

Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и оценка возможности их применения для сравнительного анализа штаммов

О. И. Лаврова¹, С. Н. Еланский²

1 — Московский Государственный Университет им. М. В. Ломоносова, Биологический ф-т., каф. микологии и альгологии, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, к. 12
E-mail: ilinir@mail.ru

2 — ВНИИ Фитопатологии РАСХН, 143050, Московская обл., п/о Б. Вяземы
E-mail: elansky@yahoo.com

Принято в редакцию: 04.11.2003.

ABSTRACT

Identification of SINE-similar elements in *Phytophthora infestans* genome and their application in comparative analysis of strains. Lavrova, O. I. & Elansky, S. N.

The tasks of the work were the identification of conservative DNA fragments similar to A – B box of Short Interspersed Nuclear Elements (SINEs) in *Phytophthora infestans* genome, selection of PCR-primer for these DNA fragments, and comparative analysis of *P. infestans* isolates from distant regions using this primer. A search for SINE-similar elements was performed with primers to known A and B boxes of SINEs from other organisms. After PCR-amplification DNA fragments of different sizes were identified. Six DNA fragments (45 – 51 bp) were cloned in *E. coli* and sequenced. All 6 clones had similar 25-nucleotide part that includes B box. This sequence was used to create revSINE (5'-GGGATCGAACCCAGAAAGTGACTACGG-3') primer.

After PCR-amplification of total *P. infestans* DNA with RevSINE-primer a great number of DNA fragments of different sizes were obtained. The number of fragments decreased with the increasing of the temperature of the primer melting. The temperature 48°C revealing 94 bands after electrophoresis in PAAG was used for comparative analysis. Cluster analysis of PCR-products did not elucidate any groups of isolates based on their geographic origin or host-plant. Only one isolate from the Sakhalin island differed significantly from other strains. Possible explanation is that SINEs-mobile elements and can rapidly change their location in genome. This type of PCR-analysis is characterized by very high resolution and it might be more suitable for other types of researches such as analysis of different features of the strains and gene identification than for population explorations.

Key words: *Phytophthora infestans*, molecular markers, short interspersed elements, mobile elements.

ВВЕДЕНИЕ

Методы, основанные на прямом анализе структуры ДНК, находят все более широкое применение в сравнительных исследованиях как отдельных живых объектов, так и их сообществ. Преимущества этих методов в сравнении с фенотипическим анализом заключаются в отсутствии изменений изучаемых признаков при культивировании, при выращивании на разных субстратах, при разных условиях окружающей среды, и т. д. (Дьяков, 1998).

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary — один из самых опасных фитопатогенов, возбудитель фитофтороза картофеля и томатов. Из-за колоссального ущерба, наносимого фитофторозом, большое внимание во всем мире уделяется всестороннему изучению этого грибоподобного организма. Одно из основных направлений исследований — мониторинг изменений, происходящих в популяциях. Он позволяет

отслеживать текущие изменения в популяциях и прогнозировать опасные тенденции их развития.

За последнюю четверть века опробован ряд методов исследования структуры генома *P. infestans*. Одними из лучших можно назвать фингерпринтинг ДНК с гибридизационной пробой RG 57 (Goodwin et al., 1992) и исследование гаплотипов митохондриальной ДНК методом полимеразной цепной реакции (далее — ПЦР) с последующей рестрикцией (Griffith, Shaw, 1998). Ранее предпринимались попытки использования для сравнения штаммов методов амплификации со случайными праймерами (RAPD) (Carter, 1990; Williams et al., 1990; Judelson et al., 1995), AFLP, заключающегося в избирательной амплификации рестриктных фрагментов геномной ДНК (Van der Lee et al., 1997; Avrova, 2003; Vas et al., 1995; Flier, 2001), SSR-ПЦР, позволяющего амплифицировать участки ДНК, распо-

ложенные между микросателлитами (Judelson et al., 1995; Zietkiewicz et al., 1994; Pipe & Shaw, 1997), и некоторых других. Однако используемые методы имеют свои недостатки — гибридизационные пробы довольно дороги и трудоемки в исполнении и заставляют ограничивать число анализируемых изолятов, определение гаплотипов митохондриальной ДНК отличается низкой информативностью, RAPD и SSR-ПЦР недостаточно достоверны из-за слабой воспроизводимости результатов анализа (Carter, 1990; Backeljau, 1995; Elansky & Smirnov, 2003).

Работами некоторых авторов была показана возможность использования коротких диспергированных ядерных элементов (Short Interspersed Nuclear Elements, SINEs) в качестве генетических маркеров, позволяющих получать надежную информацию о филогенезе таксономических групп среднего уровня — семейств и отрядов. Есть данные и о внутривидовой дифференциации по SINEs различных популяций (Банникова и др., 2002). Это возможно благодаря содержанию внутри SINEs-подобных элементов консервативных участков ДНК, фланкиру-

ющих промотор РНК-полимеразы III. К этим участкам можно подобрать праймер для проведения ПЦР. При ПЦР такого типа происходит амплификация фрагментов, расположенных между копиями SINEs, которые часто находятся на сравнительно небольшом расстоянии друг от друга. Поскольку SINEs в геноме ориентированы в обоих направлениях, то для анализа достаточно одного праймера на консервативную часть. Различия в получаемых картинах связаны с возникновением делеций и вставок в участках ДНК, расположенных между копиями этих повторов. Применение этого метода для изучения филогении млекопитающих из отрядов *Artiodactyla* (Kaukinen & Varvio, 1992), *Lipotyphila*, *Chiroptera* и *Artiodactyla* (Buntjer, 1997) показало хорошие результаты.

В задачи предлагаемой работы входила идентификация в геноме *P. infestans* консервативных участков, содержащихся внутри SINEs-подобных элементов, подбор праймеров к ним и проведение ПЦР (далее — интер-SINE-ПЦР) с целью сравнительного анализа изолятов *P. infestans* из удаленных регионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы, используемые в работе, их культивирование и выделение ДНК

В работе использовали штаммы из коллекции кафедры микологии и альгологии МГУ им. М.В. Ломоносова, а также из коллекции Scotland Crop Research Institute (SCRI). Места и даты сборов представлены в таблице 1.

Изоляты культивировали на жидкой гороховой и агаризованной овсяной средах. Геномную ДНК выделяли из обезвоженного и растертого в жидком азоте мицелия *P. infestans* по стандартному методу фенол-хлороформной депротенинизации после щелочной обработки мицелия (Griffith & Shaw, 1998).

Условия проведения ПЦР с праймерами к А и В боксам SINE-подобной последовательности и определение последовательности нуклеотидов (секвенирование) ДНК

Реакция проводилась в 100 мкл смеси, содержащей 0,1 нг геномной ДНК, 0,3 мкМ праймеров к А и В боксам (праймер А: T(A/G)GCTCAGTGGT; праймер В: C(C/T)CAAG(C/T)TA(A/G)GG), 200 мМ dNTP, 2 U Taq-полимеразы и реакционный буфер (67 мМ Трис-HCl pH 8,6, 2,5 мМ MgCl₂, 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄ и 0,001% Тритон X-100). Амплификация проводилась за 27 циклов (95°C, 1 мин.; 340°C, 1 мин.; 720°C, 1 мин.) на приборе Biometra T1. Смесь ПЦР-продуктов была экстрагирована методом фенол / хлороформной обработки; ДНК была осаждена с помощью этанола, растворена в 10 мкл 10мМ Трис-HCl pH 8 и 1мМ EDTA (TE) и проанализирована посредством электрофореза в 5% NuSieve (FMC) агарозном геле. Амплифицированные фрагменты ДНК были клонированы, секвенированы и использованы для созда-

ния Rev-SINE праймера. В работе использовался автоматический 4-х капиллярный секвенатор ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer. Подготовка проб ДНК к секвенированию проводилась в соответствии с инструкцией к прибору.

Условия проведения интер-SINE-ПЦР

Праймер (100 пмоль) метили с помощью [g³²P]-АТР (1МБк) и полинуклеотидкиназы. ПЦР проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей стандартный Taq-буфер (50 мМ KCl, 10 мМ буфер Tris-HCl, pH 8,3, 2,5 мМ MgCl₂ и 0,001% желатин), 0,2 мМ dNTP, 4пмоль каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и 25 нг геномной ДНК. Программа ПЦР: денатурация — 95°C, 1 мин.; отжиг — 48°C, 1 мин.; синтез — 72°C, 1 мин. Число циклов — 30. Предварительная денатурация продолжалась 5 мин. при 95°C; конечный синтез — 5 мин. при 72°C. Эксперименты выполнены на приборе Biometra T1. Продукты ПЦР денатурировали и разделяли с помощью электрофореза в 6%-м полиакриламидном геле, содержащем 0,089 М трисборатный буфер и 8 М мочевины, аналогично тому, как это делают при секвенировании ДНК. Длина геля — 50 см, ширина — 28 см, толщина — 0,4 мм. Электрофорез проводили в течение 7 часов при постоянной мощности тока 75 Вт. Радиоавтографию проводили, экспонируя высушенный гель с рентгеновской пленкой RETINA в течение 16–48 ч.

Математический анализ результатов

Фингерпринты, полученные при Inter-SINE-ПЦР, были преобразованы в бинарную матрицу (1 — присутствие полосы, 0 — отсутствие), которую анализи-

ТАБЛИЦА 1

Место и дата сбора изолятов *P. infestans*, использованных в работе

Номера изолятов	Год сбора	Растение-хозяин	Место сбора
2KK3	2002	К	Красноярск
1KVК1	2001	К	Кисловодск
1KVК7	2001	К	— ” —
I 5-02	2002	К	Респ. Ингушетия
I 43-02	2002	К	— ” —
I 1-02	2002	К	— ” —
T16	2001	К	Тула
B 0/92	2000	К	Белоруссия
B 0/76	2000	К	— ” —
B 99/26	1999	К	— ” —
B 0/17	2000	К	— ” —
1MSha K14	2001	К	Московская обл.
1MSha TL19	2001	Т	— ” —
1MSha TP2/2	2001	Т	— ” —
1RSKL55	2001	К	Рязанская обл.
1RSKL9/2	2001	К	— ” —
1Br-H-11-01	2001	К	Брянская обл.
1SOSK3	2001	К	Респ. Северная Осетия
1Sar TP7/2	2001	Т	Респ. Мордовия
1Sar TP4	2001	Т	— ” —
7SK29	1997	К	о. Сахалин
95.162	1995	—	Великобритания
96-70	1996	—	— ” —
96.36	1996	—	— ” —
143-02	2002	—	— ” —
Ecl	—	—	Эквадор
ARI	—	—	Аргентина
550	—	—	Мексика
98DK	1998	—	Дания

“—” — нет данных; К — картофель; Т — томаты.

ровали по методу ближайшего связывания (neighbor-joining — NJ) и UPGMA в программе TREECONW (Van de Peer & De Wachter, 1994) Для анализа досто-

верности топологии деревьев применяли бутстреп-анализ (Efron & Gong, 1988). В бутстреп-анализе осуществляли 500 реплик.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Идентификация SINE-подобных

последовательностей в геноме *P. infestans*

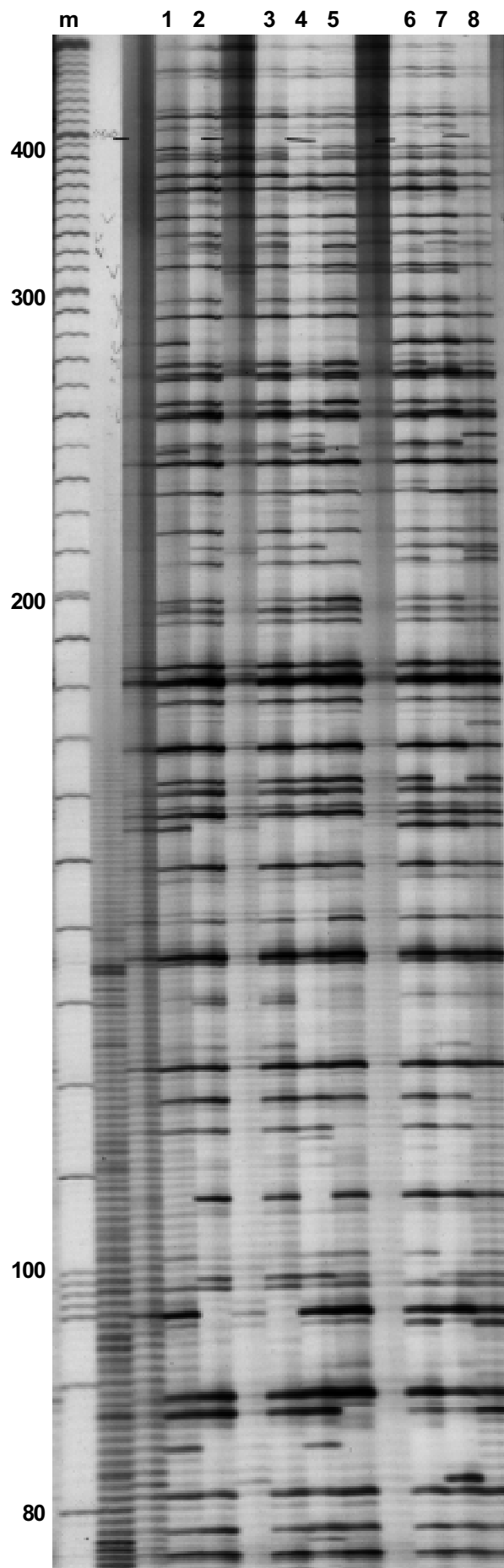
SINEs содержат внутри своей последовательности промотор РНК полимеразы III, состоящий из двух частей — боксов А и В, расстояние между которыми составляет 33–40 пар нуклеотидов. Для выявления А-В бокса в геноме *P. infestans* проводили ПЦР-амплификацию на матрице геномной ДНК *P. infestans*

с праймерами, соответствующими консенсусам боксов А и В SINEs других живых организмов (Borodulina & Kramerov, 1999).

В результате амплификации ДНК *P. infestans* с праймерами, комплементарными консенсусам боксов А и В, были получены ПЦР-продукты различного веса, которые, в свою очередь, были клонированы в *E. coli*. Всего было клонировано 6 ПЦР-продуктов (рис. 1) и

№ клона	А бокс	консервативная последовательность	В бокс
1–17	5' – TGGCTCAGTGGTGGGTAGCTCAGTGGT	CCGTAGTCACTTCT	GGTTCGATCCC – 3'
1–77	TGGCTCAGTGG	TAGCTAGTGA	CCGTAGTCACTTCTGGTTCGATCCC
1–58	TGGCTCAGTGG	TGGCTCAGTGGT	CCGTAGTCACTTCTGGTTCGATCCC
1–37	TGGCTCAGTGG	TGG CTAGTGG	CCGTAGTCACTTCTGGTTCGATCCC
1–39	TGGCTCAGTGG	TGGATTGGTGAC	CCGTAGTCACTTCTGGTTCGATCCC
1–45	TGGCTCAGTGG	TGCCAGTGGAC	CCGTAGTCACTTCTGGTTCGATCCC
Праймер RevSINE		3' –	GGCATCAGTGAAGACCAAGCTAGGG – 5'

Рис. 1. Последовательности фрагментов рекомбинантных плазмид из клонов *E. coli*, содержащие А-В бокс SINEs *P. infestans*. Пробелы в последовательностях (реально отсутствующие) введены для более наглядного их представления.



определены их последовательности нуклеотидов (от 45 до 51 п.н.). У всех шести копий ПЦП-продукта отмечена консервативная последовательность, включающая В бокс, протяженностью 25 нуклеотидов. На ее основе был сконструирован праймер revSINE: 5' – GGGATCGAACCCAGAAGTGACTACGG – 3'.

Сравнительный анализ штаммов *P. infestans* с использованием интер-SINE-ПЦП

ПЦП продукт амплификации тотальной ДНК *P. infestans* с праймером RevSINE был представлен большим числом полос разного веса. Подбор оптимальной температуры для ПЦП производился экспериментально. Был протестирован температурный интервал 42–70 °С. При температурах ниже 48 °С наблюдалось большое количество полос и сильный шмер, то есть отжигалось слишком много неспецифических последовательностей. При более высоких температурах проявлялось недостаточно полос для разделения изолятов. Для сравнительного анализа изолятов была выбрана температура 48 °С, при которой четко идентифицировались 94 полосы (рис. 2).

Кластерный анализ бинарных матриц, соответствующих фингерпринтам ДНК, не выявил групп изолятов ни по признаку географического происхождения, ни по растению-хозяину. Высокое сходство (бутстреп более 45 %) отмечено в 9 небольших группах из 2–3 изолятов (рис. 3). В первой группе объединились изоляты из Красноярского края и республики Ингушетия, во второй — из Белоруссии и Ставропольского края, в третьей — из Московской области и Великобритании, и т. д. В то же время практически нет объединения между изолятами, собранными в одном регионе, за исключением двух изолятов из Московской области, двух белорусских изолятов и двух изолятов из Мордовии, которые имели практически идентичные паттерны полос. По видимому, каждая из пар этих изолятов имеет клональное происхождение, т. к. внутри этих пар совпадают все остальные характеристики изолятов, такие как тип спаривания, митохондриальная ДНК, спектр изоферментов пептидазы и они были собраны на одних и тех же делянках. Достоверно выделяется один изолят из Сахалина, который отличался и по другим характеристикам — имел самую высокую агрессивность к картофелю, максимально возможное число генов вирулентности к сортам картофеля, уникальный генотип по RG 57 (Elansky et al., 2001).

Аналогичные результаты были получены при применении метода интер-SINE-ПЦП для сравнительного анализа штаммов *Stachybotrys chartarum* из удаленных местообитаний (Еланский и др., 2004). В результате исследований также не было показано клас-

Рис. 2. Электрофоретическое разделение фрагментов интер-SINE-ПЦП.

m — маркер молекулярной массы; 1–8 — различные изоляты *P. infestans*.

теризации штаммов с одинаковых субстратов или из близких местообитаний и отмечены отдельные сильно выделяющиеся изоляты, отличающиеся и по другим маркерным признакам.

По-видимому, метод интер-SINE-ПЦР слишком специфичен для популяционных исследований такой варибельной группы, как грибы. Возможно это связано с тем, что SINEs — мобильные элементы, и перестройка их расположения в геноме грибов происходит очень быстро. В результате метод показывает различия даже в бесполом потомстве одного изолята, как это было при анализе *S. chartarum*. Однако нельзя утверждать, что использование данного метода нецелесообразно. Для некоторых видов исследований, как, например, исследование агрессивности или уровня устойчивости к фунгицидам у потомства штаммов с известными характеристиками и т.д., метод может быть очень полезен.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны за помощь в работе сотрудникам МГУ им. М.В. Ломоносова Ф.Х. Аманхановой, В.П. Апрышко, М.А. Побединской и SCRI Dr. S.C. Whisson и Dr. M. Armstrong. Мы благодарим проф. Ю.Т. Дьякова и проф. Д.А. Крамерова за ценные замечания по содержанию работы. Исследование выполнено при поддержке МНТЦ (проект 1640).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Банникова А.А., Матвеев В.А., Крамеров Д.А.** (2002) Опыт использования интер-SINE-ПЦР в изучении филогенеза млекопитающих. *Генетика* **38**: 853–864.
- Дьяков Ю.Т.** (1998) Популяционная биология фитопатогенных грибов. Муравей, Москва.
- Еланский С.Н., Петрунина Я.В., Лаврова О.И., Лихачев А.Н.** (2004) Сравнительный анализ российских штаммов *Stachybotrys chartarum*. *Микробиология*, т. 73, **1**: 73–79.
- Крамеров Д.А., Краев А.С., Рысков А.П., Скрыбин К.Г.** (1980) Первичная структура высокоповторяющейся последовательности ДНК мыши, гомологичной двуспиральным участкам про-мРНК. *Докл. АН СССР* **252**: 241–244.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.** (1984) Молекулярное клонирование. Мир, Москва.
- Avrova, A.O., Venter, E. & Whisson, S.C.** (2003) Profiling and quantifying differential gene transcription in *Phytophthora infestans* prior to and during the early stages of potato infection. *Fung. Genet. Biol.* **40** (1): 4–14.
- Baceljaui, T., D Wolf, H., Jordaens, K., Van Dongen, S., Verhagen, R. & Winnepenninckx, B.** (1995) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and parsimony methods. *Cladistics* **11**: 119–130.
- Borodulina, O.R. & Kramerov, D.A.** (1999) Wide distribution of short interspersed elements among eukaryotic genomes. *FEBS Lett.* **457**: 409–413.

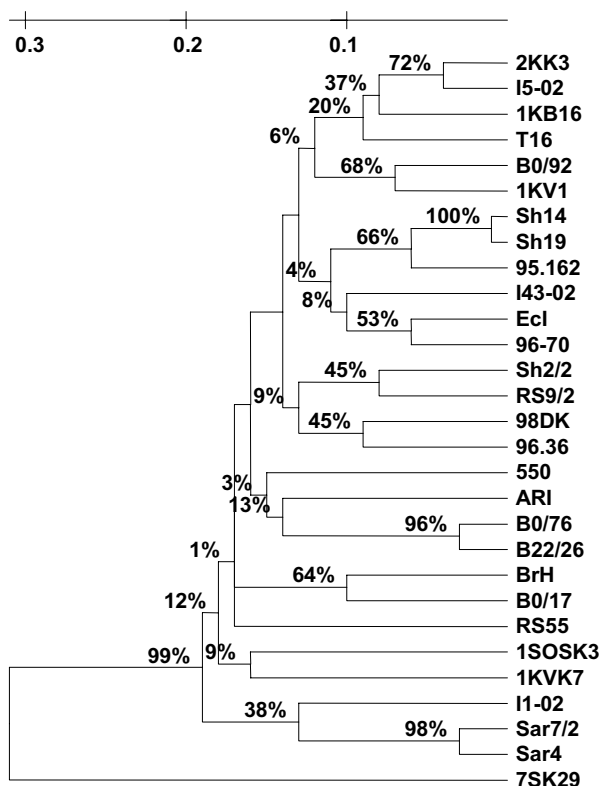


Рис. 3. Кластерная диаграмма сходства между изолятами *P. infestans*, построенная на основании результатов ПЦР-анализа с праймером RevSine.

- Buntjer, J.B.** (1997) DNA repeats in the vertebrate genome as probes in phylogeny and species identification. *Utrecht. Univ. Utrecht. Nederlands.* P. 1–130.
- Carter, D.A.** (1990) *PhD Thesis*, Univ. of Wales.
- Carter, D.A., Buck, K.W., Archer, S.A., Van der Lee, T., Shattock, R.C. & Shaw, D.S.** (1999) The detection of nonhybrid, trisomic, and triploid offspring in sexual progeny of a mating of *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **26** (3): 198–208.
- Efron, B. & Gong, G.** (1988) A leisurely look at the bootstrap, the jackknife, and cross-validation. *Am. Stat.* **37**: 36–48.
- Elansky, S., Smirnov, A., Dyakov, Y., Dolgova, A., Filippov, A., Kozlovsky, B., Kozlovskaya, I., Russo, P., Smart, C. & Fry, W.** (2001) Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East. *J. Phytopathol.* **149** (10): 605–611.
- Elansky, S.N. & Smirnov, A.N.** (2003) Second locus of peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Bot. Lithuanica* **9** (2): 275–283.
- Flier, W.G.** (2001) Variation in *Phytophthora infestans*, sources and implications. *PhD Thesis*, Wageningen Univ.
- Goodwin, S.B., Drenth, A. & Fry, W.E.** (1992) Clonal and genetic analyses of two highly polymorphic moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.* **22**: 107–115.

- Griffith, G. W. & Shaw, D. S.** (1998) Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4007–4014.
- Judelson, H. S., Spielman, L. J. & Shattock, R. C.** (1995) Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* **141** (2): 503–12.
- Kaukinen, J., M. & Varvio, S-L.** (1992) Artiodactyl retroposons: Association with microsatellites and use in SINEmorph detection by PCR. *Nucl. Acid. Res.* **20**: 2955–2958.
- Link, W., Dixens, C., Singh, M., Schwall, W. & Melchinger, A. F.** (1995) Genetic diversity in European Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* **90**: 27–32.
- Okada, N.** (1990) SINES. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1**: 498–504.
- Pipe, N. D. & Shaw, D. S.** (1997) Telomere-associated restriction fragment length polymorphisms in *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol. On-Line*.
- Singer, M. F.** (1982) SINES and LINES: highly repeated short and long interspersed sequences in mammalian genomes. *Cell* **28**: 433–434.
- Swofford, D. L.** (1998) PAUP*. Phylogenetic Analysis using parsimony (* and other methods). **ver. 4.** Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Van de Peer & De Wachter** (1994) TREECON: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Cabios* **9** (2): 177–182.
- Van der Lee, T., De Witte, I., Drenth, A., Alfonso, C. & Govers, F.** (1997) AFLP Linkage map of the Oomycete *Phytophthora infestans*. *Fungal Genet. Biol.* **21** (3): 278–291.
- Vas, P., Hogers, R., Bleeker, M. et al.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acid. Res.* **23** (21): 4407–4414.
- Williams, G. K., Kubelik, A. R., Livak, J., Rafalski, J. A. et al.** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* **18** (22): 6531–6535.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. & Labuda, D.** (1994) Genome fingerprinting by simple Sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* **20**: 176–183.