsen I. M. B., Lubeck P. S. Identification of a universally primed — PCR — derived sequence-characterized amplified region marker for an antagonistic strain of *Clonostachys rosea* and development of a strain-specific PCR detection assay // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. Vol. 66. P. 4758—4763.
- Graf H., Fahling M., Siemens J. Chromosome polymorphism of obligate biotrophic parasite *Plasmodiophora brassicae* // *J. Phytopathology.* 2004. Vol. 152. P. 86—91.
- Hampson M. C., Haard N. F. Pathogenesis of *Synchytrium endobioticum*: Infector responses in potato and tomato // *Can. J. Plant Pathol.* 1980. Vol. 2. P. 143—147.
- Hampson M. C. Sequence of events in the germination of the resting spore of *Synchytrium endobioticum*, European pathotype 2, the causal agent of potato wart disease // *Can. J. Plant Pathol.* 1986. Vol. 64. P. 2144—2150.
- Laidlaw W. M. R. A method for the detection of the resting sporangia of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in the soil of old outbreak sites // *Potato Res.* 1985. N 28. P. 223—232.
- Lubeck M., Alekhina I. A., Lubeck P. S., Jensen D. F., Bulat S. A. Delineation of *Trichoderma harzianum* into two different genotypic groups by a highly robust fingerprinting method, UP-PCR, and UP-PCR product cross-hybridisation // *Mycol. Res.* 1999. Vol. 103. P. 289—298.

O E P P / E P P O. EPPO Standards PM 7/28. Diagnostic protocols for regulated pests: *Synchytrium endobioticum* // Bull. OEPP/EPPO. 2004. Vol. 34. P. 213—218.

Potoček J., Krajičková K., Klábzubová S., Krejcar Z., Hnízdil M., Novák F., Perlová V. Identification of new *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. pathotypes in Czech Republic // Ochrana Rostlin. 1991. Vol. 27. P. 191—205.

Stachewicz H., Langerfeld E. *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc.: Zur Geschichte des Kartoffelkrebses in Deutschland // Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin; Dahlem, 1998. H. 335. S. 39.

Van den Boogert P. H. J. F., Gent-Pelzer M. P. E., Bonants P. J. M., De Boer S. H., Wander J. G. N., Levesque C. A., van Leeuwen G. C. M., Baayen R. P. Development of PCR — based methods for the quarantine phytopathogen *Synchytrium endobioticum*, causal agent of potato wart disease // Europ. J. Plant Pathol. 2005. Vol. 113. P. 47—57.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucl. Acids Res. 1990. Vol. 18. P. 6531—6535.

ВИИИ защиты растений
Санкт-Петербург
nina2601mir@mail.ru

Поступила 19 V 2009

РЕЗЮМЕ

Методом молекулярного генотипирования (ПЦР со случайными и универсальными праймерами) изучили генотипическую изменчивость образцов популяций возбудителя рака картофеля *Synchytrium endobioticum* из Московской и Ленинградской областей, Белоруссии и Украины. Подобраны один универсальный и три случайных праймера, с помощью которых выявлены различия между образцами ДНК раковых наростов и здоровой тканью растения-хозяина. Обнаружена генотипическая изменчивость внутри и между популяциями паразита, несмотря на то что все образцы популяций возбудителя рака картофеля были отнесены к первому патотипу.

Ключевые слова: *Synchytrium endobioticum*, географические популяции, вирулентность, агрессивность, ДНК-маркеры.

SUMMARY

Genetic variability of populations of *Synchytrium endobioticum* isolated from Moscow and Leningrad regions, Byelorussia and Ukraine was studied by RAPD and UP-PCR analyses. There were selected three random and one universal primers which can distinguish DNA of potato warts and healthy potato. In spite of all four population samples of *S. endobioticum* were tested as pathotype 1 (1D) we found genotypic variability inside and between populations of pathogen.

Key words: *Synchytrium endobioticum*, geographic populations, virulence, aggressiveness, DNA-markers.