ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 4, с. 403–411

ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 574.2:577.2

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *ipiO* ООМИЦЕТА *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary В ПОПУЛЯЦИИ МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПРИ ПОМОЩИ SSCP-АНАЛИЗА

© 2021 г. В. В. Мартынов[1, 2, *], В. К. Чижик[2]

[1]Московский государственный областной университет, Московская область, Мытищи, 141014 Россия

[2]Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, Москва, 127550 Россия

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

Поступила в редакцию 18.05.2020 г.
После доработки 01.07.2020 г.
Принята к публикации 08.07.2020 г.

Изучен полиморфизм первичной структуры генов семейства *ipiO* в популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. В качестве метода оценки полиморфизма использовали SSCP-анализ. В результате при помощи этого метода удалось различить классы генов семейства *ipiO* и установить, что изучаемые образцы имели один из трех вариантов генотипа *ipiO* в зависимости от комбинации у них генов этих классов. Выявленные генотипы оказались распределены в проанализированной популяции *P. infestans* Московской области с неодинаковой частотой. Кроме того, было показано, что картофельная и томатная субпопуляции *P. infestans* также различаются по частотам встречаемости выявленных генотипов.

Ключевые слова: популяция, полиморфизм, гены вирулентности, *Phytophthora infestans*, SSCP-анализ.

DOI: 10.31857/S0016675821040081

Фитофтороз относится к числу наиболее вредоносных заболеваний картофеля и томатов. Его возбудителем является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Чтобы инфицировать растительные клетки, *P. infestans* секретирует так называемые эффекторные белки. Основная роль этих эффекторных белков заключается в подавлении базальной защитной реакции хозяина, что позволяет патогену развиваться в тканях растения. Однако эффекторные белки могут распознаваться R-белками растения-хозяина, которые взаимодействуют с эффекторами согласно модели ген–на–ген, в результате этого взаимодействия развивается гиперчувствительный ответ и растение сохраняет устойчивость к патогену. Таким образом, эффекторы действуют как факторы вирулентности/авирулентности. Эффекторные белки в геноме *P. infestans* кодируются генами вирулентности (*Avr*-генами), а R-белки растения – генами устойчивости (*R*-генами). “Гонка вооружений” между патогеном и хозяином и их коэволюция привели к возникновению значительного полиморфизма генов *Avr*. За последнее время в геноме *P. infestans* было обнаружено множество генов вирулентности, кодирующих белки, принадлежащие к семейству RXLR-dEER эффекторов [1]. К числу таких генов относятся гены семейства *ipiO*. Это семейство является очень полиморфным. Так у *P. infestans* было выявлено 13 вариантов последовательностей гена *ipiO*, которые на основании различий в их первичной структуре были разделены на три класса (I, II и III) [2]. Наиболее полиморфным является класс I, который включает в себя 10 вариантов, класс II содержит два варианта, а класс III представлен всего одним вариантом *ipiO4* [2]. Варианты гена *ipiO*, относящиеся к классу I, распознаются соответствующим геном устойчивости растения (ген *Rpi-blb1*), т.е. в функциональном отношении являются авирулентными [2, 3], в то время как продукт гена *ipiO4* (класс III) избегает распознавания, и таким образом этот вариант является вирулентным [4, 5]. Кроме того, было показано, что изоляты, у которых отсутствуют варианты класса I, являются вирулентными на растениях, имеющих ген *Rpi-blb1*, а вариант *ipiO4* не только сам избегает распознавания, но и подавляет гиперчувствительный ответ, возникающий в результате распознавания генов *ipiO* класса I продуктом гена *Rpi-blb1* [3, 6]. Варианты, относящиеся к классу II, в функциональном отношении проявляют себя неоднозначно. Было показано, что такие варианты вызывают гиперчувствительный ответ при агробактериальной коинфильтрации с геном *Rpi-blb1*, но в естественных условиях штаммы *P. infestans*, содержащие только варианты генов *ipiO* класса II, не вызывают гиперчувствительного ответа у растений, име-

ющих в своем геноме ген *Rpi-blb1*. Из приведенных выше данных видно, что полиморфизм генов семейства *ipiO* тесно связан с их функцией, и набор этих генов у штаммов *P. infestans* может оказывать влияние на вирулентность и агрессивность этих штаммов. Поэтому изучение полиморфизма генов семейства *ipiO* является важным не только с научной, но и с практической точки зрения, так как сведения об этом полиморфизме будут способствовать более эффективной борьбе с фитофторозом. Однако полиморфизм генов этого семейства был изучен лишь на небольшой коллекции европейских изолятов [2, 7], а также у изолятов, собранных на территории Центральной и Северной Америки и Юго-Восточной Азии [4], а для российских популяций *P. infestans* такие исследования не проводились. Поэтому цель настоящей работы – изучение полиморфизма первичной структуры генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области.

Изучение генетического полиморфизма можно проводить различными способами. Одним из таких способов является SSCP-метод, основанный на анализе одноцепочечного конформационного полиморфизма (single-strand conformation polymorphism). Этот простой метод анализа позволяет определить являются ли фрагменты ДНК идентичными по своей нуклеотидной последовательности, не прибегая к их секвенированию [8, 9]. Метод SSCP-анализа был применен нами для изучения структурного полиморфизма генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве материала *P. infestans* использовали пораженные фитофторозом листья растений картофеля, собранные летом 2015 г. на территории четырех районов Московской области (Люберецкий, Чеховский, Коломенский и Озерский), и пораженные фитофторозом листья растений томатов, собранные в то же время и в тех же точках на территории Коломенского, Озерского и Чеховского районов (рис. 1). В общей сложности было пять точек сбора, в трех из которых образцы были собраны как с растений картофеля, так и с растений томатов. Каждый образец собран с индивидуального растения. Они находились друг от друга на расстоянии примерно 10 м. Всего было собрано и затем проанализировано 37 образцов пораженных растений картофеля (семь из точки 1, десять из точки 2, десять из точки 3, четыре из точки 4 и шесть из точки 5) и 10 образцов пораженных растений томатов (четыре из точки 3, два из точки 4 и четыре из точки 5). Таким образом, в общей сложности было собрано и проанализировано 47 образцов. Чтобы подтвердить, что растение поражено именно фитофторозом, для экспресс-определения *P. infestans* в полевых условиях использовали тест-набор производства фирмы ООО “Ген-контроль”. Собранные листья высушивали и хранили в виде гербария для последующего выделения из них препарата тотальной ДНК. Пригодность гербарных образцов для выделения из них ДНК *P. infestans* известна из литературы [10].

Выделение ДНК

Тотальную ДНК выделяли из гербарных образцов при помощи набора реагентов “SILICA plant” производства ООО компании “Биоком” по протоколу фирмы-производителя. Для выделения тотальной ДНК брали фрагмент высушенного листа растения площадью примерно 1 см^2.

Условия ПЦР

Поскольку семейство генов *ipiO* является высокополиморфным, а функциональные различия наблюдаются только между отдельными классами, для амплификации генов этого семейства в препаратах тотальной ДНК нами были подобраны праймеры на участки последовательностей генов *ipiO*, консервативные для всех трех классов. Кроме того, поскольку класс III этого семейства генов представлен только одним геном *ipiO4*, нуклеотидная последовательность которого достаточно сильно отличается от последовательностей других генов этого семейства, нами был сконструирован обратный праймер для специфичной амплификации именно этого варианта гена. Таким образом, ПЦР-амплификацию проводили с консервативными праймерами IPIOF 5-CATCCAAGATTCGCTTTCTGTCT-3 и IPIOR 5-GCTTATCGGCGTCTCTCCGG-3, а для специфичной амплификации гена *ipiO4* вместо праймера IPIOR использовали праймер IPIO4R 5-GGATGCTTGTTCTTGTAGCTAGC-3. Программа амплификации для обеих реакций была следующей: 94°C, 3 мин; 35 циклов (94°C, 30 с; 63°C, 30 с; 72°C, 1 мин), финальный синтез 72°C, 5 мин. Объем реакционной смеси составлял 25 мкл. На одну реакцию брали 50 нг тотальной ДНК. Для амплификации использовали прибор GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, Inc., США). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1%-ном агарозном геле в 0.5× TBE-буфере.

SSCP-анализ

Для изучения полиморфизма генов *ipiO* применяли SSCP-анализ. SSCP (single-strand conformational polymorphism) анализ представляет собой метод, основанный на способности одноцепочечных молекул ДНК образовывать уникальные вторичные структуры, конформации которых зависят от их

Рис. 1. Карта-схема мест сбора образцов в Московской области. Точка 1 – п. Коренево, поле ВНИИКХ; точка 2 – п. Коренево, частный сектор; точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

нуклеотидной последовательности. Замены в нуклеотидной последовательности изменяют вторичную структуру молекулы, что приводит к изменению ее подвижности в неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Такие изменения в электрофоретической подвижности указывают на полиморфизм последовательности ДНК. При помощи SSCP-анализа можно обнаружить одиночные нуклеотидные замены в относительно коротких последовательностях (ампликонах), и этот способ широко используется для решения различных задач, связанных с выявлением полиморфизма первичной структуры ДНК, в том числе в фитопатологических исследованиях [11–14]. Для перевода ДНК в одноцепочечное состояние используют термическую и химическую денатурацию, после чего проводят разделение в ПААГ. В настоящем исследовании протокол анализа был следующим: к 1.5–4 мкл ПЦР-продукта добавляли семь объемов денатурирующего буфера (95% формамида, 0.05% бромфенолового синего, 0.05% ксилен цианола, 20 мМ ЭДТА) и инкубировали в течение 10 мин при температуре 95°С. Затем образцы немедленно помещали в лед и наносили на 8%-ный ПААГ (40 : 1 акриламид : бис-акриламид). Электрофоретическое разделение проводили в 0.5× TBE-буфере при температуре 4°С и напряжении 200 В в течение 4.5 ч. Детекцию результатов электрофореза проводили путем окрашивания геля красителем SYBR Green I с последующей визуализацией в ультрафиолете.

Клонирование и секвенирование

Для определения нуклеотидных последовательностей зон электрофоретической подвижности, обнаруженных по результатам SSCP-анализа, эти зоны вырезали из геля, элюировали TE-буфером, клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) по протоколу фирмы-производителя, которым трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма DH5α, и секвенировали по пять клонов для каждого образца (по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Inc.) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc.)) согласно инструкциям производителя. Надежность прочтения при секвенировании подтверждали тем, что каждый клон секвенировали в двух по-

Таблица 1. Частоты выявленных генотипов *ipiO* в разных точках сбора у образцов *P. infestans*, собранных с растений картофеля

Классы гена *ipiO*	Доля образцов (%) с выявленными генотипами				
	точка 1	точка 2	точка 3	точка 4	точка 5
Класс I	100	50	100	100	33
Классы I и II	0	20	0	0	67
Класс II	0	30	0	0	0

Примечание. Точка 1 – п. Коренево, поле ВНИИКХ; точка 2 – п. Коренево, частный сектор; точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

вторностях с прямого и обратного праймеров, и полученные таким образом сиквенсы для каждого клона были идентичны по нуклеотидной последовательности. В общей сложности было получено десять нуклеотидных последовательностей десяти клонов (по пять клонов для каждой из двух зон электрофоретической подвижности).

Математическая обработка данных

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы Clustal Omega, доступной на сервере http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/, с последующим анализом результатов этого выравнивания при помощи программы GeneDoc. Производные аминокислотные последовательности были получены с помощью программы EditSeq. Для построения дендрограммы использовали метод минимальной эволюции в программе MEGA 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате ПЦР-амплификации препаратов тотальной ДНК 47 образцов с праймерами, специфичными по отношению к консервативным участкам генов семейства *ipiO P. infestans*, во всех образцах был получен продукт ожидаемой длины – 266 пн. SSCP-анализ полученных ампликонов показал, что в исследуемой популяции полиморфизм генов семейства *ipiO* представлен двумя зонами электрофоретической подвижности – “нижней” и “верхней”, и эти две зоны дают три варианта генотипа-паттерна (рис. 2). Клонирование и секвенирование этих зон показало, что они действительно являются структурными гомологами гена *ipiO*. Эти нуклеотидные последовательности были зарегистрированы нами в базе данных GeneBank NCBI под номерами MH450292 и MH450293 соответственно. Мы сравнили полученные последовательности с известными вариантами гена *ipiO*, относящимися к трем классам семейства этого гена. Результаты сравнения представлены в виде дендрограммы (рис. 3). На этой дендрограмме видно, что полученная нами последовательность нижней зоны относится к классу I гена *ipiO* и наиболее гомологична варианту *ipiO6*, с которым она образует общий кластер, в то время как последовательность верхней зоны образует общий кластер с вариантами *ipiO3* и *ipiO13*, которые принадлежат к классу II. Таким образом, выявляемые с помощью SSCP-анализа три варианта генотипов можно охарактеризовать так: содержащий только гены *ipiO* класса I (паттерн 1); содержащий гены *ipiO* класса I и класса II (паттерн 2); содержащий только гены *ipiO* класса II (паттерн 3). Вариант гена *ipiO4*, который является единственным представителем класса III, в нашем исследовании обнаружен не был.

Вышеуказанные генотипы распределены в проанализированной популяции *P. infestans* Московской области с неодинаковой частотой. Так, наиболее часто встречающимся оказался генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I. Он был обнаружен у 60% образцов (28 образцов). Вторым по распространенности оказался генотип, содержащий гены *ipiO* класса I и класса II. Этот генотип имели 23% образцов (11 образцов). Наиболее редким был генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, он был выявлен у 17% образцов (восемь образцов).

При этом встречаемость данных генотипов в разных точках сбора отличалась от общей для популяции и существенно различалась у образцов, собранных с растений картофеля, и образцов, собранных с томатов. Так, в случае образцов, полученных с растений картофеля (табл. 1), все образцы из точек 1, 3 и 4 (п. Коренево, поле ВНИИКХ; д. Масловка; п. Поляны) имели одинаковый генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I. Образцы из точки 2 (п. Коренево, частный сектор) были представлены всеми тремя генотипами, при этом частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса I, была немного ниже средней по популяции, а частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса II, почти в 2 раза превышала частоту этого варианта для всей популяции. Образцы из точки 5 (п. Лесное) были представлены двумя генотипами – содержащим только гены *ipiO* класса I и содержащим гены *ipiO* класса I и класса II. В этой точке частота встречаемости генотипа, содержащего гены *ipiO* класса I и класса II, почти в

3 раза превышала среднюю по популяции, а частота генотипа, содержащего только гены *ipiO* класса I, напротив была в 2 раза ниже средней по популяции. Также было проанализировано распределение этих генотипов в каждой из трех точек сбора образцов с растений томатов. Результаты этого анализа приведены в табл. 2. Все образцы из точки 4 (п. Поляны) были представлены генотипом, содержащим только гены *ipiO* класса II. У образцов, собранных в точке 3 (д. Масловка), генотип, содержащий гены *ipiO* класса I и класса II, и генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, были представлены поровну, а генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, обнаружен не был. Среди образцов, собранных в точке 5 (п. Лесное), преобладали образцы с генотипом, содержащим гены *ipiO* класса I и класса II. Генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, встречался значительно реже, а генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, также не был обнаружен в этой точке сбора.

Таким образом, было установлено, что картофельная и томатная популяции *P. infestans* существенно различаются по частотам выявленных генотипов *ipiO* (табл. 3). Главным, обращающим на себя внимание, различием является то, что ни у одного из образцов *P. infestans*, собранных на томатах, не был обнаружен генотип, содержащий только гены *ipiO* класса I, который наиболее распространен среди образцов, полученных с картофеля. И наоборот, самый редкий у картофельных образцов генотип, содержащий только гены *ipiO* класса II, у образцов, полученных с растений томатов, встречался в 50% случаев, а другие 50% образцов были представлены генотипом, содержащим гены *ipiO* класса I и класса II, который у картофельных образцов также встречается достаточно редко.

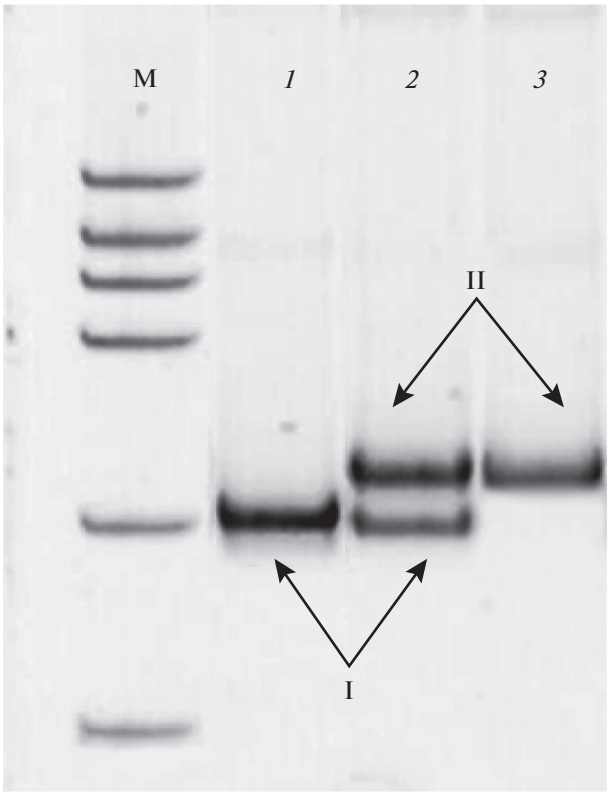

Рис. 2. Полиморфизм генов семейства *ipiO*, выявляемый при помощи SSCP-анализа. M – маркер молекулярной массы; *1*, *2*, *3* – выявляемые электрофоретические паттерны генов *ipiO*; I и II – зоны, соответствующие классу I и классу II генов *ipiO* соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

При помощи метода SSCP-анализа нам удалось изучить полиморфизм генов семейства *ipiO* оомицета *P. infestans* в популяции этого патогена в Московской области. Для этого с использованием специфичных праймеров для ПЦР-амплификации генов данного семейства мы проанализировали 47 образцов тотальной ДНК полевых образцов *P. infestans*, собранных на территории Московской области. В результате SSCP-анализа полученных ампликонов были выявлены две зоны электрофоретической подвижности, которые в разных комбинациях образуют три паттерна, характеризующих полиморфизм генов семейства *ipiO* у изученных образцов. Метод SSCP-анализа достаточно широко применяется для изучения генетического полиморфизма [15], в том числе и у патогенов [11–14], однако ни в одном из известных исследований их авторы не пытались установить молекулярную природу наблюдаемого полиморфизма. В своем исследовании мы отсеквенировали каждую из двух наблюдаемых зон электрофоретической подвижности и установили, что нуклеотидные последовательности этих зон различаются между собой и соответствуют последовательностям генов *ipiO*, принадлежащих двум разным классам этого семейства. Таким образом, мы установили, что наблюдаемый электрофоретический полиморфизм не является артефактным, а действи-

Таблица 2. Частоты выявленных генотипов *ipiO* в разных точках сбора у образцов *P. infestans*, собранных с растений томатов

Классы гена *ipiO*	Доля образцов (%) с выявленными генотипами		
	точка 3	точка 4	точка 5
Класс I	0	0	0
Классы I и II	50	0	75
Класс II	50	100	25

Примечание. Точка 3 – д. Масловка; точка 4 – п. Поляны; точка 5 – п. Лесное.

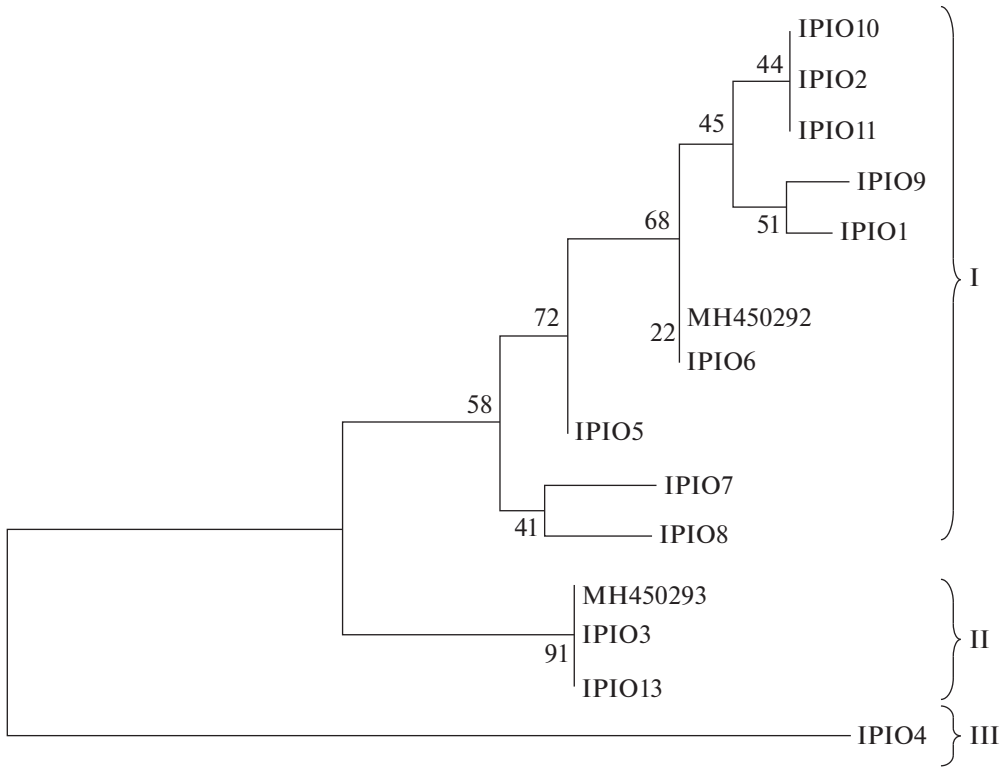

Рис. 3. Дендрограмма нуклеотидных последовательностей генов семейства *ipiO*. I, II, III – классы семейства *ipiO*; MH450292 и MH450293 – регистрационные номера последовательностей “нижней” и “верхней” зон соответственно, в базе данных NCBI; IPIO1–IPIO11, IPIO13 – известные варианты генов *ipiO*, зарегистрированные в базе данных NCBI под номерами PHTIPI01D, PHTIPI02C, GQ371190, GQ371191, GQ371192, GQ371193, GQ371194, GQ371195, GQ371196, GQ371197, GQ371198, GQ371200 соответственно.

тельно обусловлен различиями в нуклеотидных последовательностях образующих его зон, причем эти различия соответствуют структурным особенностям генов *ipiO* класса I и класса II. Поэтому в дальнейшем при оценке полиморфизма генов семейства *ipiO* выявленные паттерны мы рассматривали как генотипы, содержащие варианты генов *ipiO* класса I и класса II, и оценивали частоты их встречаемости среди образцов изучаемой популяции.

Преобладание в популяции *P. infestans* Московской области генотипов, содержащих гены *ipiO* класса I, согласуется с литературными данными, полученными для других популяций. Так, в работе Vleeshouwers et al. [16] есть указание на то, что гены *ipiO* класса I широко распространены в большинстве европейских и североамериканских популяций *P. infestans*, хотя точные данные о процентном соотношении генов *ipiO* разных классов в этой работе не приводятся. Кроме того, другими авторами была отмечена редкая встречаемость гена *ipiO4* класса III [4], который в нашем исследовании вообще обнаружен не был.

Таблица 3. Различия в частотах выявленных генотипов *ipiO* у образцов *P. infestans*, собранных с растений картофеля и растений томатов

Классы гена *ipiO*	Доля образцов (%) с выявленными генотипами	
Класс I	76	0
Классы I и II	16	50
Класс II	8	50

Такое преобладание генов *ipiO* класса I можно объяснить тем, что в то время как большинство генов устойчивости картофеля к фитофторозу были интрогрессированы в культурные сорта из дикорастущего вида *Solanum demissum* [17], ген *Rpi-blb1*, распознающий именно варианты гена *ipiO* класса I, был интрогрессирован из другого дикого вида *S. bulbocastanum* [18, 19], который был включен в селекционные программы сравнительно недавно, и поэтому этот ген устойчивости еще редко встречается в возделываемых в России сортах картофеля. Как следствие, в отличие от большинства других известных генов вирулентности *P. infestans*, представленных в популяциях этого патогена вирулентными формами, ген *ipiO* представлен в основном своими авирулентными вариантами, образующими самый многочисленный

класс I этого семейства генов. Поэтому на основе полученных данных можно сделать вывод о том, что широкое внедрение в практику сельского хозяйства сортов картофеля, содержащих в своем геноме ген устойчивости *Rpi-blb1*, является перспективным подходом в борьбе с фитофторозом, так как большинство изолятов *P. infestans* имеют в своем геноме варианты гена *ipiO*, распознаваемые этим геном устойчивости.

В то же время все три выявленные варианты генотипа *ipiO* имели неодинаковую распространенность в исследованной популяции *P. infestans*. Эти генотипы были представлены в точках сбора в разных процентных соотношениях (табл. 1). Такое распределение можно объяснить тем, что источником распространения инфекции *P. infestans* являются клубни, а также растительные остатки в почве, кучи выбракованных клубней, перезимовавшие в почве ооспоры и близость посадок картофеля к томатам. Кроме того, в Московской области возделывается картофель, привезенный из разных нецентрализованных источников. Таким образом, подмосковные популяции возбудителя фитофтороза представлены множеством клонов и отличаются высоким разнообразием [20]. Кроме того, генотип растения-хозяина также является фактором отбора для патогена. И даже в том случае если растение-хозяин имеет другие гены устойчивости, не отвечающие за распознавание эффектора ipiO, то они могут косвенно влиять на отбор тех или иных вариантов гена *ipiO*, которые в геноме *P. infestans* могут быть сцеплены с вирулентными формами других *Avr*-генов. Поэтому, например, в точке 2, расположенной в частном секторе п. Коренево, могло выращиваться много различных сортов, на которых паразитировала *P. infestans*, содержащая все три варианта генотипа *ipiO*, в то время как в точке 1, находящейся в поле ВНИИКХ, скорее всего, возделывался один сорт, и все образцы из этой точки имели один вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I.

Также мы выявили различия в частотах встречаемости вариантов генотипа *ipiO* между картофельной и томатной субпопуляциями *P. infestans* в Московской области (табл. 3). У "томатных" образцов полностью отсутствует вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I, а у "картофельных" образцов в четырех из пяти точек сбора отсутствует вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса II (табл. 1 и 2). Различия в частотах проявляются даже в одной точке сбора. Наиболее ярко выраженное различие наблюдается в точке 4, где все "картофельные" образцы имеют вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса I, а все "томатные" образцы – вариант генотипа, содержащий только гены *ipiO* класса II (табл. 1 и 2). В отличие от картофеля молекулярная генетика устойчивости к фитофторозу у томата изучена довольно слабо. Так, у томата картировано шесть генов устойчивости к фитофторозу, интрогрессированных в культурные формы из дикорастущего вида *S. pimpinellifolium*, и из этих шести генов нуклеотидная последовательность известна только для одного гена *Ph-3* [21]. При этом известно, что близкие структурные гомологи некоторых генов устойчивости к фитофторозу картофеля у томата выполняют другие функции. В частности, гомолог гена *R3a* картофеля ген *I2* у томата отвечает за устойчивость к *Fusarium oxysporum* [22, 23], а гомолог гена *Rpi-blb2* картофеля ген *Mi-1* у томата придает устойчивость к нематодам, тле и белокрылке [24]. В связи с таким положением дел ничего не известно и о собственно "томатных" эффекторах *P. infestans*, кодирующих их генах вирулентности и полиморфизме этих генов. В то же время было показано, что томатная и картофельная популяции *P. infestans* различаются между собой по ряду признаков, таких как соотношение типов спаривания, расовый состав, устойчивость к металаксилу, спектры изоферментов пептидазы, гаплотипы митохондриальной ДНК, профиль SSR-маркеров [25–28]. Мы в своем исследовании впервые установили, что картофельная и томатная субпопуляции *P. infestans* различаются на молекулярном уровне также и по составу *Avr*-генов. Возможно, на томате у *P. infestans* отбор идет по каким-то генам, которые сцеплены с определенными вариантами генов *ipiO*. Молекулярно-генетический аспект взаимодействия *P. infestans* с растением-хозяином в случае томата требует дальнейших исследований.

Таким образом, в настоящей работе впервые выполнено популяционно-генетическое изучение полиморфизма генов семейства *ipiO P. infestans* на молекулярном уровне при помощи метода SSCP-анализа. Была показана применимость этого метода для указанной цели и выявлены территориальные особенности распределения полиморфизма генов семейства *ipiO* в популяции *P. infestans* в Московской области, а также связь наблюдаемого полиморфизма с видом растения-хозяина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комплексного плана научных исследований "Развитие селекции и семеноводства картофеля".

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C. et al.* Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // Nature. 2009. V. 461.

№ 7262. P. 393–398.
https://doi.org/10.1038/nature08358

2. *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 Interactions. 2009. V. 22. № 12. P. 1535–1545.
https://doi.org/10.1094/MPMI-22-12-1535
3. *Chen Y., Liu Z., Halterman D.A.* Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O // PLoS Pathogens. 2012. V. 8. № 3. P. e1002595.
https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002595
4. *Halterman D.A., Chen Y., Sopee J.* Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance // PLoS One. 2010. V. 5. № 5. P. e10536.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010536
5. *Chen Y., Halterman D.A.* Determination of virulence contribution from *Phytophthora infestans* effector IPI-O4 in a resistant potato host containing the *RB* gene // Physiol. and Mol. Plant Pathol. 2017. № 100. P. 30–34.
https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2017.05.006
6. *Chen Y., Halterman D.A. Phytophthora infestans* effectors IPI-O1 and IPI-O4 each contribute to pathogen virulence // Phytopathology. 2017. V. 107. № 5. P. 600–606.
https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-16-0240-R
7. *Thilliez G.J., Armstrong M.R., Lim T.Y. et al.* Pathogen enrichment sequencing (PenSeq) enables population genomic studies in oomycetes // New Phytologist. 2019. V. 221. № 3. P. 1634–1648.
https://doi.org/10.1111/nph.15441
8. *Kakavas V.K., Plageras P., Vlachos T.A.* PCR–SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases // Mol. Biotechnol. 2008. V. 38. № 2. P. 155–163.
https://doi.org/10.1007/s12033-007-9006-7
9. *Sunnucks P., 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. V. 9. № 11. P. 1699–1710.
10. *Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R.* PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // Nature. 2001. V. 411. № 6838. P. 695–697.
https://doi.org/10.1038/35079606
11. *Nahiyan A.S.M., Boyer L.R., Jeffries P., Matsubara Y.* PCR-SSCP analysis of Fusarium diversity in asparagus decline in Japan // Eur. J. Plant Pathol. 2011. V. 130. P. 197–203.
https://doi.org/10.1007/s10658-011-9745-y
12. *Hansen E., Hesse C., Reeser P. et al.* Using single strand conformational polymorphisms (SSCP) to identify *Phytophthora* species in Oregon forests affected by sudden oak death // Proc. Sudden Oak Death Second Sci. Symp.: 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. P. 141–142.
13. *Hong C., Gallegly M.E., Richardson P.A., Kong P. Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status // Mycologia. 2011. V. 103. № 2. P. 351–360.
https://doi.org/10.3852/10-058
14. *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 // Phytopathology. 2009. V. 99. № 4. P. 390–403.
https://doi.org/10.1094/PHYTO-99-4-0390
15. *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. V. 98. № 7. P. 1061–1067.
https://doi.org/10.3732/ajb.1000251
16. *Vleeshouwers V.G.G.A., Rietman H., Krenek P. et al.* Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes // PLoS One. 2008. V. 3. № 8. P. e2875.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002875
17. *Gu B., Cao X., Zhou X. et al.* The histological, effectoromic, and transcriptomic analyses of *Solanum pinnatisectum* reveal an upregulation of multiple NBS-LRR genes suppressing *Phytophthora infestans* infection // Intern. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 9. P. 3211.
https://doi.org/10.3390/ijms21093211
18. *Song J., Bradeen J.M., Naess S.K. et al.* Gene *RB* cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight // PNAS. USA. 2003. V. 100. № 16. P. 9128–9133.
https://doi.org/10.1073/pnas.1533501100
19. *Van Der Vossen E.A.G., Sikkema A., Hekkert B. te L. et al.* An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato // The Plant J. 2003. V. 36. № 6. P. 867–882.
https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01934.x
20. *Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y. et al.* Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East // Phytopathology. 2001. V. 149. P. 605–611.
https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2001.00642.x
21. *Zhang C., Liu L., Wang X. et al.* The *Ph-3* gene from *Solanum pimpinellifolium* encodes CC-NBS-LRR protein conferring resistance to *Phytophthora infestans* // Theor. Applied Genet. 2014. V. 127. № 6. P. 1353–1364.
https://doi.org/10.1007/s00122-014-2303-1
22. *Huang S., Van Der Vossen E.A.G., Kuang H. et al.* Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato // The Plant J. 2005. V. 42. № 2. P. 251–261.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02365.x
23. *Dey S., Ghose K., Gangopadhyay G., Basu D.* Assessment of genomic diversity of wild and cultivated tomato through resistance gene analogue polymorphism and *I2* homologues // Euphytica. 2007. V. 154. № 1–2. P. 219–230.
https://doi.org/10.1007/s10681-006-9290-5
24. *Van Der Vossen E.A.G., Gros J., Sikkema A. et al.* The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an *Mi-1* gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato // The Plant J. 2005. V. 44. № 2. P. 208–222.
https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02527.x
25. *Кузнецова М.А., Стацюк Н.В., Рогожин А.Н. и др.* Мониторинг изолятов *Phytophthora infestans*, выделенных с картофеля и томатов в Московской обла-

сти (2009–2017 гг.) // Достижения науки и техники АПК. 2018. Т. 32. № 3. С. 28–33.
https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10306

26. *Elansky S.N., Pobedinskaya M.A., Kokaeva L.Y. et al. Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: Genotypic structure and metalaxyl resistance // J. Plant Pathol. 2015. V. 97. № 3. P. 449–456.
https://doi.org/10.4454/JPP.V97I3.020
27. *Kröner A., Mabon R., Corbière R. et al.* The level of specialization of *Phytophthora infestans* to potato and tomato is a biotrophy-related, stable trait // BioRxiv. 2019. 571596.
https://doi.org/10.1101/571596
28. *Cohen Y., Rubin A.E., Galperin M. et al.* Migration and selection enforced multiple phenotypic and genotypic changes in the population of *Phytophthora infestans* in Israel during the last 36-year period // Preprints. 2020. 2020010321.
https://doi.org/10.20944/preprints202001.0321.v1

The Study of Polymorphism of the *ipiO* Gene Family in Oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary in the Moscow Region Population Using SSCP Analysis

V. V. Martynov[a, b, *] and V. K. Chizhik[b]

[a]*Moscow Region State University, Moscow region, Mytishchi, 141014 Russia*
[b]*All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, 127550 Russia*
**e-mail: martynov.vik@gmail.com*

The goal of this study was to investigate the polymorphism of the primary structure of *ipiO* genes in the population of *P. infestans* from the Moscow region. To this end we used SSCP analysis as anefficient method for assessing polymorphism. As a result, using this technique, we could distinguish between the classes of the *ipiO* gene family and establish that the studied samples had one of three variants of the *ipiO* genotype depending on the combination of genes of these classes. Identified genotypes were found to be distributed in the analyzed population of *P. infestans* in the Moscow region with an unequal frequency. In addition, it was shown that potato and tomato subpopulations of *P. infestans* also differ in the frequency of occurrence of the identified genotypes.

Keywords: population, polymorphism, virulence genes, *Phytophthora infestans*, SSCP analysis.