

МОНИТОРИНГ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ ЗАРАЗИХИ, ПОРАЖАЮЩЕЙ ПОДСОЛНЕЧНИК В РАЗНЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКИХ РЕГИОНАХ

Гучетль С.З.¹, канд. биол. наук, Антонова Т.С.¹, доктор биол. наук
Челюстникова Т.А.¹, Шерстова Л.Ю.²

¹ФГБНУ «Всероссийский научно - исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта», г. Краснодар

²ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», г. Краснодар

Аннотация: Изучали расовый состав и молекулярно-генетические различия популяций *O. cumana*, поражающей подсолнечник в разных географических регионах. Показано, что генетическая изменчивость популяций заразихи, как российских, так и зарубежных, небольшая, что свидетельствует о консервативности её генома.

Ключевые слова: заразиха, популяции, подсолнечник, молекулярные маркеры.

Злостный сорняк заразиха кумская (*Orobanche cumana* Wallr.) – облигатный паразит из высших цветковых травянистых растений, принадлежащий к семейству *Orobanchaceae* из порядка *Scrophulariales* - основной биотический сдерживающий фактор при производстве подсолнечника во всех странах, где он возделывается, за исключением Северной и Южной Америки. Потери урожая, вызванные засоренностью полей заразихой, достигают от 50 % до 100 %. Повсеместная интенсификация возделывания подсолнечника в последнее десятилетие привела к формированию высоковирулентных биотипов заразихи, преодолевших устойчивость возделываемого сортифта [1]. Одним из основных способов контроля паразита является создание устойчивых сортов и гибридов подсолнечника. Этот подход способствует решению экологических проблем при защите подсолнечника, поскольку позволяет обойтись без применения химических мер борьбы и ограничивает распространение заразихи на новые территории. Для выработки долгосрочной стратегии контроля важны исследования эволюции *O. cumana* и генетической структуры его популяций [1-3]. Исследование расового состава популяций и полиморфизма молекулярно-генетических маркеров позволяет описать структуру популяций заразихи. Изучение молекулярно-генетических различий между популяциями *O. cumana* из Болгарии, Испании, Румынии и Турции показало, что популяции паразита обладают малой внутривидовой изменчивостью, и между индивидами из различных географических областей происходит очень небольшой генный обмен [4]. Выявлено существование двух отдаленных генофондов в двух провинциях в Испании - одного в Куэнка и другого в Долине Гвадалквивира. Внутри каждого генофонда, как меж - так и внутривидовая изменчивости были чрезвычайно малы [5].

Молекулярно-генетические различия популяций *O. cumana*, поражающей подсолнечник в разных регионах России недостаточно изучены. Целью нашего исследования является определение расового состава и молекулярно-генетического разнообразия популяций заразики, распространенной на территории России, Румынии и Казахстана для мониторинга изменчивости паразита.

В качестве материала исследований использовали семена *O. cumana* 31 популяции, которые были собраны в 2003 - 2014 гг. на полях подсолнечника Краснодарского, Ставропольского краёв, Ростовской, Волгоградской и Саратовской областей России, а также Румынии и Казахстана.

Для искусственного заражения заразой растения подсолнечника сорта, восприимчивого ко всем известным расам заразики, выращивали в теплице в смеси почвы с речным песком в соотношении 2 : 1. Семена заразики вносили в почвенную смесь из расчёта 100 мг на 1 кг. Через 50 дней после появления всходов растения выкапывали из ящиков и отбирали клубеньки, стебли и соцветия заразики для анализа. В качестве образца для выделения ДНК использовали смесь равного количества ткани от 5-10 растений заразики из каждой популяции. Выделение и очистку ДНК проводили СТАБ методом [6].

Для проведения полимеразной цепной реакции, электрофореза продуктов амплификации, визуализации результатов электрофореза использовали методику, описанную в работе [7]. Использовали 9 SSR (simple sequence repeat) праймеров. Для определения различий между образцами заразики данные ПЦР были обработаны кластерным анализом, методом Ward (пакет программ Statistica 6.0). Геометрические дистанции вычислены с помощью Евклидова расстояния. Основные показатели генетической изменчивости популяций, а также анализ молекулярной вариации AMOVA (Analysis of Molecular Variance), генетические дистанции и генетическое сходство по Нею определяли с помощью программы GenAlEx 6.5 [8].

Для каждого изучаемого варианта были определены расы, преобладающие в образце семян. Наименее вирулентная раса С была выявлена в образце семян заразики, собранного в Шемонаихинском районе Казахстана. Раса D была обнаружена в Румынии, в области Урзицени. В остальных районах Румынии присутствовала лишь раса G. Раса E встречалась в окрестностях станицы Привольная Ейского района Краснодарского края, в 2003 году, а также в образце семян, собранных в Ростовской области, в разных местах Азовского района и в Советском районе Саратовской области. В них присутствовали также расы F и G. В остальных популяциях преобладали расы F и G. В образцах семян из Новоалександровска (Ставропольский край) кроме выше указанных рас, встречалась и раса H. В целом, расовый состав семян заразики из разных популяций отличался разнообразием.

В результате амплификации девяти микросателлитных локусов у заразики из 31 популяции был выявлен 21 аллель, от 2 до 4 аллелей на локус.

По результатам кластерного анализа образцы *O. cumana* были разделены на две группы (рис. 1). Кластер I группировал 26 образцов, собранных на территориях России и Казахстана. Кластер II объединил популяции заразики, соб-

ранные в разных районах Румынии. Кластер I подразделялся на 2 субкластера, с расстоянием объединения 7,8 единиц. Объединение в субкластеры не зависело ни от уровня вирулентности популяции, ни от географического происхождения. Группирование популяций заразики в кластеры также не зависело от их расового состава. Оно было связано с их происхождением из стран бывшего СССР и Румынии. Генетическая дистанция и сходство между кластерами по методу Ней составили соответственно 0,175 и 0,839.

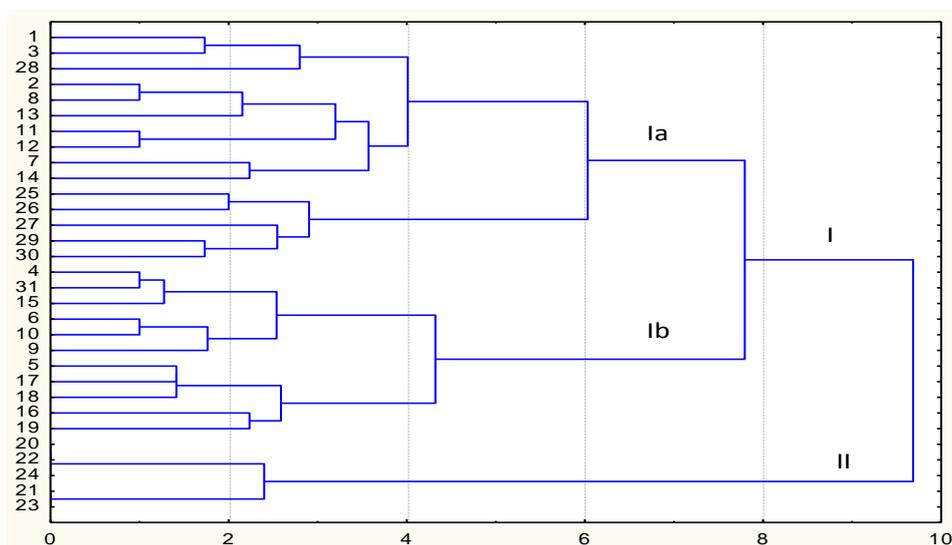


Рисунок 1. Дендрограмма кластерного анализа 31 популяции *O. citrana*, собранных в разных районах России, Казахстана и Румынии. Нумерация районов: Краснодарский край: 1- Крыловской; 2 –Ейский, поле 1; 26 – Ейский, поле 2. Ставропольский край: 3-Труновский; 27- Новоалександровск; Ростовская область: 4 –Азовский, поле 1; 5 - Милютинский; 6 - Азовский, с. Круглое; 7 - Боковский; 8-Зерноградский; 9-Матвеево-Курганский, поле 1; 10- Матвеево- Курганский, поле 2; 11- Боковский, поле 1;12- Боковский, поле 2; 13, 14- Зерноградский, поле 1, 2; 15, 25 – Кагальницкий, поле 1,2; 28, 29-Морозовский поле 1, 2; 30, 31- Азовский, поле 3, 4. Саратовская область: 16 - Советский; Волгоградская область: 17-Алексеевский; 18- Новоаннинский. Казахстан: 19- Шемонаихинский. Румыния: 20-Меджидия; 21- Калараси; 22- Тулчае; 23- Урзицени; 24-Лунка.

Образцы заразики из Румынии были практически идентичны. Процент полиморфных локусов P составил 11,11. Процент полиморфных локусов популяций, происходящих из России и Казахстана - 100,00.

Для определения основных показателей генетического разнообразия и анализа молекулярной вариации AMOVA, изучаемые популяции *O. citrana* были объединены в генетические пулы по географическому происхождению, Pop 1 - из России и Казахстана, Pop 2 – из Румынии. Основные показатели генетической изменчивости двух пулов показали, что число аллелей на локус N_a колебалось от 1.11 у Pop2 до 2.33 у Pop1. Число аллелей на локус с частотой $N_a > 5\%$ составляло от 1.11 у Pop2 до 2.22 у Pop1. Эффективное число аллелей N_e составило 1.05 у Pop 2 и 1.90 у Pop 1. Pop 1 показала самое высокое значение наблюдаемой гетерозиготности H_o (0.48), в то время как у Pop 2 наблюдаемая

гетерозиготность составила 0.05. Значения ожидаемой гетерозиготности *He* колебались от 0.03 у Pop2 до 0.46 у Pop1. Анализ генетического разнообразия внутри генетических пулов с использованием информационного индекса Шеннона *I* выявил наибольшую величину разнообразия в Pop1 (0.69) и наименьшую в Pop 2 (0.05) (табл. 1).

Таблица 1

Основные показатели генетического разнообразия двух пулов заразики, выявленные с помощью девяти микросателлитных локусов ДНК

Генетические пулы	<i>Na</i>	<i>Na (Freq > 5%)</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Pop1	2,33±0,23	2,22±0,22	1,90±0,09	0,69±0,05	0,48±0,06	0,46±0,02
Pop2	1,11±0,11	1,11±0,11	1,05±0,05	0,05±0,05	0,04±0,04	0,03±0,03

Na: число аллелей на локус; *Na (Freq >=5%)*: число аллелей на локус с частотой >5%; *Ne*: эффективное число аллелей; *I*: информационный индекс Шеннона; гетерозиготность: *Ho*- наблюдаемая; *He*- ожидаемая.

Таким образом, генетический пул, включающий популяции заразики, паразитирующей на подсолнечнике в России и Казахстане показал большее генетическое разнообразие, чем популяции заразики из Румынии. Уровень генетического разнообразия вносит основной вклад в экологическую пластичность вида паразита. Наличие нескольких аллелей в генных локусах даёт возможность его индивидам быстрее адаптироваться к варьирующим условиям среды. Большее генетическое разнообразие в популяциях заразики, произрастающей на территории постсоветского пространства, свидетельствует об их большем микроэволюционном потенциале.

Анализ молекулярной вариации, характеризующий генетическую дифференциацию изучаемых популяций (AMOVA), выявил, что 23% от общей дисперсии обусловлено различиями между генетическими пулами, а большая часть дисперсии 77% - различиями между индивидами внутри каждого пула (табл. 2).

Таблица 2

Результаты анализа общего генетического разнообразия (AMOVA) в двух генетических пулах *O. citana*

Источник разнообразия	Число степеней свободы df	Сумма квадратов	Доля в общей дисперсии, абс. значения	Доля в общей дисперсии в %	P
Между пулами	1	11,100	0,551	23%	0,001
Внутри пулов	29	53,658	0,006	0%	
Между индивидами	31	57,000	1,839	77%	
Всего	61	121,758	2,396	100%	

Наши результаты показали, что популяции заразики из указанных трех стран группируются в кластеры согласно странам происхождения независимо от их расового состава. Один из кластеров объединяет популяции паразита из стран бывшего советского пространства. При этом, генетические пулы заразики, паразитирующей на подсолнечнике, в странах бывшего СССР и Румынии обладают некоторым сходством. Наблюдается практически полное отсутствие уникальных аллелей у особей исследованных популяций и большое генетическое сходство (0,872) пулов.

Таким образом, наши исследования показали, что генетическая изменчивость популяций заразики, как российских, так и зарубежных, небольшая, что свидетельствует о консервативности её генома и тенденции стать полным самоопылителем в будущем. Это показывает, что эволюционные изменения у вида *O. cumana* происходят в направлении обособления от влияния внешних факторов среды, формирующих высшее растение, и зависимости лишь от метаболизма растения подсолнечника, как хозяина этого паразита. Другими словами, как в России, так и за рубежом наблюдается усиление паразитических свойств у облигатного паразита *O. cumana*, который таксономически принадлежит к высшим растениям.

Литература

1. Fernández-Martínez J.M., Velasco L., Perez-Vich B. Progress in research on breeding for resistance to sunflower broomrape // *Helia*. – 2012. – V. 35 (57). – P. 47-56.
2. Škorić, D., Păcureanu-Joița M., Sava E. Sunflower breeding for resistance to broomrape (*Orobanche cumana* Wallr.) // *Genetica și ameliorarea plantelor an. I.N.C.D.A.* – 2010. Fundulea LXXVIII (1). – P. 63-79.
3. Антонова Т.С., Стрельников Е.А., Гучетль С.З., Челюстникова Т.А. Расовое разнообразие заразики *Orobanche cumana* Wallr. на подсолнечнике в регионах Российской Федерации, Казахстана и Румынии // *Наука Кубани*. – 2014. – № 3. – С. 16-22.
4. Gagne G., Roeckel-Drevet B., Grezes-Besset P., Shindrova P. *et al.* Study of the variability and evolution of *Orobanche cumana* populations infesting sunflower in different European countries // *Theor. and Appl. Genet.* – 1998. – V. 96. – P. 1216-1222.
5. Pineda-Martos R., Velasco L., Fernandez-Escobar J., Fernandez-Martinez J. M., Perez-Vich B. Genetic diversity of *Orobanche cumana* populations from Spain assessed using SSR markers // *Weed Research*. - 2013. – V. 53. – P. 279–289.
6. Doyle J.J. and J.L. Doyle. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* -1987- V. 19. – P.11-15.
7. Гучетль С.З., Антонова Т.С., Челюстникова Т.А. Межпопуляционная генетическая дифференциация *Orobanche cumana* Wallr. из России, Казахстана и Румынии с использованием молекулярно-генетических маркеров

// Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. –2014. – № 1 (157-158). – С. 108-114.

8. Peakall, R. and P.E. Smouse GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update // Bioinformatics. – 2012. – P. 1-3.