

ПИЛИПЕНКО Л.А.<sup>1✉</sup>, БЛОК В.<sup>2</sup>, ФІЛЛІПС М.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Інститут захисту рослин НААН,

Україна, 03022, м. Київ, вул. Васильківська, 33, e-mail: liliya.pylypenko@gmail.com

<sup>2</sup> The James Hutton Institute,

UK, Scotland, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, e-mail: vivian.blok@hutton.ac.uk ✉liliya.pylypenko@gmail.com, (050) 822-74-30

## ПОЛІМОРФІЗМ МІКРОСАТЕЛІТНИХ ЛОКУСІВ *GLOBODERA PALLIDA* З ПОПУЛЯЦІЙ РІЗНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Останніми роками дослідження генетико-популяційних процесів для різних видів нематод активно проводиться з використанням мікросателітних маркерів, але їх апробація для фітопаразитичних нематод тривалий час була обмежена всього кількома видами, в тому числі – представниками родини *Globodera*, які відомі в якості небезпечних патогенів рослин і мають карантинний статус для більшості країн світу [1–5].

Зокрема, початкові дослідження Thiéry та Mugniery для картопляних цистоутворюючих нематод *G. rostochiensis* та *G. pallida* були спрямовані на пошук мікросателітних локусів, їх ампліфікацію та характеризацію у порівнянні до видів *G. tabacum* та *G. mexicana* [5]. Всього авторами було зареєстровано 14 ді-, три- та тетра-нуклеотидних мікросателітних локуси, частина з яких виявилася видоспецифічною, тоді як встановлений ступінь поліморфізму всіх досліджуваних маркерів показав перспективність їх використання у дослідженнях із генетичної диференціації нематодних популяцій.

Цей висновок був підтверджений наступними дослідженнями, проведеними для популяцій блідої глободери з центру походження виду – Перу: виявлений ступінь алельного поліморфізму та варіабельність алельних частот 8 мікросателітних локусів вказували на дефіцит гетерозигот для більшості локусів та відсутність генетичної диференціації для вибірок нематод з популяцій не лише одного поля, а навіть одного регіону. Таким чином, вперше особливості репродукційної моделі глободер були підтверджені на генетичному рівні (інбридинг нащадків через обмежену міграційну здатність інвазійних личинок та самців, внаслідок чого спостерігається дефіцит гетерозиготних генотипів), тоді як відсутність генетичної диференціації для популяцій картопляних глободер з одного регіону вказувала на існуючий у межах регіону потік

генів через поширення цист нематод природним шляхом (з вітром, дощем, дикими тваринами), або разом з людською діяльністю (обмін зараженим посадковим матеріалом, використання недезінфікованого спорядження тощо) [2, 3]. Оскільки одержані результати збігалися з такими для *H. schachtii* [2], було висловлено припущення щодо єдиної схеми генетичної диференціації популяцій для всіх видів цистоутворюючих нематод [1].

Використання мікросателітних маркерів дозволило французьким ученим також вперше з високою точністю реконструювати інтродукцію *G. pallida* до Європи: доведено, що деякі європейські популяції *G. pallida* є нащадками картопляних глободер із південної частини Перу, місцевості, яка розташована між північними берегами озера Тітікака та Куско [4].

Метою власних досліджень було вивчення алельного поліморфізму мікросателітних локусів *G. pallida* з популяцій різного географічного походження та селекції на картоплі стійких генотипів задля дослідження структури та генетичної диференціації цих популяцій.

### Матеріали і методи

Об'єктом досліджень були 6 мікросателітних локусів блідої картопляної цистоутворюючої нематоди, нуклеотидна послідовність яких містила дінуклеотидні (TC)<sub>n</sub> чи (TG)<sub>n</sub> повтори – C120, C133, C136, C139, C142 та C146 [5].

У дослідженнях використовували нематод із популяцій, поширених у Європі (Великобританії – Luffness, Lindley, Halton, Farcet), Україні (Uzhok, Zhornava) та Південній Америці (P5A), а також спеціального добору на картоплі стійких генотипів з відмінними джерелами стійкості проти нематод (Farcet\_c11305, Farcet\_c8906, Farcet\_c12674).

Виділення цист нематод із ґрунтових та рослинних зразків проводили загальноприйня-

тим у нематології методом; екстракцію ДНК з індивідуальних личинок нематод здійснювали за вдосконаленою методикою Uehara [6]. Усього для наступного аналізу мікросателітних локусів було екстраговано ДНК матеріал від 200 індивідуальних личинок блідої глободери (двадцять генотипів репрезентували одну популяцію блідої глободери). Реакцію з ампліфікації мікросателітних локусів було проведено за використання праймерних систем, запропонованих Thiéry та Mugniery [5] та розроблених самостійно (дизайн праймерів проводили в програмі Primer3).

Популяційно-генетичний аналіз здійснювали за використання програм Arlequin, PopGene, Genepop та Bottleneck. Філогенетичний аналіз проводили за використання алгоритмів, реалізованих у пакетах програм NEIGHBOR та PHYLIP з бутстрепним оцінюванням ступеня достовірності розгалуженості гілок. Філогенетичні дерева було візуалізовано за допомогою програми TREEVIEW. Ординацію популяцій на площині двох перших головних компонент здійснювали в пакеті GENALEX.

### Результати та обговорення

Для підвищення чутливості ПЛР реакції з ампліфікації мікросателітних локусів було оптимізовано праймерні системи, запропоновані Thiéry та Mugniery [5]. У підсумку було підібрано 9 нових олігонуклеотидів, що дозволило модифікувати протоколи ПЛР реакції і перейти від традиційної (C120) до мультиплексної (C133, C136) чи вкладеної (C139, C142, C146) ПЛР. За використання розроблених праймерних систем та протоколів ПЛР було отримано амплікони довжиною від 109 до 237 п. н., подальше генотипування яких дозволило дослідити поліморфізм мікросателітних локусів.

У межах 6 досліджуваних локусів 200 проаналізованих генотипів популяцій *G. pallida* різного географічного походження та селекції на картоплі стійких генотипів було виявлено 140 алелів: у середньому –  $23,33 \pm 5,28$  алеля на локус. Найбільший вклад у формування міжпопуляційного поліморфізму вносили локуси мікросателітів CL20 та CL46, для яких було виявлено по 28 алелів на локус (довжиною 125–204 п. н. та 117–151 п. н. відповідно); найменш варіабельним був локус CL39, для якого було зареєстровано лише 15 алелів (довжиною 101–116 п. н.), що підтверджував і найнижчий інформаційний індекс Шенона (1,77). Високий ступінь по-

ліморфізму всіх 6 досліджуваних локусів був відмічений і розробниками маркерів для 5 популяцій *G. pallida* з європейських країн [5] та 13 популяцій *G. pallida* з Перу [2].

Виявлена генетична варіабельність мікросателітних локусів була меншою від такої у *G. pallida* з центру походження виду – Перу: так, якщо в наших дослідженнях максимальне число алелів на локус не перевищувало 28, то для вибірок з популяцій Перу цей показник дорівнював 36 [2]. Відмінність у генетичній структурі європейських популяцій пояснюється, ймовірно, в першу чергу, обмеженою кількістю особин/цист нематоли, а відповідно – й генотипів, що колись були інтродуковані (завезені/занесені) до європейського континенту (ефект засновника); кількістю поколінь та стохастичним ефектом генетичного дрейфу, що мали місце з того часу [2], в тому числі – внаслідок ефекту «пляшкового горла» через впровадження у протинематодних сівозмінах нематодостійких сортів картоплі, вирощування яких призводить до різкого зменшення щільності нематодних популяцій.

Водночас, поліморфізм досліджуваних мікросателітних локусів *G. pallida* південноамериканської популяції P5A виявився меншим, ніж очікувалося (максимально – 14 алелів на локус), на що вплинув, ймовірно, розмір вибірки, хоча прямого порівняння з роботою Picard [2] провести неможливо, оскільки в ній не зазначено патотипи використаних у дослідженнях популяцій *G. pallida* з Перу.

Тим не менш, наступний статистичний аналіз одержаних даних показав, що навіть за невисокої чисельності вибірки (20 личинок II-го віку), але за використання панелі мікросателітних маркерів (6 – у нашому випадку) можливе визначення генетичної структури популяцій блідої глободери на статистично значущому рівні. Аналогічний результат було одержано в дослідженнях для нематод родини *Heteroderidae*, в яких для реакції генотипування за 5 мікросателітними локусами було використано по 12–16 личинок II-го віку *H. schachtii*, *H. Glycines*, *H. trifolii*, *H. betae*, *H. ciceri*, *H. ca-fani* та *H. humali* [7–8].

Проведені дослідження показали, що 44 алелі (31 %) були специфічними для регіону походження популяцій блідої глободери. Цей показник для перуанських популяцій сягав до 52 % [2].

Водночас 6 алелів (4 %) виявилися специфічними для *G. pallida* селекції на картоплі стійких генотипів, хоча їх наявність як маркерів ступеня вірулентності досліджуваних популяцій не підтверджується: за топологією побудованої дендрограми *G. pallida* з популяцій відбору на

картоплі стійких генотипів (c11305 (Sv1), c8906 (Sv2) та c12674 (H3)) входять до однієї клади разом з іншими англійськими популяціями Halton та Lindley, хоч і відрізняються від більш вірулентної шотландської популяції Luffness (рис.).

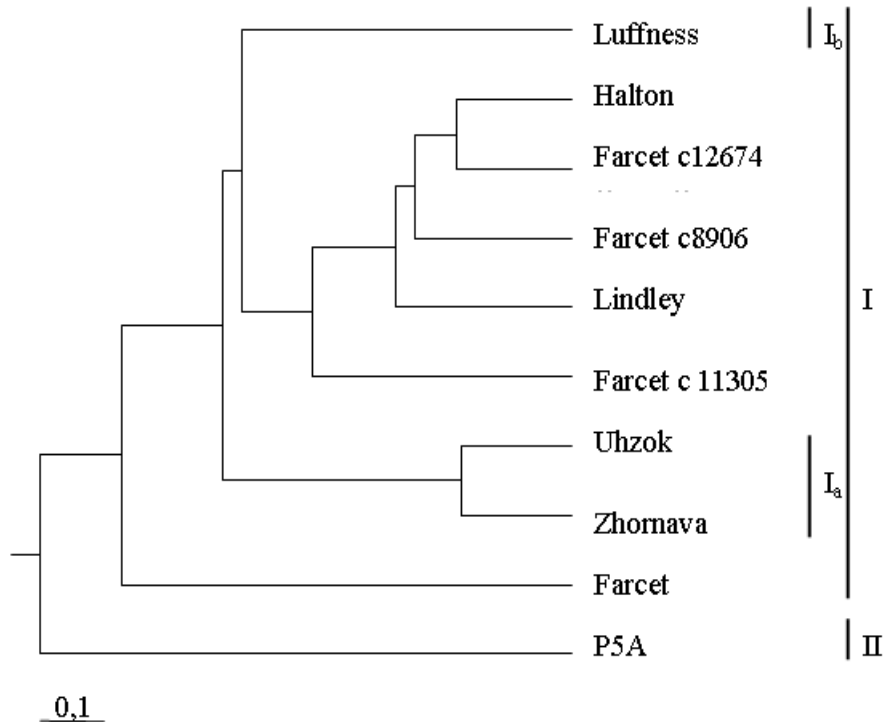


Рис. Дендрограма генетичної відстані між вибірками *G. pallida* з популяцій різного географічного походження та селекції на картоплі стійких генотипів, побудована за методом UPMGA (після бутстреп обробки для 1000 псевдореплік).

Аналіз генетичної структури популяцій *G. pallida*, проведений на основі алельних частот досліджуваних мікросателітних локусів, дозволив виявити дефіцит гетерозиготних генотипів для всіх (за винятком Farcet\_c12674) популяцій блідої глободери, який коливався від 0,4 до 15 %. Як відомо, дефіцит гетерозиготних генотипів спостерігається у випадку інбридингу, позитивно-асортивного схрещування або в разі ефекту Воланда (формування субпопуляцій). Оскільки досліджувані алелі були множинними, а дефіцит гетерозиготних генотипів різного ступеня виявлено для всіх досліджуваних мікросателітних локусів, припущення щодо зміни генетичної структури популяцій під впливом ефекту Воланда було відхилено; так само було відкинуто припущення щодо дефіциту гетерозиготних генотипів внаслідок позитивно-

асортивного схрещування: оскільки картопляні цистоутворюючі нематоди є диплоїдним та амфіміктичним видом, нездатним самостійно пересуватися на значні відстані внаслідок мікроскопічних розмірів, можна припустити, що переважна більшість генетичних змін у досліджуваних популяціях *G. pallida* відбувалася внаслідок інбридингу.

Як уже зазначалось, аналогічний тренд щодо дефіциту гетерозиготних генотипів був показаний для *G. pallida* з популяцій Південної Америки [2, 3], і навіть для іншого виду цистоутворюючих нематод – *H. schachtii*, для якого цей показник становив у середньому 28 % [8].

Водночас для вибірки нематод із популяції Farcet c12674 було виявлено незначний (1 %), але статистично достовірний надлишок гетерозиготних генотипів, що, можливо, вказує

на аутбридинг, оскільки популяція штучно підтримувалася в лабораторних умовах на картоплі стійкого генотипу, де могло відбутися випадкове занесення цист з іншої популяції.

Оскільки під час генотипування було виявлено алелі з непарною кількістю нуклеотидів, у той час як усі досліджувані локуси були дінуклеотидними, обрахунок індексів фіксації проводили як за невизначеною моделлю мутації мікросателітних алелів (infinite-allele model), так і за покроковою моделлю мутацій мікросателітних алелів (stepwise mutation model). Одержані попарні значення індексів  $F_{st}$  та  $R_{st}$  збіглися і були найбільшими для популяцій з різних регіонів світу (Південна Америка та Європа) і найменшими – для українських популяцій спорідненого географічного походження (сусідні села Закарпатської області, розмежовані Карпатськими горами).

У дослідженнях Plantard [4] низькі значення індексу  $F_{st}$  також були характерними для *G. pallida* з популяцій походженням з однієї провінції країни: так, наприклад, для трьох популяцій із французької провінції «île de Re» (коди популяцій FR-2, FR-3, FR-5) цей показник становив 0,036–0,068, дещо меншим він був для трьох популяцій із провінції «Noirmoutier» (FR-6, FR-7, FR-8): 0,017–0,064. Однак така закономірність не була сталою: в окремих випадках попарний індекс фіксації  $F_{st}$  для *G. pallida* з популяцій різних країн був меншим за наведені вище показники, наприклад  $F_{st} = 0,022$  для пари популяцій з Франції (FR-9) та Іспанії (SP) чи  $F_{st} = 0,052$  для пари популяцій із Франції (AK-5) та Великобританії (UK-2). Такі факти вказують на можливу історію поширення блідої глободери в Україні з первинних вогнищ у Європі, швидше

за все – разом із бульбами картоплі як садивного матеріалу.

### Висновки

Загалом, результати аналізу шести мікросателітних локусів вибірок популяцій *G. pallida* різного географічного походження та селекції на картоплі стійких генотипів продемонстрували високий рівень генетичної подібності досліджуваних популяцій на фоні відносно високої індивідуальної мінливості особин нематод у межах цих популяцій. У результаті проведених досліджень не були виявлені маркерні локуси, пов'язані з географією походження чи селекцією блідої глободери на картоплі стійких генотипів, хоча для цих популяцій і було ідентифіковано відмінності за спектрами алелів та їх частотами. Зокрема, були виявлені унікальні алелі, кількість яких для *G. pallida* з європейських популяцій була меншою від такої, виявленої для нематод популяції P5A з центру походження виду – Південної Америки, – що говорить на користь припущення, висловленого попередніми дослідниками щодо інтродукції свого часу до європейського континенту малочисельної популяції *G. pallida* або й взагалі – завезення поодиноких цист. Водночас наявність певної генетичної диференціації європейських популяцій за характером загального генетичного розподілення варіабельності, показниками генетичних відстаней та частот алелів вказує на наявність мікроеволюційних процесів на рівні геному (генетичний дрейф, мутації, потік генів, відбір), та може бути свідченням подальшої генетичної диференціації популяцій картопляних нематод в цьому регіоні з імовірним утворенням інших (у т. ч. більш вірулентних) патотипів.

### Література

1. Mugniery D., Plantard O., Fournet S., Grenier E. Risk assessment of cyst nematode evolution and durability of potato cyst nematode resistance [Електронний ресурс] // ENDURE International Conference 2008 Diversifying crop protection, 12–15 October 2008 La Grande-Motte, France – Oral presentations. – Режим доступу: [http://www.endure-network.eu/content/download/4764/39273/file/Full %20text %200. 63.pdf](http://www.endure-network.eu/content/download/4764/39273/file/Full%20text%200.63.pdf).
2. Picard D., Plantard O. What constitutes a population for the plant parasitic nematode *Globodera pallida* in its native area (Peru)? // International Journal for Parasitology. – 2006. – V. 36 (1). – P. 115–122.
3. Picard D., Sempere T., Plantard O. A northward colonization of the Andes by the potato cyst nematode during geological times suggests multiple host–shifts from the wild to cultivated potatoes // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2007. – V. 42 (2). – P. 308–316.
4. Plantard O., Picard D., Valette S., Scurrah M., Grenier E., Mugniery D. Origin and genetic diversity of Western European populations of the potato cyst nematode (*Globodera pallida*) inferred from mitochondrial sequences and microsatellite loci // Molecular Ecology. – 2008. – V. 17 (9). – P. 2208–2218.
5. Thiéry M., Mugniery D. Microsatellite loci in the phytoparasitic nematode *Globodera* // Genome. – 2000. – V. 43. – P. 160–165.
6. Uehara T., Mizukubo T., Kushida A., Momota Y. Identification of *Pratylenchus coffeae* and *P. loosi* using specific primers for PCR amplification of ribosomal DNA // Nematologica. – 1998. – V. 44. – p. 357–368.

7. Plantard O., Porte C. Isolation and characterization of microsatellite loci in the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii* // Molecular Ecology Notes. – 2003. – V. 3 (1). – P. 139–141.
8. Plantard O., Porte C. Population genetic structure of the sugar beet cyst nematode *Heterodera schachtii*: a gonochoristic and amphimictic species with highly inbred but weakly differentiated populations // Molecular Ecology. – 2004. – V. 13 (1). – P. 33–41.

**PYLYPENKO L.A.<sup>1</sup>, BLOK V.<sup>2</sup>, PHILLIPS M.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Institute of Plant Protection NAAS,

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 33, e-mail: liliya.pylypenko@gmail.com

<sup>2</sup> The James Hutton Institute,

UK, Scotland, Invergowrie, Dundee, DD2 5DA, e-mail: vivian.blok@hutton.ac.uk

#### **POLYMORPHISMS OF MICROSATELLITE LOCI IN THE *GLOBODERA PALLIDA* POPULATIONS OF DIFFERENT ORIGIN**

**Aim.** The comprehensive population studies were conducted to elucidate the genetic diversity and virulence of *Globodera pallida*. **Methods.** The population studies were combined with SSR-analysis of genetic diversity inferred from six microsatellite loci to characterize 10 populations of *G. pallida* of different origin. **Results.** A phylogenetic analysis based on six microsatellite loci genotyping data showed that the Ukrainian populations of *Globodera pallida* were almost identical to other *Globodera pallida* populations from Europe representing Pa2/3 virulence group. Limited genetic variability inferred from the microsatellite loci polymorphisms was observed between *Globodera pallida* populations distributed in Europe and Ukraine, accounting for 82.3–93.4 % ( $P < 0.05$ ) of the genetic variability within the populations studied. These results support a hypothesis that populations in Ukraine are the result of the continuing spread of *Globodera pallida* within Europe and not the result of additional introductions from South America. **Conclusions.** The panel of 6 microsatellite loci allowed to investigate the genetic variability of *Globodera pallida* populations of different geographical origin and selection on three sources of resistance. The results revealed that selected *Globodera pallida* populations were similar but not identical indicating that changes in allele and genotype frequency had taken place as a result of the selection regime, but these neutral markers were not yet applicable for virulence monitoring.

**Keywords:** potato cyst nematodes, microsatellite loci, phylogenetic relationship, virulence.