

УДК 633.854.78:581.2:577.15

АНАЛИЗ ИЗОФЕРМЕНТОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ВНУТРИВИДОВОГО ПОЛИМОРФИЗМА ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛОЖНОЙ МУЧНИСТОЙ РОСЫ ПОДСОЛНЕЧНИКА*

С.З. ГУЧЕТЛЬ, Т.С. АНТОНОВА, Н.М. АРАСЛАНОВА, Т.А. ЧЕЛЮСТНИКОВА, М.В. ИВЕБОР, С.А. РАМАЗАНОВА

Оптимизировали условия электрофореза в горизонтальном крахмальном геле применительно к изоферментам возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni) и оценивали степень изоферментного полиморфизма у разных рас популяции.

Ключевые слова: ложная мучнистая роса, подсолнечник, *Plasmopara halstedii*, расы, изоферменты, полиморфизм.

Интенсификация сельского хозяйства является многофакторной причиной образования разновидностей и физиологических рас патогенных грибов — возбудителей болезней сельскохозяйственных растений. Новые расы грибов возникают в результате гибридизации, мутаций, гетерокариозиса и т.д. Расообразование ускоряется при нарушении сроков севооборота культуры, интродукции инфицированного семенного материала. Увеличение в процессе селекции количества генетически разнородных сельскохозяйственных культур создает экологические ниши для образовавшихся физиологических рас патогена, идентификация и дифференциация которых остается актуальной и достаточно трудной задачей при селекции устойчивых сортов. Это относится и к возбудителю ложной мучнистой росы подсолнечника.

Ложная мучнистая роса (ЛМР) является одним из наиболее вредоносных и распространенных в мире заболеваний подсолнечника. Возбудитель этой болезни — гриб *Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni относится к классу *Oomycetes* (порядок *Peronosporales*, сем. *Peronosporaceae*). По разным сведениям, у него насчитывается от 11 до 17 рас, паразитирующих на растениях подсолнечника (1, 2). В регионах Северного Кавказа к настоящему времени обнаружено семь рас (3). Идентификация рас этого патогена осуществляется с помощью тест-набора линий-дифференциаторов, которые с 2000 года используются как международный стандарт для определения патотипов возбудителя ЛМР (4). При этом не всегда удается четко дифференцировать некоторые патотипы патогена, выявить связь между ними, обнаружить внутрисовую изменчивость, обусловленную накоплением признаков адаптации к генетическим изменениям хозяина.

В последние годы проблема идентификации и наблюдения эволюционных изменений у патогенных грибов успешно решается с помощью белковых и ДНК-маркеров (5-7). Лебедева для сравнения «ячменных» и «ржаных» изолятов *R. secalis* использовала анализ шести изоферментных систем и один RAPD-праймер (8). Для 20 изолятов *Rhizoctonia solani* подгрупп AG1-1A и AG1-1B исследование 15 изоферментных систем подтвердило деление образцов на соответствующие группы (9). Komjati с соавт. анализировали две изоферментные системы при изучении природы локальных популяций *P. halstedii* на территории Венгрии и прилегающей к ней части Сербии (10). В основном полевые изоляты изученных ими рас оказались гомозиготными и мономорфными по этим биохимическим признакам.

Целью нашей работы была оптимизация условий для электрофоретического разделения изоферментов возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника в горизонтальном крахмальном геле и оценка степени их полиморфизма у разных рас.

Методика. Для выявления внутривидовых различий *P. halstedii* мы анализировали 41 изолят четырех рас: 330, 700, 710 и 730 — соответственно 19, 1, 8 и 13 изолятов, собранных с пораженных растений подсолнечника разных сортов в различных районах Краснодарского края в 2004–2006 годах (табл. 1). Расовую принадлежность изолятов определяли в соответствии с номенклатурой, предложенной Tourvielle de Labrouhe с соавт. (4). Искусственное заражение растений подсолнечника линиями-дифференциаторов осуществляли по общепринятой методике погружением корней проростков в инокулюм зооспор (11).

1. Изоляты рас возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника (*Plasmopara halstedii*), использованные в эксперименте

№ изолята	Раса	Место сбора	Сортообразец-хозяин	Дата сбора изолята
1	330	Краснодар, селекционное поле ВНИИМК	Селекционный образец 1	9.03.05
2	330	То же поле	Селекционный образец 2	9.03.05
3	330	То же поле	Селекционный образец 3	07.06.06
4	330	То же поле	Селекционный образец 4	06.06.06
5	330	То же поле	Селекционный образец 5	9.06.04
6	330	То же поле	ВК 680	30.05.05
7	330	Каневской р-н, колхозное поле	Флагман	16.05.05
8	330	Каневской р-н, фермерское поле	Мастер	16.05.05
9	330	Каневской р-н, поле 1	Арена	17.05.05
10	330	То же поле	Арена	17.05.05
11	330	Каневской р-н, станица Новоминская, Албаши	Родник	16.05.05
12	330	Станица Выселки	Родник	27.06.05
13	330	То же поле	Родник	27.06.05
14	330	Краснодар, демонстрационное поле ВНИИМК	Не известен	22.06.05
15	330	То же поле	Не известен	22.06.05
16	330	То же поле	ВК 678	22.06.05
17	330	То же поле	ВК 678	19.06.06

* Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ и Администрации Краснодарского края (грант № 06-04-96641).

18	330	То же поле	ВК 678	19.06.06
19	330	То же поле	ВК 678	19.06.06
20	700	Станица Выселки, поле 1	PR64F83	27.06.04
21	710	Не известно	Гибрид	27.05.05
22	710	Станица Выселки, поле 1	PR64F83	27.06.04
23	710	Станица Выселки	Родник	27.06.05
24	710	То же поле	Родник	27.06.05
25	710	То же поле	Родник	27.06.05
26	710	То же поле	Родник	27.06.05
27	710	То же поле	Родник	27.06.05
28	710	То же поле	Родник	27.06.05
29	730	Не известно	Гибрид	27.05.05
30	730	Краснодар, демонстрационное поле ВНИИМК	ВК 678	22.06.05
31	730	Краснодар, селекционное поле ВНИИМК	Родник	27.06.05
32	730	Станица Выселки	Родник	27.06.05
33	730	То же поле	Родник	27.06.05
34	730	То же поле	Родник	27.06.05
35	730	То же поле	Родник	27.06.05
36	730	То же поле	Родник	27.06.05
37	730	То же поле	Родник	27.06.05
38	730	То же поле	Родник	27.06.05
39	730	То же поле	Родник	27.06.05
40	730	То же поле	Родник	27.06.05
41	730	То же поле	Родник	27.06.05

Конидиальное спороношение было собрано с семядольных листьев проростков восприимчивого сорта подсолнечника ВНИИМК 8883, искусственно зараженных зооспорами изолята. Материал (2-5 мкг) гомогенизировали вручную стеклянным пестиком в плексигласовых лунках в 20 мкл 0,1 М трис-НСl буфера с добавлением 0,1 % поливинилпирролидона. Изоферменты патогена экстрагировали погружением в гомогенат кусочков ватмана 3ММ.

В лаборатории иммунитета и электрофореза Всероссийского НИИ масличных культур (ВНИИМК) для анализа изоферментов подсолнечника применяется электрофорез в крахмальном геле (12). Эта методика была оптимизирована для разделения изоферментов *P. halstedii*. Сравнивались 13 изоферментных систем: эстераза (EST, К.Ф. 3.1.1.1), аспартаминотрансфераза (ААТ, К.Ф. 2.6.1.1), глутаматдегидрогеназа (GDH, К.Ф. 1.4.1.2), кислая фосфатаза (АСР, К.Ф.3.1.3.2), супероксиддисмутаза (SOD, К.Ф. 1.15.1.1), лейцинаминопептидаза (LAP, К.Ф. 3.4.11.1), шикиматдегидрогеназа (SKDH, К.Ф. 1.1.1.25), алкогольдегидрогеназа (ADH, К.Ф. 1.1.1.1), малатдегидрогеназа (MDH, К.Ф. 1.1.1.37), глюкозофосфатдегидрогеназа (GPI, К.Ф. 5.3.1.9), фосфоглюкомутаза (PGM, К.Ф. 2.7.5.1), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6PGD, К.Ф. 1.1.1.44), малик-энзим (ME, К.Ф.1.1.1.40).

Электрофорез выполняли в 13 % горизонтальном крахмальном геле с добавлением 2,04 % сахарозы. Гелевые и электродные буферные системы подбирали экспериментально. Процедуру проводили в трех буферных системах для сравнения степени разрешения при разделении белковых продуктов изоферментных локусов (табл. 2).

Продолжительность электрофореза 6-7 ч при постоянной силе тока 45 мА и переменном напряжении 50-70 В. После электрофореза гелевую пластину разрезали тонкой нихромовой нитью на 5-6 частей. Зоны энзиматической активности выявляли гистохимическим окрашиванием по стандартным прописям Vallejos (13).

Результаты. Из буферных систем, использованных при электрофоретическом разделении ферментов, оптимальной для SOD оказалась буферная система I, для АСР, MDH, GPI, PGM, 6PGD, ME, EST — III.

2. Характеристика активности изоферментов возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника (*Plasmopara halstedii*) при электрофоретическом разделении в различных буферных системах

Буферная система*	Состав буфера		Изофермент	Ферментативная активность
	гелевого	электродного		
I	0,045 М Trizma base 0,001 М ЭДТА 0,025 М борная кислота рН 8,6 (доводится HCl)	0,3 М борная кислота 0,1 М гидроксид натрия рН 8,6	EST	+
			ААТ	—
			GDH	—
			АСР	+
			SOD	+
			LAP	—
			SKDH	—
			ADH	—
			EST	+
			АСР	+
II	0,009 М L-гистидин 0,004 М лимонная кислота · Н ₂ O рН 5,7	0,065 М L-гистидин 0,03 М лимонная кислота · Н ₂ O рН 5,7	ADH	—
			EST	+
			АСР	+
			ADH	—
			MDH	+
			GPI	+
			PGM	+
			6PGD	+
III	0,009 М L-гистидин 0,003 М лимонная кислота · Н ₂ O рН 6,1	0,065 М L-гистидин 0,02 М лимонная кислота · Н ₂ O рН 6,1	ME	+
			EST	+
			АСР	+
			ADH	—
			MDH	+
			GPI	+
			PGM	+
			6PGD	+
			ME	+

* Модифицированные буферные системы: I — Портера (14); II, III — Cardy с соавт. (15).

У LAP, ADH, SKDH, ААТ, GDH не проявилась энзиматическая активность (см. табл. 2). Таким образом, из 13 изоферментов, выбранных для оценки различий между изолятами *P. halstedii*, лишь восемь сохраняли активность при электрофоретическом разделении.

Полиморфизм электрофоретических спектров был обнаружен по одному изоферменту — эстеразе (EST). Эстераза возбудителя ЛМР на электрофореграммах была представлена двумя зонами ферментативной активности. Мы обозначили их римскими цифрами (II, I) в порядке увеличения электрофоретической подвижности изоферментов по направлению к аноду (рис.).

Электрофоретические спектры эстеразы у изолятов возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника (*Plasmopara halstedii*) рас 730 (1, 2, 3, 4), 710 (5, 7, 8) 700 (6) и 330 (9, 10, 11, 12): 1, 3, 6, 7, 9, 10, 11, 12; 4 и 2, 5, 8 — соответственно фенотип EST 1-FF; EST 1-SS и EST 1-FS. I и II — зоны ферментативной активности.

В зоне II на всех электрофореграммах регистрировали одну мономорфную фракцию. В зоне I у разных изолятов было выявлено три типа изоферментных спектров — два однополосных и один двухполосный. Однополосные спектры, имеющие меньшую электрофоретическую подвижность изоферментов по направлению к аноду, мы обозначили как EST 1-SS (slowly), большую подвижность — как EST 1-FF (fast), а двухполосные — EST 1-FS. Подобная аббревиатура была принята нами ранее при изучении полиморфных изоферментных вариантов подсолнечника (12). Поскольку эстераза мономерна, появление двухполосных спектров свидетельствует о гибридном характере изоформ. Все исследованные изоляты рас 330 и 700 были мономорфными и имели фенотип EST 1-FF. Полиморфизм эстеразы наблюдался среди изолятов рас 710 и 730.

Из восьми изолятов расы 710 пять (с разных полей и разных хозяйев) были гомозиготными и имели фенотип EST 1-FF, а три (с одного поля и одного хозяина) — гетерозиготными (EST 1-FS) (№№ 25, 27, 28) (см. табл. 1). Из 13 изолятов расы 730 десять (преимущественно с одного поля и одного хозяина — растения подсолнечника сорта Родник) имели фенотип EST 1-FF, а два были гетерозиготными — EST 1-FS (№№ 38 и 40, станица Выселки) (см. табл. 1). В то же время аллозимный вариант EST 1-SS не был выявлен в выборке изолятов с этого поля, однако он был обнаружен у изолята № 30 (см. табл. 1) с другого хозяина (ВК 678) и другого поля — в Краснодаре на расстоянии около 140 км от станицы Выселки.

При анализе семи изоферментных систем (ACP, MDH, GPI, PGM, bPGD, ME, SOD) нам не удалось выявить полиморфизм у исследованных изолятов. Комjати с соавт., изучавшие субпопуляции возбудителя ЛМР в Венгрии и Сербии методом целлюлозно-ацетатного гель-электрофореза изоферментов, обнаружили полиморфизм по GPI и PGM (10). Редкие контрастные аллозимные варианты GPI 100/113 и PGM 90/90 (обозначения авторов) встречались там с 1993 по 2000 годы преимущественно у изолятов рас 100 и 700. Возможно, отсутствие полиморфизма по этим изоферментам в нашей коллекции объясняется ограниченным генотипическим разнообразием растений-хозяев и редкой встречаемостью рас 100 и 700 на территории Краснодарского края, что не позволило использовать достаточную выборку изолятов этих патотипов. Кроме того, изучение рас патогена на Северном Кавказе началось сравнительно недавно, коллекция изолятов была собрана с 2004 по 2006 годы. Не исключено также, что альтернативные аллозимные варианты этих изоферментных систем присутствовали у рас, но в ходе естественного отбора произошла их элиминация. Косвенным подтверждением такого предположения является то, что контрастными аллозимами обладали «старые» венгерские расы 100 и 700.

Результаты нашей работы показывают, что популяция возбудителя ЛМР Краснодарского края характеризуется слабой внутривидовой вариабельностью по изученным изоферментам. Аналогичные результаты были получены авторами, анализировавшими молекулярно-генетическую структуру популяций этого патогена в других странах (10, 16). Охарактеризованные нами изоляты оказались полиморфными лишь по одной изоферментной системе. Но даже по этому признаку не было выявлено существенных различий между расами, поскольку преобладающим аллозимным вариантом являлся EST 1-FF, встречающийся у 85 % всех изученных изолятов четырех рас. Гетерозиготным фенотипом EST 1-FS обладали 12 % изолятов, у одного изолята (3 %) был обнаружен аллозим EST 1-SS.

Наличие альтернативных аллозимных вариантов у изолятов одной расы свидетельствует о внутривидовой изменчивости *P. halstedii*. Комjати с соавт. предполагают, что гетерозиготные фенотипы изолятов возникают из-за возможного загрязнения одного изолята зооспорами другого (10). В нашем случае, когда в коллекции преобладал аллозим EST 1-FF, а контрастный ему EST 1-SS встречался всего один раз, гетерозиготный фенотип скорее всего не результат смешения зооспор, содержащих разный генетический материал, а истинная гетерозиготность патотипа. Мы имеем дело с физиологическими расами, которые, обладая одним и тем же набором генов вирулентности, могут быть гетерогенными по другим локусам. Наличие гетерозиготных фенотипов также свидетельствует о том, что при естественном расообразовании возможна гибридизация рас с разными генетическими характеристиками.

Таким образом, нами показано, что популяция возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника в Краснодарском крае имеет низкую внутривидовую вариабельность по изученным изоферментам. Существует внутривидовой полиморфизм по изоферменту эстеразе у рас 710 и 730. Для выявления внутривидовой изменчивости *Plasmopara halstedii*,

поражающей растения подсолнечника, метод электрофореза изоферментов в крахмальном геле применен впервые. Анализ изоферментов может служить надежным средством наблюдения за эволюцией этого патогена. Изменение частоты аллозимных вариантов у рас и появление вариантов, ранее не наблюдававшихся, будет сигнализировать о накоплении генетической изменчивости и возникновении новых, возможно, более вирулентных патотипов возбудителя.

ЛИТЕРАТУРА

1. Veat F., Tourvieille de Labrouhe D., Miller J.F. Inheritance of the wide-range downy mildew resistance in the sunflower line RHA 419. *Helia*, 2003, 26, 39: 19-24.
2. Viranyi F. Downy mildew research in sunflower: facts and consideration (based on reports of to the FAO sub-group, *Plasmopara halstedii* for 1999-2001). FAO Technical Meeting, 7-9.10.2002, ENSAM-INRA, Montpellier, France, 2002: 10-15.
3. Ивевор М.В., Антонова Т.С. Популяция возбудителя ложной мучнистой росы подсолнечника на Северном Кавказе. В сб.: Современные проблемы научного обеспечения производства подсолнечника. Краснодар, 2006: 105-109.
4. Tourvieille de Labrouhe D., Gulya T.J., Rashid Y.K. e.a. New nomenclature of race of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). In: 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France, 2000, 2: 161-166.
5. Shepherd S.J., Van West P., Gow N.A.R. Proteomic analysis of asexual development of *Phytophthora palmivora*. *Micol. Res.*, 2003, 107, 4: 395-400.
6. Ваконьи J., Ладау М., Дула Т. e.a. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Hungary. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2002, 108, 2: 139-146.
7. 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, 32, 2: 165-183.
8. Лебедева Л.В. Специализация гриба *Rhynchosporium secalis* (Oud.) J.J. Davis, паразитирующего на ячмене. *Мат. Второго Всерос. съезда по защите растений*. СПб, 2005, I: 496-498.
9. Мохаммади М., Ванихашиме М., Неджаруде Г.-А. e.a. Genetic diversity among Iranian isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn. anastamosis 1 subgroups based on isozyme analysis and total soluble protein pattern. *J. Phytopathol.*, 2003, 151, 3: 162-170.
10. Комжати Н., Ваконьи J., Viranyi F. Isoenzyme analysis: a tool for characterizing subpopulations of *Plasmopara halstedii*. In: Proc. 16th International Sunflower Conference. Fargo, North Dakota, USA, 2004, 1: 93-97.
11. Антонова Т.С., Арасланова Н.М., Головин А.В. и др. К вопросу о расовой принадлежности возбудителя ложной мучнистой росы на подсолнечнике на Северном Кавказе. *Науч.-техн. бюл. ВНИИМК*, 2000, 123: 16-20.
12. Туркав С.З., Лоскутов А.В., Губенко Т.П. Оценка генетической чистоты линий и гибридов подсолнечника с помощью изоферментных маркеров. *Науч.-техн. бюл. ВНИИМК*, 1996, 117: 33-37.
13. Vallejos С.Е. Enzyme activity staining. In: *Isozymes in plant genetics and breeding: Part A*. Amsterdam, Elsevier, 1983: 469-516.
14. Левитес Е.В. Генетика изоферментов растений. Новосибирск, 1986.
15. Cardy B.S., Stuber C.W., Goodman M.M. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes for maize (*Zea mays* L.). North Carolina State Univ., 1981.
16. Roessel-Drevet P., Tourvieille J., Gulya T.J. e.a. Molecular variability of sunflower downy mildew, *Plasmopara halstedii* from different continent. *Can. J. Microbiol.*, 2003, 49(8): 492-502.

ГНУ Всероссийский НИИ масличных культур
им. В.С. Пустовойта,
350038 г. Краснодар, ул. Филатова, 17,
e-mail: vniimk-center@narod.ru

Поступила в редакцию
19 февраля 2007 года

ANALYSIS OF ISOENZYMES DURING THE RESEARCH OF INTRASPECIFIC POLYMORPHISM IN SUNFLOWER DOWNY MILDEW

S.Z. Guchel', T.S. Antonova, N.M. Araslanova, T.A. Chelyustnikova, M.V. Ivebor, S.A. Ramazanova

Summary

The authors optimized the horizontal starch gel electrophoresis method in conformity with isoenzymes of sunflower downy mildew (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl. et de Toni) in Krasnodar region. The analysis of intraspecific variability in *P. halstedii* by means of ACP, MDH, GPI, PGM, 6PGD, ME, EST, GOT isoenzymatic systems was made. It was shown that interracial differences on esterase are inessential. The seven others isoenzymatic systems are monomorphous for all studied isolated races 330, 700, 710, 730. The population of sunflower downy mildew in Krasnodar region has low intraspecific variability on studied isoenzymatic spectrums.