

УДК 632.911.2: 573.6

## Распознавание штаммов возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* методом SSCP-анализа генов вирулентности

© 2018 В.К. ЧИЖИК<sup>1,2,\*</sup>, Е.А. СОКОЛОВА<sup>1</sup>, В.В. МАРТЫНОВ<sup>1,2</sup>, М.А. КУЗНЕЦОВА<sup>3</sup>, Э.Е. ХАВКИН<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии, Москва 127550

<sup>2</sup>Московский государственный областной университет, Москва 105005

<sup>3</sup>ФГБНУ Всероссийский НИИ фитопатологии, Одинцовский р-н, пос. Большие Вяземы 143050

\*e-mail: chizhikvera@bk.ru

Поступила 02.07.2018 г.

После доработки 12.09.2018 г.

Принята в печать 12.09.2018 г.

Методом SSCP-анализа (single-strand conformation polymorphism) исследован полиморфизм семи генов (а)вирулентности возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans*: *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr4*, *Avr-Smira1* (*Avr9*) и *ipiO* (*Avr-blb1*) у 20 монозооспоровых линий *P. infestans*. При ПЦР-амплификации этих генов с последующим электрофоретическим разделением ампликонов в неденатурирующем полиакриламидном геле образуются от двух до пяти хорошо воспроизводимых паттернов, которые содержат по несколько зон электрофоретической подвижности. ДНК этих зон была клонирована и секвенирована. Последовательности ДНК, представленные этими зонами, соответствуют известным вирулентным аллелям *Avr*-генов, однако, в случае *ipiO* найдены преимущественно авирулентные варианты гена. Каждый индивидуальный паттерн соответствует определенному варианту *Avr*-гена и может быть использован в качестве дескриптора для различения и идентификации штаммов *P. infestans*. В отличие от наиболее распространенного метода генотипирования штаммов *P. infestans* по SSR-локусам (single sequence repeat), SSCP-анализ выявляет полиморфизм, непосредственно связанный с вредоносностью штамма патогена.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, *Avr*-гены, SSCP-анализ, генотипирование

doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-4-11

Фитофтороз, возбудителем которого является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, представляет собой одно из наиболее распространенных заболеваний картофеля, которое наносит значительный экономический ущерб, измеряемый миллиардами долл. в год [1]. Борьбу с фитофторозом картофеля серьезно затрудняют быстрые изменения состава генов вирулентности (*Avr*-генов) в популяциях патогена, вызванные миграцией патогена и высокой скоростью его эволюции [1, 2]. Определение состава *Avr*-генов в популяции пато-

гена может помочь различить патотипы *P. infestans*, выбрать наиболее эффективные фунгициды и предотвратить возможные потери урожая.

Традиционно для идентификации патотипов (рас) *P. infestans* используют метод определения генов/факторов вирулентности с помощью растенный-дифференциаторов Мاستенброка-Блека, несущих индивидуальные гены устойчивости, которые различают *Avr*-гены в высокоспецифичной реакции сверхчувствительности. Этот метод трудоемок и обладает существенными недостатками.

Список сокращений: AFLP, RAPD, RFLP, SSR – молекулярные методы генотипирования, основанные на прямом или опосредованном анализе анонимных фрагментов генома; SSCP-анализ (single-strand conformation polymorphism) – анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных фрагментов ДНК.

В частности, многие растения-дифференциаторы содержат в своем геноме более одного гена устойчивости к фитофторозу и, соответственно, расы, отобранные на этих дифференциаторах, также содержат более одного гена вирулентности [3].

Молекулярные методы генотипирования штаммов *P. infestans* основаны на прямом или опосредованном анализе полиморфизма функциональных локусов (спектры пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы, тип спаривания, устойчивость к металаксилу) или анонимных фрагментов генома (RAPD, AFLP, RFLP, SSR-анализ и определение гаплотипов митохондриальной ДНК) [4]. Получивший в последние годы широкое распространение SSR-анализ изолятов *P. infestans* позволил создать международную систему мониторинга и прогноза распространения наиболее опасных патотипов [5, 6]. Необходимо подчеркнуть, что большинство перечисленных методов молекулярного генотипирования используют дискриминанты, маркирующие те локусы генома, которые обеспечивают базовые клеточные функции для жизнедеятельности патогена (housekeeping genes), и непосредственно не связаны с вредоносностью (pathogenicity) патогена. Эта часть генома *P. infestans* является относительно стабильной. Напротив, определяющие вредоносность патогена *Avr*-гены расположены в относительно мобильной части генома, свободной от housekeeping genes и богатой подвижными элементами [1, 2, 7]. Таким образом, дескрипторы на основе *Avr*-генов характеризуют эволюционно мобильную часть генома и позволяют соотнести генотипы штаммов *P. infestans* с их вредоносностью.

SSCP-паттерны хорошо воспроизводимы, и после первоначальной валидации составляющих паттерны зон ДНК дальнейшее использование этого метода для мониторинга уже не требует секвенирования [8, 9]. SSCP-анализ видового разнообразия *Solanum* позволяет рассматривать этот метод как вариант баркодинга [10]. Кроме того, этот метод позволяет обнаруживать редкие аллельные варианты генов, которые могут быть индикаторами патотипов, новых для данного агроценоза. SSCP-анализ ранее уже применялся для изучения фитопатогенов, в том числе для различения видов *Phytophthora* [11–14] и оценки внутривидового разнообразия *P. ramorum* [14, 15]. В настоящей работе впервые использован этот метод для изучения полиморфизма *Avr*-генов.

Цель исследования – генотипирование линий *P. infestans* методом SSCP-анализа для сопоставления полученных данных с результатами генотипирования этих линий традиционными методами.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Изоляты *P. infestans* были собраны в августе 2015 г. на пораженных фитофторозом листьях межвидовых гибридов картофеля в полевой коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений (ВИР) в Пушкине (С-Петербург). Эти гибриды несут многочисленные гены расоспецифичной устойчивости [16]. Поскольку одно растение картофеля может быть колонизовано сразу несколькими патотипами *P. infestans* [17], из изолятов выделяли монозооспоровые линии. Из мицелия двадцати таких линий *P. infestans* выделяли ДНК, которую использовали для генотипирования линий по 12 SSR-локусам [6] и маркерного анализа. Тип спаривания определяли с помощью CAPS-маркера [18]. Гены/факторы вирулентности идентифицировали с помощью растений-дифференциаторов из Международного картофельного центра CIP (Lima, Peru). Используемые методы фитопатологического и молекулярного анализа были описаны ранее [17].

## ПЦР-амплификация *Avr*-генов

Последовательности праймеров и условия ПЦР-амплификации для генов *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like* и *AvrSm1 (Avr9)* были заимствованы из литературных источников [19–21]; для амплификации генов *Avr3a*, *Avr4* и *ipiO* авторами были созданы праймеры, обеспечивающие размер ампликона, оптимальный для SSCP-анализа (табл. 1 и рис. 1).

Реакционная смесь для амплификации содержала 1 мкл 10X ПЦР-буфера, 100–150 нг тотальной ДНК, 1 мкл 2,5 мкМ dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы («Синтол», Россия) и стерильную воду до 10 мкл. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, США).

## Клонирование и секвенирование

Полученные фрагменты клонировали в вектор pAL-TA («Евроген», Россия) по протоколу фирмы-производителя. Этим вектором трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α. По семь клонов для каждого образца секвенировали на анализаторе ABI PRIZM 3130 xl (Applied Biosystems, USA).

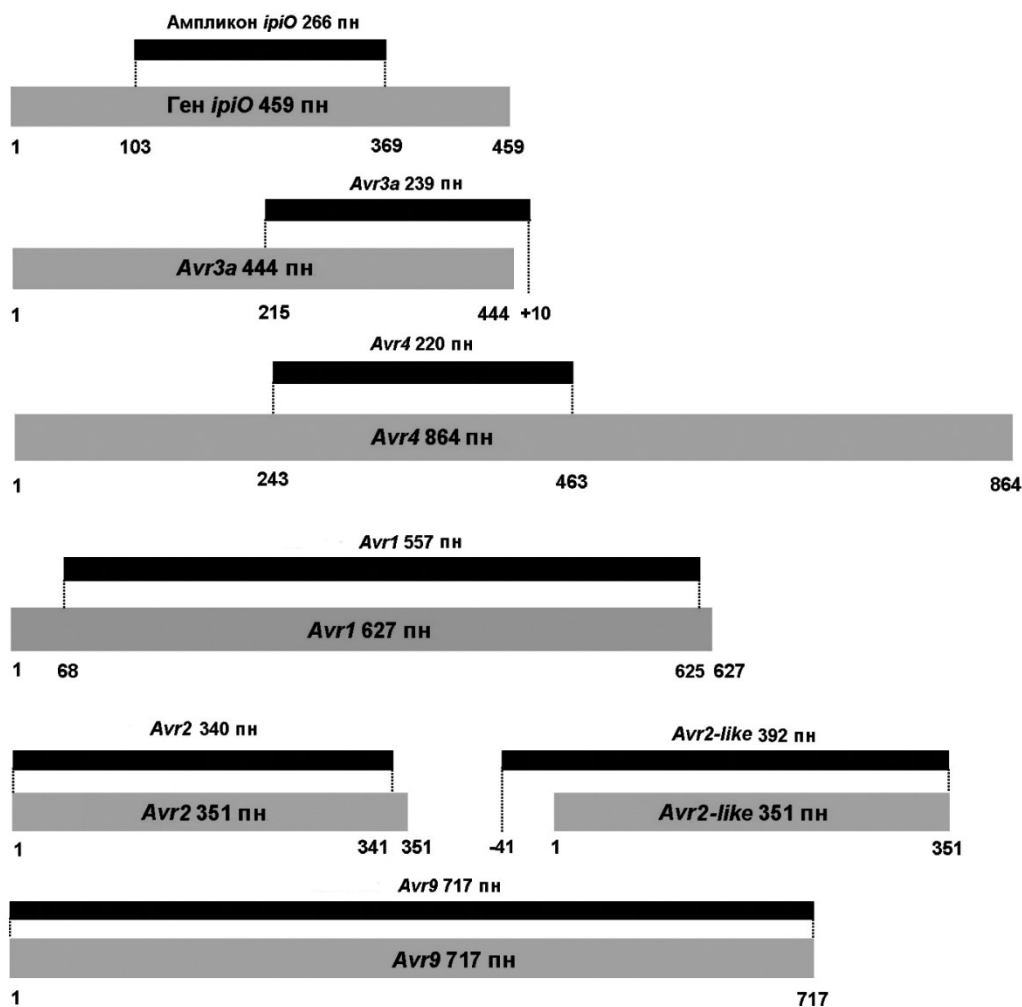
## SSCP-анализ

Полученные в результате ПЦР ампликоны денатурировали с помощью формамида и инкубировали при температуре 95 °С, и разделяли в неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ),

## Последовательности праймеров и условия ПЦР-амплификации

## Primer sequences and PCR conditions

Avr-ген	Праймер	Последовательность 5'→3'	Длина фрагмента, пн	T отжига, °C
<i>Avr3a</i>	Avr3aSF Avr3aR	GTTTAATGTGGCTGCGTTG CTGAAAАСТААТАТССАGТGA	239	53
<i>Avr4</i>	Avr4SF Avr4SR	GGCACGCCACTGGAAAAAGTC GCGCAACCCACCTAAGGAGC	220	61
<i>ipiO</i>	IPIOF IPIO1R	CATCCAAGATTTCGCTTTCTGTCT GCTTATCGGCGTCTCTCCGG	266	63

Рис. 1. Схематическое изображение амплифицируемых участков *Avr*-геновFig. 1. Schematic view of PCR-amplified portions of *Avr* genes

используя следующий протокол: к 1,5–4,0 мкл ПЦР продукта добавляли 7 объемов денатурирующего буфера (95% формамида, 0,05% бромфенолового синего, 0,05% ксиленианола, 20 мМ ЭДТА) и инкубировали в течение 10 мин при температуре 95 °C. Затем образцы немедленно помещали в лед и наносили на 8%-ный ПААГ (40:1

акриламид:бис-акриламид). Размер геля составлял 18×16 см. Электрофоретическое разделение проводили в течение 4,5 ч в 0,5X TBE-буфере при температуре 4 °C и напряжении 200 В. Для обнаружения фрагментов ДНК гели инкубировали в 300 мл 1X раствора красителя SYBR Green I (Sigma Life Science) в 0,5X TBE-буфере и

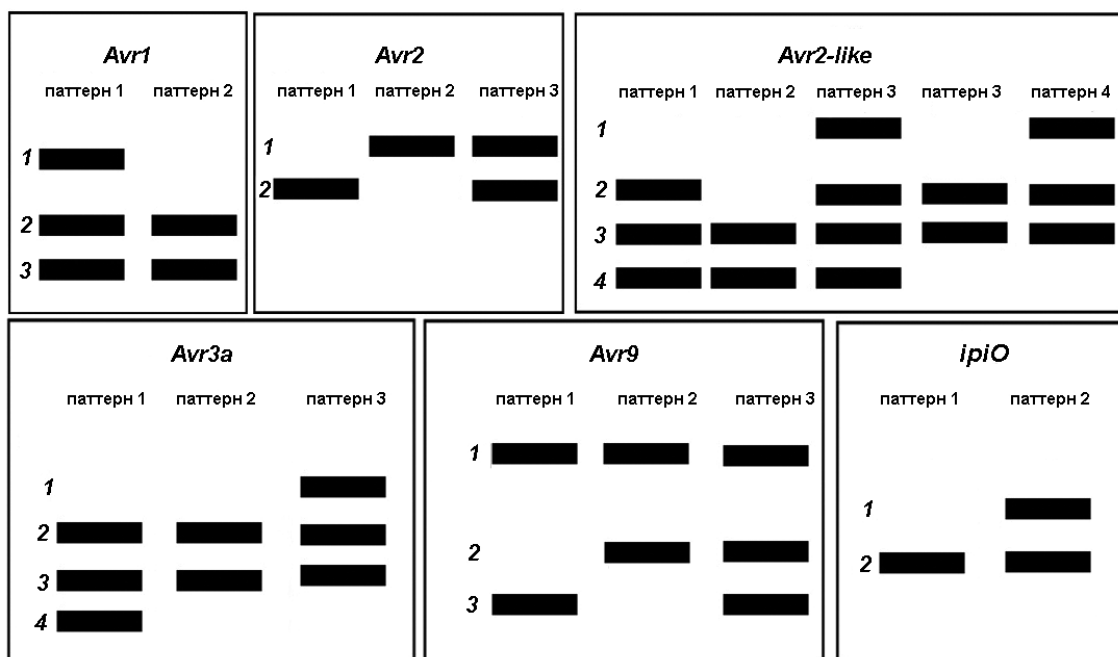


Рис. 2. SSCP полиморфизм *Avr*-генов *P. infestans*. Схематически показаны зоны с различной электрофоретической подвижностью (1–4)

Fig. 2. SSCP polymorphism of *Avr*-genes in *P. infestans*. Schematic view of zones with different electrophoretic mobility (1–4)

фотографировали в ультрафиолете ( $\lambda=312$  нм), полученный элюат использовали для реамплификации фрагментов ДНК и последующего клонирования.

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) с последующим анализом результатов при помощи пакета программ LaserGene. Производные аминокислотные последовательности были получены с помощью программы Mega7 (<https://www.megasoftware.net/>). Полученные последовательности сравнивали с последовательностями *Avr*-генов из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

SSCP-анализ семи *Avr*-генов – *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr4*, *Avr-Smiral* (*Avr9*) и *ipiO* (*Avr-blb1*) – у 20 монозооспорных линий *P. infestans*

выявил характерные паттерны, которые представляют собой набор зон с различной электрофоретической подвижностью. Для каждого гена выявлено от двух до пяти таких паттернов (рис. 2). Все паттерны, полученные в ходе SSCP-анализа, надежно воспроизводились.

Характерные электрофоретические паттерны образуются в результате вторичной конформации одноцепочечных молекул ДНК, одинаковых по длине, но различающихся по нуклеотидному составу. Выравнивание нуклеотидных последовательностей гена *Avr1*, с указанием SNP, по которым отличаются три зоны, формирующие паттерны этого гена, приведено на рис. 3. Изменение конформации приводит к изменению подвижности в ПААГ [22], однако адекватная модель таких изменений подвижности отсутствует [8].

Последовательности *Avr*-генов, выявленные при SSCP-анализе, сравнивали с генами-прототипами из линии *P. infestans* T30-4. Большинство

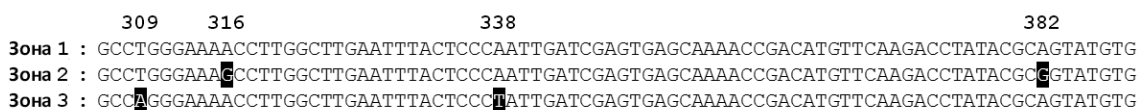


Рис. 3. Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr1*. Заливкой отмечены соответствующие SNPs

Fig. 3. Exemplary fragment of alignment of nucleotide sequences of zones of *Avr1* gene. SNPs marked with color

клонированных нами последовательностей соответствуют вирулентным аллелям *Avr*-генов, которые не распознаются соответствующими генами устойчивости картофеля [19–21, 23–26], однако, для *ipiO* найдены преимущественно авирулентные варианты гена. Степень гомологии с генами-прототипами, как правило, составляла 99% (табл. 2). Наиболее заметные различия в случае *Avr2-like 2* связаны с тем, что данный гомолог отсутствует в полностью секвенированном геноме линии *P. infestans* T30-4, где найден ген *Avr2*. Различия между *ipiO\_1* и *ipiO\_2* связаны с тем, что данное семейство генов очень полиморфно, и последовательности из этих зон относятся к двум разным классам – последовательности из зоны *IPIO\_1* относятся к I классу, последовательности из зоны *ipiO\_2* относятся к II классу генов. По данным SSCP анализа не удалось обнаружить полиморфизм нуклеотидной последовательности для *Avr4*, возможно, это связано с небольшим размером ампликона относительно целого гена или неподходящими условиями SSCP. Известно, что вирулентный вариант гена *Avr4* отличается от авирулентного сбоем рамки считывания и наличием стоп-кодона. Таким образом, с нуклеотидной последовательности транслируется неполно-размерный белок.

Для диплоидного оомицета *P. infestans* возможны два аллельных варианта каждого из генов. Однако локализация *Avr*-генов в геноме *P. infestans* изучена недостаточно [27]. Дополнительные зоны могут указывать на трисомию [28] или тандемную дупликацию *Avr*-генов.

При генотипировании линий *P. infestans* по 12 SSR-локусам [6], эти линии отчетливо разделялись на два кластера – А и В (табл. 3) [17]. Поскольку SSR-локусы и гены вирулентности находятся в разных участках генома, между их полиморфизмом может не быть связи. Тем не менее, такую связь удалось выявить для генов *Avr3a* и *Avr9*. Так, для гена *Avr3a* у линий, относящихся к кластеру А, преобладал паттерн 1, а паттерн 2 был характерен для линий, относящихся к кластеру В. В случае гена *Avr9* у линий *P. infestans*, относящихся к кластеру А, преобладал паттерн 3, для линий из кластера В характерен паттерн 1.

Состав *Avr*-генов, исследованных с помощью молекулярных маркеров, не вполне согласуется с типом спаривания и с составом генов вирулентности, выявленных фенотипическим методом, по реакции растений-дифференциаторов, несущих гены устойчивости. Мы склонны объяснять такое расхождение неполнотой каждого из использованных наборов дескрипторов и тем, что

Таблица 2

**Сравнение клонированных последовательностей с *Avr*-генами-прототипами из базы данных NCBI**  
**Comparison of obtained sequences and reference *Avr* genes from the NCBI database**

Ген, номер зоны	Клонированные гены	Гены-прототипы*
<i>Avr1_1</i>	MH450289	XM_002998511 (99)
<i>Avr1_2</i>	MH450290	XM_002998511 (99)
<i>Avr1_3</i>	MH450291	XM_002998511 (99)
<i>AVR2_1</i>	KY354764	XM_002902939 (99)
<i>AVR2_2</i>	KY354765	XM_002902939 (99)
<i>AVR2-like_1</i>	MF956401	XM_002902939 (93)
<i>AVR2-like_2</i>	MF956407-MF956429	XM_002902939 (93)
<i>Avr3a_1</i>	KF154428	XM_002898795 (99)
<i>Avr3a_2</i>	MH450287	XM_002898795 (99), GQ869422.1 (99)
<i>Avr3a_3</i>	MH450288	XM_002898795 (99)
<i>Avr9_2</i>	MH423619	XM_002904490 (97)
<i>Avr9_3</i>	MH423620	XM_002904490 (99)
<i>ipiO_1</i>	MH220872	XM_002895005 (99)
<i>ipiO_2</i>	MH220873	XM_002895005 (97)

Примечание: В скобках указан уровень гомологии (%).

\*Последовательности генов-прототипов из линии *P. infestans* T30-4.



**Молекулярная и фитопатологическая характеристика монозооспоровых линий *P. infestans*. Сравнение профиля *Avr*-генов с факторами вирулентности, определенными фитопатологически и другими молекулярными методами генотипирования (SSR-кластер и тип спаривания)**

**Molecular and phytopathological characteristic of *P. infestans* monozoospore lines. Comparison of presence/absence of *Avr* genes with other molecular and functional characteristics of the lineages from which these genes were obtained**

Линии <i>P. infestans</i>	Кластер SSR	Тип спаривания	<i>Avr</i> -гены, обнаруженные в ходе данного исследования	Факторы вирулентности
117/2-1, 117/2-2	А	А2	<i>Avr1, Avr2, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I, II)	12345791011
120-1	То же	То же	То же	12347891011
11/2-1	» »	А1	<i>Avr1, Avr2-like, Avr3a, Avr9, ipiO</i> (I, II)	134781011
11/2-2	» »	То же	<i>Avr1, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I, II)	1234781011
11/2-4	» »	» »	То же	Нет данных
109/1-2	» »	» »	» »	12345791011
43/1-1	В	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, avr9, ipiO</i> (I, II)	12347891011
43/1-2	То же	» »	То же	12347891011
43/1-3	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, ipiO</i> (I, II)	12347891011
18/1-1	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I, II)	1234567891011
18/1-4	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, ipiO</i> (I, II).	1234567891011
103-1, 103-2, 103-3, 103-5	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I, II)	123467891011
103-4	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I)	123467891011
107-1	» »	А2	<i>Avr1, Avr2, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I, II)	123478910
107-2	» »	То же	То же	12347891011
87/2-2	» »	» »	<i>Avr1, Avr2, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr9, ipiO</i> (I)	12378

Примечание: (I, II) – класс генов *ipiO*.

многие растения-дифференциаторы содержат в своем геноме более одного гена устойчивости к фитофторозу [3].

Итак, SSCP-анализ *Avr*-генов у генотипированных по SSR-локусам монозооспоровых линий *P. infestans* и изучение первичной структуры *Avr*-генов показали, что SSCP-паттерны, состоящие из нескольких зон электрофоретической подвижности, являются надежными дескрипторами, которые можно связать с последовательностями *Avr*-генов, ранее идентифицированными по строению и функции. Результаты генотипирования линий *P. infestans* с помощью SSCP-анализа *Avr*-генов не вполне соотносятся с другими методами распознавания этих линий, поскольку анализируемые локусы относятся к разным частям генома *P. infestans*.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ (проекты 16-04-00098 и 18-016-00144а). Методическая часть работы выполнена в рамках КПНИ «Развитие селекции и семено-

водства картофеля». Авторы признательны проф. А.Н. Игнатову, за предложение использовать SSCP-анализ для изучения *Avr*-генов *P. infestans*. Секвенирование фрагментов ДНК проводили в Центре коллективного использования оборудования ВНИИСБ «Биотехнология».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Fry W.E. *Phytophthora infestans*: new tools (and old ones) lead to new understanding and precision management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2016, 54, 529–547. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-095951
2. Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2011, 49, 507–531. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095326
3. Kim H.-J., Lee H.-R., Jo K.-R., et al. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theor. Appl. Genet.*, 2012, 124(5), 923–935. doi: 10.1007/s00122-011-1757-7

4. Cooke D.E.L., Lees A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathol.*, 2004, 53, 692–704. doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01104.x
5. Euroblight. Protocol for sampling *Phytophthora infestans* DNA using FTA cards, 2013. <http://euroblight.net/protocols/>
6. Li, Y., Cooke D.E.L., Jacobsen E., van der Lee T. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. *J. Microbiol. Meth.*, 2013, 92(3), 316–322. doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.021
7. Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S., et al. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathol.*, 2012, 8(10), e1002940. doi:10.1371/journal.ppat.1002940
8. Kakavas K.V., Plageras P., Vlachos T.A., et al. PCR–SSCP: a method for the molecular analysis of genetic diseases. *Mol. Biotechnol.*, 2008, 38(2), 155–163. doi: 10.1007/s12033-007-9006-7
9. Sunnucks P.A.C.C., Wilson A.C.C., Beheregaray L.B., et al. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol. Ecol.*, 2000, 9(11), 1699–1710. doi: org/10.1046/j.1365-294x.2000.01084.x
10. Rodríguez F, Cai D., Teng Y., Spooner D. Asymmetric single-strand conformation polymorphism: an accurate and cost-effective method to amplify and sequence allelic variants. *Am. J. Bot.*, 2011, 98(7), 1061–1067. doi:10.3732/ajb.1000251
11. Hong C., Gallegly M.E., Richardson P.A., Kong P. *Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status. *Mycologia*, 2011, 103(2), 351–360. doi: 10.3852/10-058
12. Kong P., Hong C., Richardson P.A., Gallegly M.E. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora*. *Fungal Genet. Biol.*, 2003, 39(3), 238–249. doi: 10.1016/S1087-1845(03)00052-5
13. Scott D.L., Clark C.W., Fyffe A.E., et al. The differentiation of *Phytophthora* species that are pathogenic on potatoes by an asymmetric PCR combined with single-strand conformation polymorphism analysis. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1998, 27(1), 39–44. doi: 10.1046/j.1472-765X.1998.00382.x
14. Kong P., Hong C.X., Tooley P.W., et al. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR–SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2004, 38(5), 433–439. doi: 10.1111/j.1472-765X.2004.01510.x
15. Martin F. N., Coffey M.D., Zeller K., et al. Evaluation of molecular markers for *Phytophthora ramorum* detection and identification: testing for specificity using a standardized library of isolates. *Phytopathol.*, 2009, 99(4), 390–403. doi: 10.1094/PHYTO-99-4-0390
16. Fadina O.A., Beketova M.P., Kuznetsova M.A., et al. Revisiting late blight resistance genes in complex interspecific potato hybrids. Schepers H.T.A.M. (ed.). PAGV-Special Report. Wageningen, DLO Foundation, 2017, 18, 245–256. [http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Workshops/AARhus/Proceedings/Special\\_Report\\_18\\_Totaal.pdf](http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Workshops/AARhus/Proceedings/Special_Report_18_Totaal.pdf)
17. Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Ulanova T.I., et al. Pathogenicity of East European strains of *Phytophthora infestans* vs. resistance of colonized potato plants: the profiles of AVR-genes vs. R gene pyramids. Schepers H.T.A.M. (ed.). PAGV-Special Report. Wageningen, DLO Foundation, 2017, 18, 259–267. [http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Workshops/AARhus/Proceedings/Special\\_Report\\_18\\_Totaal.pdf](http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Workshops/AARhus/Proceedings/Special_Report_18_Totaal.pdf)
18. Mazáková J., Táborský V., Zouhar M., et al. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic. *Plant Protect. Sci.*, 2006, 42(2), 41–48. doi: 10.17221/2697-PPS
19. Du Y., Weide R., Zhao Z., et al. RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1. *Stud. Mycol.*, 2018, 89, 85–93. doi: 10.1016/j.simyco.2018.01.003
20. Gilroy E.M., Breen S., Whisson S.C., et al. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between *PiAVR2* and *PiAVR2*-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytol.*, 2011, 191(3), 763–776. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03736.x
21. Rietman H., Bijsterbosch G, Cano L.M., et al. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpö Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2012, 25(7), 910–919. doi: 10.1094/MPMI-01-12-0010-R.
22. Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989; 86(8), 2766–2770.
23. Stefańczyk E., Sobkowiak S., Brylińska M., Śliwka J. Expression of the potato late blight resistance gene *Rpi-phul* and *Phytophthora infestans* effectors in the compatible and incompatible interactions in potato. *Phytopathol.*, 2017, 107(6), 740–748. doi: 10.1094/PHYTO-09-16-0328-R
24. Чижик В.К., Мартынов В.В. Полиморфизм гена *Avr2* оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в популяции Московской области. *Генетика*, 2017, 53(12), 1411–1418. doi: 10.7868/S0016675817120037.
25. Saunders D.G.O., Breen S., Win J., et al. Host protein BSL1 associates with *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR2 and the *Solanum demissum* immune receptor R2 to mediate disease resistance. *Plant Cell*, 2012, 24(8), 3420–3434. doi: 10.1105/tpc.112.099861

26. Champouret N., Bouwmeester K., Rietman H., et al. *Phytophthora infestans* isolates lacking class I *ipiO* variants are virulent on *Rpi-blb1* potato. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2009, 22(12), 1535–1545. doi:10.1094/MPMI-22-12-1535
27. van der Lee T., Testa A., Robold A., et al. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics*, 2001, 157(3), 949–956.
28. van der Lee T., Testa A., Robold A., et al. High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. *Genetics*, 2004, 167(4), 1643–1661. doi: 10.1534/genetics.104.029652

## Discerning strains of *Phytophthora infestans* the causative agent of potato late blight by SSCP analysis of virulence genes

V.K. CHIZHIK<sup>1,2,\*</sup>, E.A. SOKOLOVA<sup>1</sup>, V.V. MARTYNOV<sup>1,2</sup>, M.A. KUZNETSOVA<sup>3</sup>, and E.E. KHAVKIN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550, Moscow Russia

<sup>2</sup>Moscow Region State University, 105005, Moscow Russia

<sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Phytopathology, 143050, Moskovskaya Oblast, Odintsovskiy district, Bolshie Vyazemy, Russia

\*e-mail: chizhikvera@bk.ru

Received June 2, 2018

Revised September 12, 2018

Accepted December 15, 2018

**Abstract** – The polymorphism of seven (a)virulence genes *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr4*, *Avr-Smiral* (*Avr9*) and *ipiO* (*Avr-blb1*) of *Phytophthora infestans*, the causative agent of potato late blight, was evaluated by SSCP (single-strand conformation polymorphism) analysis. Two to five well reproducible patterns containing several zones of electrophoretic mobility were observed after the separation in PAGE under non-denaturing conditions of the amplicons resulting from the PCR amplification of these genes. The DNA sequences from these zones correspond to the known virulent alleles of genes *Avr*; however, the *ipiO* gene is mostly associated with the avirulent variants. Each individual pattern corresponds to a definite variant of the *Avr*-gene, and can therefore be used as a descriptor for distinction and identification of the *P. infestans* strains. Unlike the most widespread method of *P. infestans* strains genotyping by SSR (single sequence repeat) loci, SSCP detects the polymorphism that is directly associated with the harmfulness of a pathogenic strain.

**Acknowledgement** – This study was supported by the Russian Foundation for Basic Research (projects 16-04-00098 and 18-016-00144a). The methodical part of this study was performed in the framework of the Comprehensive research program «Development of potato breeding and seed production». The authors are grateful to prof. A.N. Ignatov, for offering to use SSCP analysis to study the *Avr* genes in *P. infestans*. Sequencing of DNA fragments was performed at the Center for Collective Use of Equipment «Biotechnology» at the Institute of Agricultural Biotechnology.

**Key words:** *Phytophthora infestans*, *Avr*-genes, SSCP, genotyping.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-6-4-11