

УДК 632.911.2:573.6

ПРИМЕНЕНИЕ SSCP-АНАЛИЗА ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *Phytophthora infestans*

© 2022 г. В. К. Чижик¹, В. В. Мартынов¹, *¹ФГБНУ “Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии”, Москва, 127550 Россия

*e-mail: martynov.vik@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2022 г.

После доработки 13.10.2022 г.

Принята к публикации 17.10.2022 г.

Фитофтороз картофеля, вызываемый оомицетом *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, остается важнейшей экономической проблемой картофелеводства. В молекулярных исследованиях патогенеза особое внимание уделяется генам вирулентности (*Avr*) возбудителя этого заболевания. Эти гены кодируют белки-эффекторы, позволяющие патогену преодолеть защитную систему хозяина, поэтому определение состава и полиморфизма *Avr*-генов позволяет оценить вирулентность и агрессивность штаммов *P. infestans* и проследить изменения генетического разнообразия популяций *P. infestans*. Использование методов молекулярно-генетического анализа *Avr*-генов для раннего обнаружения новых штаммов *P. infestans* и оценки вредоносности этих штаммов при заражении сортов картофеля, несущих известные гены устойчивости к *P. infestans*, позволит сделать более эффективным применение химических средств защиты картофеля и прогнозировать возможные потери урожая этих сортов при эпидемическом развитии фитофтороза. С помощью простого и надежного анализа SSCP (single-strand conformation polymorphism) мы исследовали полиморфизм генов вирулентности *P. infestans* в популяциях этого патогена из России и Польши и выявили различия между ними.

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

DOI: 10.56304/S0234275822060059

Борьба с экономически наиболее важной болезнью картофеля — фитофторозом — сильно осложняется быстрыми изменениями в составе популяций возбудителя этой болезни — оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary [1]. Новые патотипы *P. infestans*, возникающие в результате эволюции и гибридизации патогена, поражают сорта, которые до этого считались устойчивыми, что иногда приводит к полной потере урожая картофеля [2, 3]. Разработка и валидация методов раннего распознавания этих изменений в популяциях патогена позволит оценивать потенциальную вредоносность новых штаммов патогена и прогнозировать возможные потери урожая сортов с известным составом генов устойчивости к фитофторозу.

На протяжении многих лет устойчивость картофеля к фитофторозу описывали в рамках модели Флора “ген-на-ген” [4]. Взаимодействие *P. infestans* с растениями картофеля определяется присутствием в клетках патогена генов вирулентности (*Avr*-генов), которые кодируют эффекторы, вызывающие иммунный ответ и защитную реакцию у растений картофеля, содержащих соответствующие (*matching*) гены устойчивости (*R*-гены).

На основе этой модели Дж. Малколмсон и В. Блэк (Malcolmson J.F. & Black W.) [5] разработали номенклатуру взаимодействующих генов *R* и *Avr*. Одиннадцать генов устойчивости были обозначены символами *R1–R11*. Аналогичные номера используют для соответствующих *Avr*-генов. Для идентификации рас *P. infestans* были созданы наборы растений-дифференциаторов — сортов картофеля, несущих валидированные в условиях искусственной инокуляции индивидуальные *R*-гены. Несмотря на главный недостаток — неизвестное реальное число *R*-генов, традиционный набор растений-дифференциаторов Мэстэнброка–Блэка [6] до сих пор активно используют для описания расового разнообразия в популяциях патогена во всем мире.

Сокращения: AFLP (amplified fragment length polymorphism) — полиморфизм длин амплифицируемых фрагментов; RAPD (random amplified polymorphic DNA) — случайно амплифицируемая полиморфная ДНК; RFLP (restriction fragment length polymorphism) — полиморфизм длин рестриктных фрагментов; SNP (single nucleotide polymorphism) — однонуклеотидный полиморфизм; SSCP (single-strand conformation polymorphism) — анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма; SSR (simple sequence repeats) — простые повторяющиеся последовательности.

В последние десятилетия широкое распространение получили молекулярные методы генотипирования штаммов *P. infestans*. В большинстве своем они основаны на прямом или опосредованном анализе полиморфизма анонимных (арбитражных) фрагментов генома: фингерпринтинг с помощью RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats) и SNP (Single Nucleotide Polymorphism), – а также на анализе последовательности нескольких функциональных локусов, отвечающих за изоферментные спектры пептидазы (локусы PEP1 и PEP2) и глюкозо-6-фосфатизомеразы (Gpi), тип спаривания, устойчивость к металаксилу, или на определении гаплотипов митохондриальной ДНК [3, 7–11].

В частности, при фингерпринтинге *P. infestans* методом RLFP-анализа с зондом RG57 [12] обнаруживают 25–29 полиморфных зон. Такой метод оказался эффективным инструментом для мониторинга генетического разнообразия *P. infestans* и в течение долгого времени его использовали по всему миру для генотипирования изолятов, что позволило создать Международную базу данных по популяциям *P. infestans* [13]. Но сегодня этот метод применяется все реже из-за таких существенных недостатков, как трудоемкость и невозможность автоматизации, потребность в большом количестве ДНК, низкая воспроизводимость и проблемы с интерпретацией полученных данных.

Метод AFLP-анализа также широко применялся для изучения полиморфизма и генетического картирования популяций *P. infestans* [14, 15]. Достоинство метода состоит в большом числе получаемых фрагментов ДНК. К числу его недостатков можно отнести необходимость использовать хорошо очищенную ДНК, что исключает работу с растительным материалом, зараженным другими микроорганизмами, высокую стоимость оборудования для электрофореза, трудоемкость и трудности в подборе оптимальных условий проведения анализа.

Секвенирование митохондриального генома *P. infestans* позволило разработать быстрый и простой метод определения гаплотипов митохондриальной ДНК (мтДНК), который стал одним из самых распространенных в популяционных исследованиях. Для этого используют амплификацию со специфичными праймерами с последующей рестрикцией – так называемый анализ PCR-RFLP (в русском языке – ПЦР-ПДРФ). Митохондриальные маркеры позволяют отслеживать индивидуальные линии *P. infestans* и сравнивать полученные данные с результатами, полученными с помощью других ДНК-маркеров. Метод оказался мощным инструментом для филогенетического и

географического анализа многих организмов, хотя в случае *P. infestans* его использование позволяет обнаружить только четыре гаплотипа мтДНК (Ia, IIa, Ib, IIb). Martin и соавт. [11] использовали другой метод оценки генетического разнообразия *P. infestans* при помощи митохондриальных маркеров. Для амплификации они отобрали пять локусов мтДНК: это увеличило число гаплотипов мтДНК с четырех до 37 и позволило повысить разрешающую способность метода.

В настоящее время для генотипирования и паспортизации штаммов микроорганизмов часто используют микросателлитные маркеры (SSR-маркеры). Они характеризуются наибольшей таксономической разрешающей способностью и применяются для идентификации и оценки внутривидового полиморфизма изолятов *P. infestans*. Протокол мультиплексного ПЦР-анализа изолятов *P. infestans* по 12 микросателлитным локусам [16] лег в основу международной системы мониторинга и прогноза распространения наиболее опасных патотипов *P. infestans* [17].

К общим недостаткам всех вышеперечисленных методов молекулярного генотипирования относится использование дескрипторов, которые непосредственно не связаны с вредоносностью патогена. В этом отношении они уступают традиционному биологическому методу различения рас *P. infestans* с помощью растений-дифференциаторов. В связи с вышеизложенным особым вниманием заслуживают методы диагностики с использованием молекулярных маркеров на основе *Avr*-генов, которые непосредственно определяют поражающую способность патогена.

Avr-гены расположены в относительно небольшой части генома, свободной от генов “домашнего хозяйства” (house-keeping genes) и богатой транспозонами [3]. Эти гены кодируют белки-эффекторы, позволяющие патогену преодолеть защитную систему хозяина и нарушить физиологические процессы в организме хозяина, способствуя колонизации и поражению растения. Использование методов молекулярно-генетического анализа *Avr*-генов для обнаружения новых генотипов *P. infestans* и прогнозирования их вредоносности позволит сделать более эффективным применение устойчивых сортов и химических средств защиты картофеля и прогнозировать возможные потери урожая различных сортов картофеля.

В последние годы многие *Avr*-гены *P. infestans* были клонированы и секвенированы. Технология ПЦР для детекции *Avr*-генов стала высокоспецифичным инструментом анализа штаммов *P. infestans*. Так, Клемент (J. Clément) и др. [18] использовали ПЦР в реальном времени для различения вирулентного и авирулентного аллеля гена *Avr3a*. Намного эффективнее использовать в качестве



Рис. 1. Карта-схема мест сбора образцов патогенного материала.
Fig. 1. Schematic map for collecting samples of pathogenic material.

дескрипторов вирулентности весь доступный для анализа набор *Avr*-генов. Для этого мы впервые применили один из общедоступных методов изучения генетического полиморфизма ДНК – SSCP (single-strand conformation polymorphism, или анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма), – который ранее хорошо зарекомендовал себя при генотипировании растений, в том числе картофеля [19, 20], и микроорганизмов, включая виды *Phytophthora* [21].

Полиморфизм SSCP-паттернов возникает вследствие различной подвижности молекул ДНК при электрофорезе в неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ), вызванной различной конформацией ПЦР-фрагментов ДНК после их термической и химической денатурации в случае нуклеотидных замен (мутаций) в целевом гене. Валидация SSCP-паттернов путем секвенирования составляющих их индивидуальных электрофоретических полос, которые соответствуют аллелям *Avr*-генов, позволяет в дальнейшем их использовать в качестве надежных дескрипторов вирулентности для различения изолятов и генотипирования штаммов и линий *P. infestans*.

Ранее мы применили метод SSCP-анализа для изучения полиморфизма генов вирулентности в популяциях *P. infestans* в Московской и Ленинградской областях [22–24]. Целью этой работы было пополнение данных о сравнительном полиморфизме *Avr*-генов в популяциях *P. infestans* из Московской области и Восточной Европы (Польша), оцененных при помощи SSCP-анализа.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Патогенный материал

В качестве материала *P. infestans* использовали пораженные фитофторозом листья растений картофеля, собранные летом 2015 года в посадках на территории четырех районов Московской области (Люберецкий, Чеховский, Коломенский и Озерский районы) (рис. 1).

В общей сложности было пять точек сбора. Всего был собран и затем проанализирован 41 образец: 9 из точки 1, 11 из точки 2, 10 из точки 3, 5 из точки 4 и 6 из точки 5 (табл. 1).

Также была проанализирована польская популяция *P. infestans*, которая представлена 30 изолятами *P. infestans*, собранными летом 2016 года на территории Польши. Геномная ДНК этих изолятов была любезно предоставлена нам проф. Ядвигой Сливкой (Jadwiga Anna Śliwka) из Института селекции и акклиматизации растений (Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, Młochów Research Center, Poland). В этой популяции по 9 изолятов были собраны вблизи населенных пунктов (н.п.) Сулеюв и Кажничка, 4 изолята – вблизи н.п. Млохув, 3 изолята – вблизи н.п. Ухнин, по 2 изолята – вблизи н.п. Вруциково и Бобровники и 1 изолят – вблизи н.п. Венгжце (рис. 1; табл. 1).

Выделение ДНК

Тотальную ДНК в случае российских образцов выделяли из высушенных листьев при помощи набора реагентов SILICA plant (ООО “Биоком”,

Таблица 1. Материала *P. infestans* с указанием мест сбора образцов
Table 1. Collection points of *P. infestans* samples

Место сбора	Наименование образцов*
Россия	
Точка 1 (пос. Коренево, поле ВНИИКХ)	1_КР (IIc), 2_КР (IIb), 3_КР (IIc), 5_КР (IIc), 6_КР (IIc), 9_КР (IIId), 10_КР (IIc), 12_КР (IIc), 13_КР (IIb)
Точка 2 (пос. Коренево, частный сектор)	1_КО (IIa), 2_КО (I), 4_КО (I), 6_КО (IIb), 7_КО (I), 9_КО (I), 10_КО (I), 14_КО (IIId), 17_КО (IIb), 18_КО (IIb), 20_КО (IIa)
Точка 3 (д. Масловка)	1_М (IIId), 2_М (IIId), 3_М (IIc), 5_М (IIId), 6_М (IIId), 7_М (IIId), 8_М (IIc), 9_М (I), 10_М (IIc), 11_М (IIId)
Точка 4 (пос. Поляны)	1_Р (IIId), 2_Р (IIc), 3_Р (IIc), 4_Р (IIb), 6_Р (IIId)
Точка 5 (пос. Лесное)	1_L(IIc), 2_L (I), 3_L (IIa), 4_L (IIa), 5_L (IIa), 6_L (IIa)
Польша	
Сулеюв	MP1847 (I), MP1866 (IIId), MP1844 (I), MP1864 (I), MP1846 (IIa), MP1863 (I), MP1867 (I), MP1871 (I), MP1872 (IIId)
Вруциково	MP1845 (I), MP1860 (I)
Кажничка	MP1848 (I), MP1850 (I), MP1851 (IIa), MP1852 (I), MP1853 (I), MP1854 (I), MP1855 (I), MP1856 (I), MP1857 (I)
Млохув	MP1849 (I), MP1859 (I), MP1861 (IIId), MP1868 (I)
Бобровники	MP1858, MP1862 (IIId)
Ухнин	MP1865, MP1869 (I), MP1870 (I)
Венгжце	MP1873 (IIId)

* *Примечание:* В скобках указан номер кластера.

* *Note:* Cluster number is given in parentheses.

Россия) по протоколу производителя. Тотальную ДНК польских изолятов *P. infestans* выделяли из ФТА-карт (Fitzco/Flinders Technology Agreement – запатентованная технология сбора, транспортировки, очистки и архивирования нуклеиновых кислот; <https://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=108827546>), на которые она была предварительно нанесена для транспортировки. Нашими коллегами из Польши также было проведено несколько ПЦР с аналогичными праймерами и оставшейся ДНК для подтверждения сохранности ДНК после транспортировки и выделения.

ПЦР амплификация *Avr*-генов

Полиморфизм четырех *Avr*-генов: *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a* и *ipiO* – исследовали методом ПЦР с использованием специфических праймеров, обеспечивающих размер ампликона около 500 п.н., оптимальный для SSCP-анализа (табл. 2).

Реакционная смесь для амплификации объемом 10 мкл содержала 1 мкл 10× ПЦР-буфера, 50–100 нг тотальной ДНК, 1 мкл 2.5 мкМ dNTPs, по 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. Таq ДНК-полимеразы (“Синтол”, Россия) и стерильную воду. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, США).

SSCP-анализ

Протокол SSCP-анализа *Avr*-генов был оптимизирован и описан нами ранее [22–24]. В кратком изложении, полученные в результате ПЦР ампликоны денатурировали с помощью формамида при температуре 95°C и разделяли в неденатурирующем 8%-ном ПААГ. Электрофорез проводили в течение 4.5 ч в 0.5× ТВЕ-буфере (45 мМ Tris, 45 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА, рН 8.3) при 4°C и напряжении 200 В. Для детекции фрагментов ДНК гели инкубировали в 300 мл раствора красителя SYBR Green I (Sigma-Aldrich, США) в 0.5× ТВЕ-буфере и фотографировали в ультрафиолете (длина волны 312 нм).

Построение дендрограммы

Для построения дендрограммы использовали программу SplitsTree 4.14.8.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результатом SSCP-анализа являются наборы зон электрофоретической подвижности (ДНК-фрагментов), так называемые паттерны, которые характеризуют полиморфизм изучаемых генов. В предыдущих исследованиях [23] мы выявили паттерны генов *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a* и *ipiO* *P. infestans*,

Таблица 2. Последовательности праймеров для амплификации *Avr*-генов и температура их отжига
Table 2. Primer sequences for amplification of *Avr* genes and their annealing temperature

<i>Avr</i> -ген	Праймер		Длина фрагмента (п.н.)	T_m^* °C
	Название	Последовательность, 5'→3'		
<i>Avr2</i>	AVR2F4	ATGCGTCTCGCCTACATTTT	340	61
	AVR2R4	TGTCACCCTTAATTTTCAAATGC		
<i>Avr2-like</i>	avr2F6	AGGCTCTCGATCTTGTGTCY	392	61
	avr2R6	TAGCTCCTTTTGTTACCCTTACTTTGT		
<i>Avr3a</i>	Avr3aSF	GTTTAATGTGGCTGCGTTG	239	53
	Avr3aR	CTGAAAACATAATATCCAGTGA		
<i>ipiO</i>	IPIOF	CATCCAAGATTCGCTTTCTGTCTCG	266	63
	IPIO1R	GCTTATCGGCGTCTCTCCGG		

* *Примечание:* Температура отжига.

* *Note:* Annealing temperature.

подтвердили их воспроизводимость, а также определили нуклеотидные последовательности составляющих их зон электрофоретической подвижности. Этим паттернам были присвоены соответствующие номера (рис. 2).

В проанализированных нами образцах *P. infestans* для всех генов обнаружены паттерны из числа ранее выявленных, за исключением гена *ipiO*, для которого у польских изолятов выявлен новый паттерн, ранее не встречавшийся в образцах российской популяции (рис. 2). В целом, распределение паттернов *Avr*-генов заметно отличается для российской и польской популяций (рис. 3).

Так, в случае гена *Avr2* у российских образцов преобладает паттерн 3, а изоляты из Польши пред-

ставлены паттернами 2 и 3 приблизительно поровну. Наиболее яркие отличия характерны для гена *Avr2-like*, где польские изоляты представлены паттернами 1, 2, 3, в то время как в образцах из России паттерны 1 и 2 полностью отсутствуют, а преобладает паттерн 4, который в польской популяции не обнаружен. Сходная картина наблюдается и для гена *Avr3a*: в польских изолятах паттерн 3 этого гена выявляли с высокой частотой, в то время как в российских образцах он встречается редко, как и паттерн 1, который не обнаружен в польской популяции *P. infestans*. Для гена *ipiO* распределение паттернов 1, 2 и 3 в российской и польской популяциях оказалось практически одинаковым, но, как отмечалось выше, среди польских об-

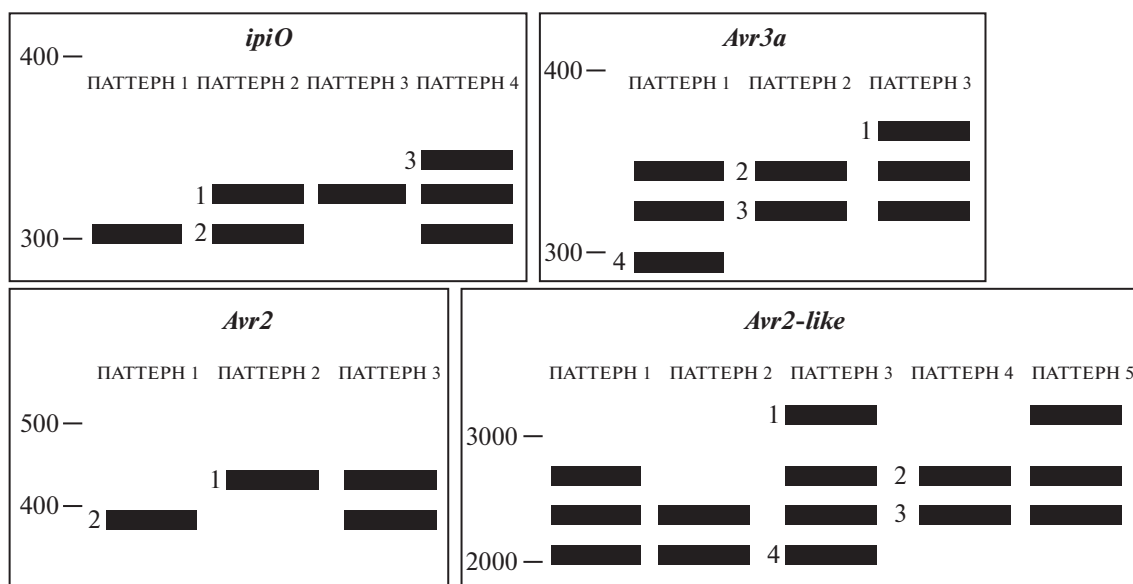


Рис. 2. SSCP-паттерны генов вирулентности *P. infestans*.
Fig. 2. Polymorphic SSCP patterns of *P. infestans* *Avr* genes.

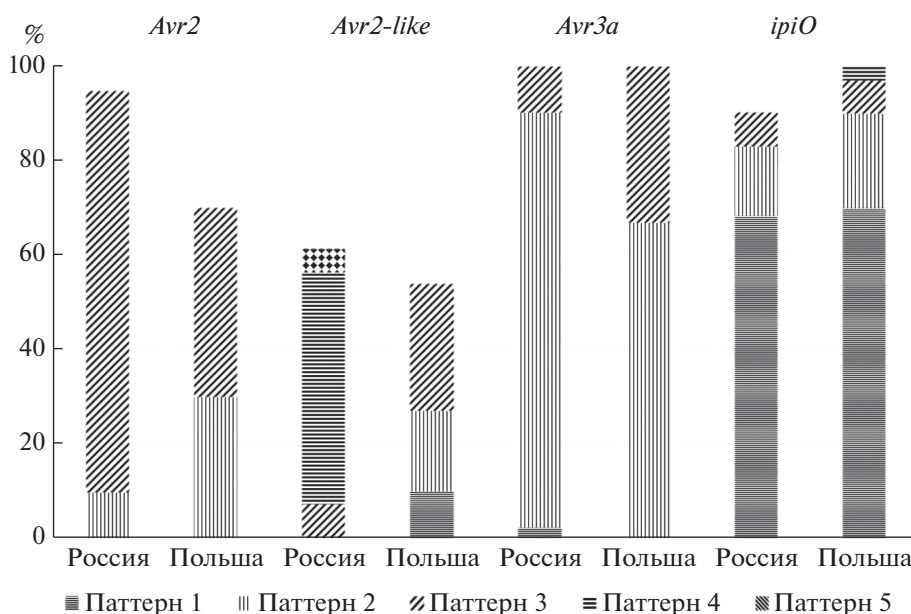


Рис. 3. Частота встречаемости SSCP-паттернов Avr-генов в изученных образцах *P. infestans*.
Fig. 3. Frequency of Avr SSCP-patterns in *P. infestans* samples under study.

разцов для одного обнаружен новый “польский” паттерн 4 этого гена.

На основе полученных SSCP-паттернов методом ближайших соседей построена дендрограмма, в которой сопоставлены российские и польские образцы (рис. 4).

Как видно на этой дендрограмме, в целом российские и польские изоляты *P. infestans* сформировали свои отдельные кластеры, однако восемь российских образцов оказались в “польском” кластере, а 10 образцов из Польши попали в “российский” кластер. Заметим, что российские образцы кластеризовались в основном в соответствии с их географическим происхождением, образуя в “российском” кластере субкластеры для каждой точки сбора образцов. Исключение составили образцы, собранные в точке 2 и в точке 4, которые не формировали своего субкластера, а распределились по кластерам, образованным образцами из других точек. В том числе из восьми российских образцов, попавших в “польский” кластер, шесть оказалось из точки 2. Следовательно, популяция *P. infestans* в точке 2 оказалась самой полиморфной. Это можно объяснить тем, что точка 2 и точка 4 представляют собой посадки картофеля в частном секторе, где, вероятно, не проводили систематические мероприятия по защите растений и выращивали сорта картофеля с разными наборами R-генов. Все это создавало благоприятные условия для разнообразия *P. infestans*.

Распределение польских изолятов на дендрограмме практически не связано с географическим положением точек их сбора. Это может свиде-

тельствовать об однородности польской популяции *P. infestans*.

Таким образом, при помощи SSCP-анализа мы установили, что российская и польская популяции *P. infestans* существенно различаются между собой на уровне полиморфизма Avr-генов; при этом польская популяция является географически более однородной, чем российская, для которой характерно разделение на обособленные субпопуляции даже на территории только Московской области. Эти результаты согласуются с ранее полученными нами данными о том, что российская популяция *P. infestans* из Ленинградской области отличается от западноевропейской популяции по аллельному составу Avr-генов [23]. В проведенном нами сравнительном исследовании мы еще раз подтвердили обособленный характер и независимую динамику российской популяции *P. infestans*. Наблюдаемая картина может быть связана с тем, что в России используют семена картофеля, как произведенные в различных регионах, так и ввезенные из-за рубежа. Значительную часть картофеля выращивают на приусадебных участках, где его посадки не защищены от фитофтороза. Другим фактором может быть перенос популяции с воздушными течениями на территории России. В Польше перенос патогена из соседних стран ограничен из-за интенсивной химической защиты растений.

Дальнейшим направлением исследований в этой области может стать расширение круга изучаемых Avr-генов и попытка установить взаимосвязь между полиморфизмом этих генов и по-

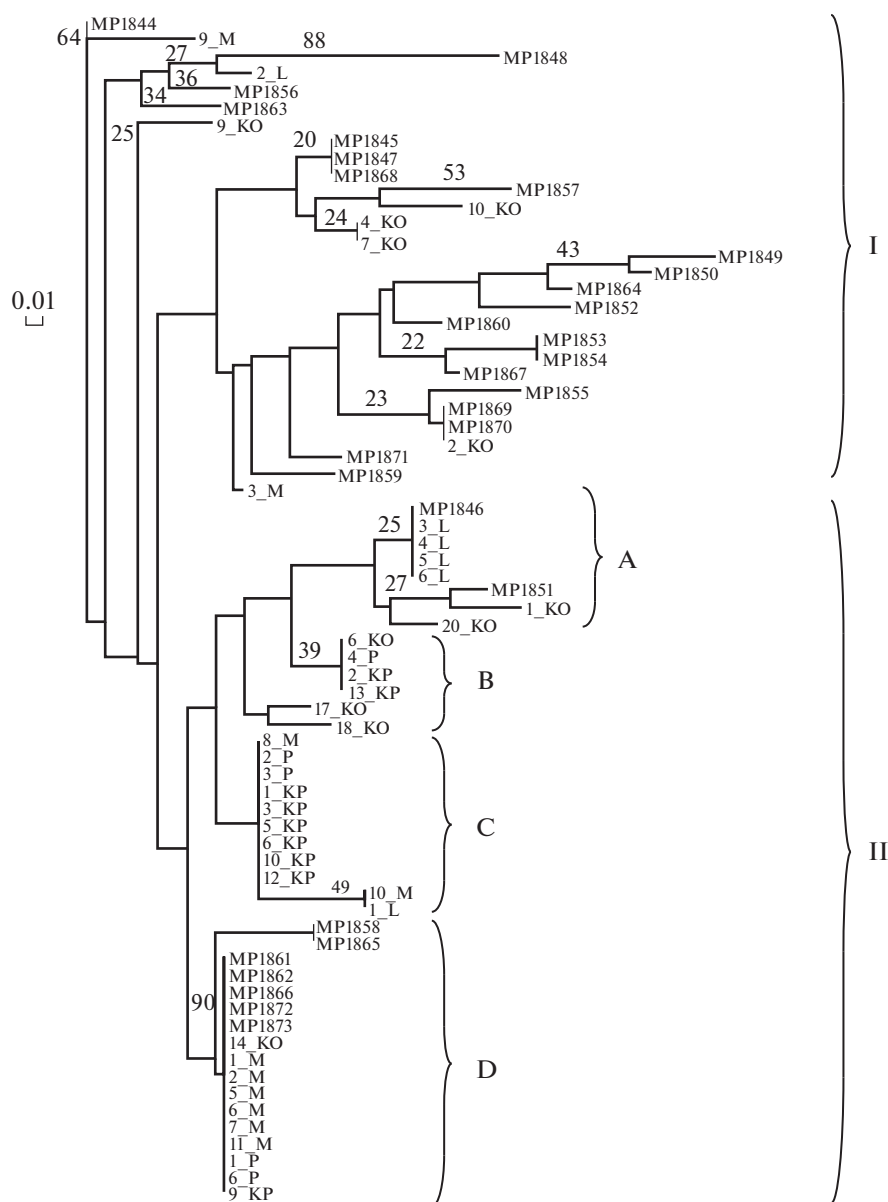


Рис. 4. Дендрограмма образцов *P. infestans* по данным SSCP-анализа. Дендрограмма построена в программе SplitsTree4 с помощью математической матрицы, методом ближайших соседей (NJ). Бутстреп 1000 п.н. Число образцов – 70, число полиморфных локусов – 11. Римскими цифрами обозначены кластеры; А, В, С, D – обозначение субкластеров (см. табл 1).

Fig. 4. The phylogenetic analysis of SSCP patterns of *P. infestans*. The phylogenetic tree was built in the SplitsTree4 software using a mathematical matrix array by the neighbor-joining (NJ) method. Bootstrap value is 1000 b.p. The number of samples is 70, the number of polymorphic loci is 11. Clusters are denoted by Roman numerals; A, B, C, D – designation of subclusters (see Table 1).

лиморфизмом других маркеров, традиционно используемых в популяционных исследованиях *P. infestans*. Установление такой связи позволит привлечь к сравнению данные исследований популяций *P. infestans*, полученные другими научными группами по всему миру и за много лет.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Госзадания 0431-2022-0004.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Leesutthiphonchai W., Vu A.L., Ah-Fong A.M.V., Judelson H.S. How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease. *Phytopathology*, 2018, 108(8), 916–924. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA>

2. Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S., Bain R.A., Cooke L.R., Etherington G.J., Deahl K.L., Farrer R.A., Gilroy E.M., Goss E.M., Grünwald N.J., Hein I., MacLean D., Kamoun S. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog.*, 2012, 8(10), e1002940. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002940>
3. Fry W.E. *Phytophthora infestans*: new tools (and old ones) lead to new understanding and precision management. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2016, 54, 529–547. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095951>
4. Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 1971, 9(1), 275–296.
5. Malcolmson J.F., Black W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. And their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de bary. *Euphytica*, 1966, 15(2), 199–203. <https://doi.org/10.1007/BF00022324>
6. Zhu S., Vossen J.H., Bergervoet M., Nijenhuis M., Kodde L., Kessel G.J.T., Vleeshouwers V., Visser R.G.F., Jacobsen E. An updated conventional-and-a novel GM potato late blight R gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans*. *Euphytica*, 2015, 202(2), 219–234. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1276-0>
7. Еланский С.Н., Кокаева Л.Ю., Стацюк Н.В., Дьяков Ю.Т. Структура и динамика популяций *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза картофеля и томата. *Защита картофеля*, 2017, 3, 3–44.
8. Ayala-Usma D.A., Danies G., Myers K.L., Bond M.O., Romero-Navarro J.A., Judelson H.S., Restrepo S., Fry W.E. Genome-wide association study identifies SNP markers associated with mycelial growth (at 15, 20 and 25°C), mefenoxam resistance and mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 2020, 110, 822–833. <https://doi.org/10.1094/PHTO-06-19-0206-R>
9. Cooke D.E.L., Lees A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathol.*, 2004, 53(6), 692–704. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01104.x>
10. Hansen E., Hesse C., Reeser P.E., Sutton W., Winton L. Using single strand conformational polymorphisms (SSCP) to identify *Phytophthora species* in Oregon forests affected by sudden oak death. *Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our knowledge. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-196*. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agriculture, 2006, 196, 141–142.
11. Martin F.N., Zhang Y., Cooke D.E.L., Coffey M.D., Grünwald N.J., Fry W.E. Insights into evolving global populations of *Phytophthora infestans* via new complementary mtDNA haplotype markers and nuclear SSRs. *PLoS One*, 2019, 14(1), e0208606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208606>
12. Goodwin S.B., Drenth A., Fry W.E. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans*. *Curr. Genet.*, 1992, 22(2), 107–115. <https://doi.org/10.1007/BF00351469>
13. Forbes G.A., Goodwin S.B., Drenth A., Oyarzun P., Ordoñez M.E., Fry W.E. A global marker database for *Phytophthora infestans*. *Plant Dis.*, 1998, 82(7), 811–818. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.7.811>
14. van der Lee T., Tesla A., Robold J., Testa A., van't Klooster J.W., Govers F. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics*, 2001, 157(3), 949–956. <https://doi.org/10.1093/genetics/157.3.949>
15. van der Lee T., Tesla A., Robold J., Testa A., van't Klooster J.W., Govers F. High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements. *Genetics*, 2004, 167(4), 1643–1661. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.029652>
16. 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. Methods*, 2013, 92(3), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.11.021>
17. EuroBlight workshop. About Pathogen Monitoring. Monitoring *Phytophthora infestans* in Europe. <https://agro.au.dk/forskning/internationale-plat-forme/euroblight/pathogen-monitoring/about-pathogen-monitoring>
18. Clément J.A.J., Baldwin T.K., Magalon H., Glais I., Gracianne C., Andrivon D., Jacquot E. Specific detection and quantification of virulent/avirulent *Phytophthora infestans* isolates using a real-time PCR assay that targets polymorphisms of the *Avr3a* gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2013, 56(5), 322–332. <https://doi.org/10.1111/lam.12047>
19. Liechti-Gallati S., Schneider V., Neeser D., Kraemer R. Two buffer PAGE system-based SSCP/HD analysis: a general protocol for rapid and sensitive mutation screening in cystic fibrosis and any other human genetic disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, 1999, 7(5), 590–598. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200338>
20. 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. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000251>
21. 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. [https://doi.org/10.1016/S1087-1845\(03\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S1087-1845(03)00052-5)
22. 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. <https://doi.org/10.7868/S0016675817120037>
23. Martynov V., Chizhik V., Sokolova E., Kyznetsova M., Khavkin E. Polymorphism of avirulence genes in potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* as characterized by SSCP analysis. *Agri Gene*, 2019, 13, 100093. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2019.100093>
24. Мартынов В.В., Чижик В.К. Изучение полиморфизма генов семейства *ipiO* оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в популяции Московской области при помощи SSCP-анализа. *Генетика*, 2021, 57(4), 403–411. <https://doi.org/10.31857/S0016675821040081>

SSCP Analysis of Virulence Genes for Studying *Phytophthora infestans* Populations

V. K. Chizhik^a and V. V. Martynov^{a, #}

^aAll-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia

[#]e-mail: martynov.vik@gmail.com

Abstract—Potato late blight disease caused by the oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary remains the most important economic and social problem of potato growing. In molecular studies of late blight, special attention is paid to the virulence genes (*Avr*) of the causative agent of this disease. These genes encode effector proteins that allow the pathogen to overcome the host's defense system; therefore, analysis of the composition and polymorphism of the *Avr* genes makes it possible to assess the virulence and aggressiveness of *P. infestans* strains and changes in the genetic diversity of pathogen populations. The methods of molecular genetic analysis of *Avr* genes for the early detection of new *P. infestans* strains and the assessment of the harmfulness of these strains when infecting potato varieties carrying known resistance genes to *P. infestans* will make it possible to enhance the effect of chemical pesticides and predict possible yield losses of these varieties during the epidemic development of late blight. Using a simple and reliable SSCP (single-strand conformation polymorphism) analysis, we investigated the polymorphism of *P. infestans* virulence genes in populations of this pathogen from Russia and Poland and revealed differences between these populations.

Keywords: SSCP analysis, *Phytophthora infestans*, *Avr* genes, allelic polymorphism

Свидетельство о регистрации средства массовой информации
 ПИ № ФС77-75946 от 13 июня 2019 г., выдано Федеральной службой по надзору в сфере связи,
 информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Подписано к печати 09.12.2022 г.	Формат 60 × 88 ¹ / ₈	Усл. печ. л. 14.67	Уч.-изд. л. 15.0
Тираж 117 экз.	Зак. 5774	Цена договорная	

Учредители: Федеральное государственное бюджетное учреждение
 «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»

Издатель: НИЦ "Курчатовский институт", 123182, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1
 Изготовитель оригинал-макета ООО "ТЕМАТИЧЕСКАЯ РЕДАКЦИЯ",
 125252, г. Москва, ул. Зорге, д. 19, этаж 3, помещ. VI, комн. 44
 Отпечатано в типографии «Book Jet» (ИП Коняхин А.В.),
 390005, г. Рязань, ул. Пушкина, 18, тел. (4912) 466-151

16+