

Биотехнология растений

УДК 635.21:631.524: 582.281.144

DOI: 10.18384/2310-7189-2018-3-110-124

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЯ ФИТОФТОРОЗА КАРТОФЕЛЯ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

**Соколова Е.А.¹, Кузнецова М.А.², Рогожин А.Н.², Демидова В.Н.², Уланова Т.И.²,
Сметанина Т.И.², Рогозина Е.В.³, Хавкин Э.Е.¹**

¹ Всероссийский институт сельскохозяйственной биотехнологии
127550, Москва, ул. Тимирязевская, 42, Российская Федерация

² Всероссийский институт фитопатологии
143050, Московская обл., Одинцовский р-н, р.п. Большие Вяземы,
ул. Институт, вл. 5, Российская Федерация

³ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР)
190000, Санкт-Петербург, ул. Б. Морская, 42-44, Российская Федерация

Аннотация. Фитофтороз (возбудитель – оомицет *Phytophthora infestans* Mont. de Bary) остается первостепенной экономической проблемой производства картофеля. Молекулярный скрининг генов (а)вирулентности патогена (*Avr* генов) и генов устойчивости растений к *P. infestans* (*Rpi* генов) позволяет предсказать изменения в составе популяции патогена и предположить, какие сорта картофеля пострадают в первую очередь. Для оценки разнообразия изолятов, которое определяется миграцией патогена, мы сравнили генотипы в изолятах *P. infestans*, собранных в 2013-2015 гг. в коллекционных посадках межвидовых гибридов картофеля в Пушкинских лабораториях ВИР и в коммерческих посадках картофеля в нескольких регионах России. Присутствие двух типов спаривания, A1 и A2, также способствует увеличению разнообразия за счет половой рекомбинации. Молекулярные методы были использованы для генотипирования образцов патогена и определения типа спаривания и состава *Avr* генов. Результаты молекулярных исследований сопоставили с такими фенотипическими характеристиками, как тип спаривания, устойчивость к металаксилу, состав факторов вирулентности, выявляемых с помощью растений-дифференциаторов, и агрессивность в тесте с клубнями картофеля.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, фитофтороз картофеля, SSR генотипирование, A1/A2 тип спаривания, факторы вирулентности, *Avr* гены вирулентности *P. infestans*, *Rpi* гены устойчивости к *P. infestans*.

© СС ВУ Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Демидова В.Н., Уланова Т.И., Сметанина Т.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е., 2018.

MOLECULAR METHODS OF RESEARCH AND MONITORING OF LATE BLIGHT PATHOGEN *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

E. Sokolova¹, M. Kuznetsova², A. Rogozhin², V. Demidova², T. Ulanova², T. Smetanina², E. Rogozina³, E. Khavkin¹

¹ All-Russian Research Institute of Agricultural Biotechnology
ul. Timiryazevskaya, 42, Moscow, 127550, Russian Federation

² All-Russian Research Institute of Phytopathology
ul. Institut, vl. 5, r.p. Bol'shie Vyazemy, Odintsovskii r-n, Moscow region, 143050, Russia

³ Federal Research Center the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), ul. Bol'shaya Morskaya, 42-44, St. Petersburg, 190000, Russia Federation

Abstract. The oomycete *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, the casual agent of the late blight, still remains the main cause resulting in economic problems for potato growers. Molecular screening of (a)virulence genes of the pathogen (*Avr* genes) and plant genes for resistance to *P. infestans* (*Rpi* genes) would help monitor the changes in the pathogen populations and predict the most vulnerable potato varieties. To assess variation in isolates due to pathogen migration, we compared *P. infestans* genotypes in the isolates sampled in 2013-2015 in the Pushkin collection of interspecific hybrids (St. Petersburg) and in the commercial potato stands in several regions of Russia. The presence of two mating types, A1 and A2, also promotes pathogen variation due to sexual recombination. Molecular methods were employed for genotyping pathogen samples and assessing their mating type and *Avr* gene profiles. These molecular indices were related to such phenotypic characteristics as mating type, metalaxyl resistance, virulence factors tested with the differential plants and aggressiveness in the potato tuber test.

Key words: *Phytophthora infestans*, potato late blight, SSR genotyping, A1/A2 mating types, virulence factors, *Avr* avirulence genes of *P. infestans*, *Rpi* genes for resistance to *P. infestans*.

Введение

Фитофтороз, возбудителем которого является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, является наиболее серьезной агрономической и экономической проблемой картофелеводства. В результате эволюции и миграции патогена его популяции обнаруживают значительный фенотипический полиморфизм, который резко возрастает при половом размножении. В последние годы проблема фитофтороза обострилась в связи с появлением агрессивных рекомбинантных генотипов *P. infestans* (13_A2 и др.), поражающих те сорта картофеля, которые до этого времени считались устойчи-

ми. Особенностью *P. infestans* является поразительная скорость эволюции генов вирулентности (*avirulence* genes, *Avr* гены), расположенных в тех областях генома, которые бедны house-keeping генами, но богаты мобильными элементами. *Avr* гены кодируют белки-эффекторы, которые и являются агентами патогенеза. Отбор *Avr* генов в популяции *P. infestans* также тесно связан с составом генов устойчивости к *P. infestans* (*Rpi* генов) в колонизируемой популяции растений. *Rpi* гены эволюционируют за счет дупликации и рекомбинации, однако много медленнее, чем *Avr* гены. В результате создание новых коммерческих сортов

картофеля отстает от появления новых патотипов *P. infestans*, которые быстро «преодолевают» устойчивость этих сортов, вызывая эпидемии фитофтороза [9; 10; 11].

Быстрые изменения расового состава популяций *P. infestans* делают особенно важным надежный мониторинг посадок картофеля. Молекулярные методы характеристики патогена позволяют сделать этот мониторинг более оперативным. Обязательным элементом разработки технологии молекулярного мониторинга патогена является валидация используемых приемов путем сопоставления молекулярных и традиционных фитопатологических методов.

В этом сообщении приведены результаты такого сопоставления на материале изолятов *P. infestans*, собранных в 2013-2015 гг. в полевой коллекции ВИР (Пушкин, С. Петербург) и в различных регионах России.

Условия, материалы и методы

Листья, пораженные фитофторозом, собирали в 2013-2015 гг. с сортов и межвидовых гибридов картофеля, растущих в полевой коллекции ВИР (Пушкин, С. Петербург), и в коммерческих посадках картофеля в нескольких регионах России. В работе было проанализировано 19 изолятов, 18 монозооспоровых линий из Пушкина и 16 изолятов из регионов. Листья с некротическими пятнами помещали между срезами клубней соответствующих генотипов картофеля и в таком виде перевозили в Институт фитопатологии. Далее, кусочки зараженных листьев помещали между стерилизованными ломтиками клубней восприимчивого сорта картофеля сорта Bintje, свобод-

ного от известных *Rpi* генов, и инкубировали 3–4 дня при 18–20 °С. Фрагменты проросшего сквозь ломтики мицелия помещали на агаризованную овсяную среду. Чистые культуры сохраняли при 5 °С и один раз в месяц пересевали на ту же среду. Поскольку на одном растении могут поселиться два и более штамма патогена, из изолятов, собранных с индивидуальных растений в пушкинской коллекции в 2015 г., были выделены монозооспоровые линии. Более подробное описание микробиологических методов изолирования генотипов *P. infestans* можно найти в публикациях [1; 17].

Вирулентность изолятов и линий *P. infestans* определяли на отделенных долях листьев среднего яруса растений [18], используя набор растений-дифференциаторов из Международного Картофельного Центра (CIP, Lima, Peru), распознающий 22 патотипа *P. infestans* (гены вирулентности *r*, R_1 – R_{11} и их различные сочетания). Чтобы сгруппировать изоляты и линии *P. infestans* по этому признаку методом филогенетического анализа, мы использовали алгоритм Neighbor Joining и пакет программы Statistica 8.

При определении типа совместимости изоляты и линии *P. infestans* высевали в чашки Петри на ржано-овощной агар на расстоянии 4-5 см друг от друга попарно с тестерными штаммами: 2К и 48К (соответственно, А1 и А2 тип спаривания). После инкубации в течение 14 дней в темноте при 18 °С с помощью светового микроскопа определяли наличие или отсутствие ооспор в месте контакта гиф, принадлежащих А1 или А2 типу. В том случае, когда исследуемый штамм образовывал ооспоры с обоими тестерами, этот штамм

учитывали как A1A2; если ооспоры появлялись в монокультуре, штамм считали самофертильным.

Для изучения устойчивости изолятов и линий *P. infestans* к металаксилу в чашки Петри на бумажные фильтры, смоченные дистиллированной водой (контроль) или фунгицидом в концентрации 1, 10 и 100 мг/л, помещали по 10 дисков (3×10 мм) из клубней картофеля сорта *Santé*. На каждый диск наносили каплю (10 мкл) суспензии зооспорангиев тестируемого изолята или линии. После инкубации в темноте при 18–20 °С в течение 6–7 дней регистрировали спороношение. Изолят или линию считали чувствительным(ой) к металаксилу (susceptible, S), если спороношение было полностью подавлено при концентрации фунгицида 1 мг/л, слабоустойчивым (intermediately resistant, IR), если спороношение происходило при 1–10 мг/л, но отсутствовало при 100 мг/л, и устойчивым (resistant, R), если споры появлялись даже при концентрации 100 мг/л.

Уровень агрессивности линий *P. infestans* определяли в тесте с клубнями картофеля, как описано ранее [1].

Геномную ДНК выделяли из мицелия *P. infestans* с помощью набора Axy-Prep Multisource Genomic DNA Mini-prep Kit (Axygen Biosciences, США). Концентрацию ДНК определяли с помощью UV/Vis NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия). Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ PTC-200 (Bio-Rad, США). Для определения типа спаривания использовали CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) маркер W16 [13]. Генотипирование изолятов и линий *P. infestans* проводили методом SSR (simple sequence repeats) по 12 локусам [15]. Гены

авирулентности *Avr2* [12], *Avr3a* [4], *Avr4* [19] и *Avr-blb1 = ipiO* [7] амплифицировали в соответствии с протоколами указанных выше авторов, ампликоны очищали с помощью QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия), клонировали с использованием pGEM-T Easy Vector System I (Promega, США) и секвенировали на анализаторе нуклеиновых кислот ABI PRISM 3130xl или Нанофоре 05. Все ПЦР праймеры были синтезированы ЗАО Синтол (Москва). Секвенирование фрагментов ДНК проводили в Центре коллективного использования оборудования ВНИИ-ИСБ «Биотехнология».

Результаты и обсуждение

Генотипы P. infestans. SSR профили изолятов и линий патогена, обнаруженных на растениях картофеля в коллекции ВИР в Пушкине и в коммерческих посадках картофеля [17], обнаруживают географические различия и значительные изменения по годам (рис. 1). В целом по всей проанализированной за три года выборке изолятов *P. infestans* мы обнаружили от 34 до 40 аллелей в 12 SSR локусах, от 2 до 6 аллелей на локус. Локусы D13, G11, Pi63, Pi02/SSR3, SSR4, SSR6 и SSR11 оказались наиболее полиморфными (табл. 1). Сравнение наших результатов с данными других исследователей [8; 9] свидетельствует о заметных различиях SSR профилей генотипов *P. infestans*, выявленных на европейской территории России и в Западной и Центральной Европе. Уже на этом этапе исследования мы выделили характерные аллели, прежде всего в наиболее полиморфных локусах D13, G11, Pi63, Pi02/SSR3, SSR4, SSR6 и SSR11, по которым различают-

ся две географически удаленные группы генотипов *P. infestans*; эти аллели выделены в табл. 1 полужирным шрифтом. Вероятно, эти аллели станут надежными дескрипторами, на основе которых будет создана классификация изолятов, необходимая для мониторинга распространения патогена на европейской территории нашей страны.

SSR профили изолятов из пушкинской коллекции заметно изменились с 2013-2015 гг. (табл. 1, рис. 1); эти изоляты отличались от тех, которые были

собраны в коммерческих посадках картофеля за пределами пушкинской коллекции. Изоляты, собранные с различных гибридов картофеля и в разные годы, значительно различались. Различия между генотипами *P. infestans*, колонизирующими пушкинскую коллекцию и коммерческие посадки картофеля, можно объяснить влиянием завозного семенного материала во втором случае. Существенные изменения состава популяции *P. infestans* в пушкинской коллекции, возможно, указывают на миграцию патогена.

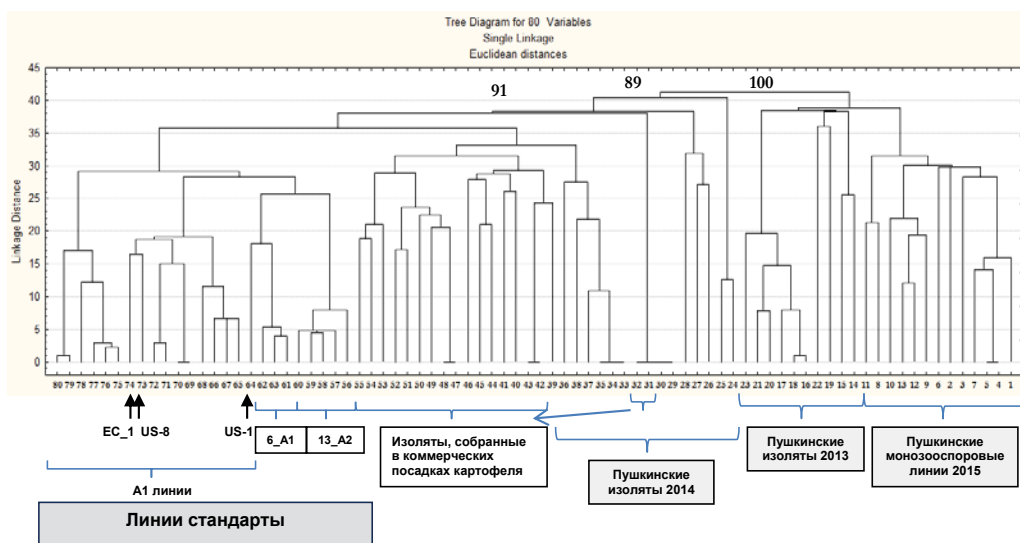


Рис. 1. Филогенетический анализ изолятов *P. infestans*, собранных в Пушкине и в коммерческих посадках в европейской части России, и линий из Западной Европы и США, использованных в качестве стандартов. Дендрограмма построена методом Neighbor Joining; указаны значения бутстрепа для 1000 повторений, превышающие 0.70. 1-13 – моноспорные линии из Пушкина (2015 г.), 14-23 – изоляты из Пушкина (2013 г.); 24-30, 33-38 – изоляты из Пушкина (2014 г.); 39 – стандарт N161; 31, 32, 40-55 – изоляты, собранные в коммерческих посадках картофеля; 56-80 – линии *P. infestans* из Западной Европы и США [15], в том числе стандарты: 64 - US1_A1; 73 - US8_A2; 74 - EC1_A1.

Тип спаривания и устойчивость к металаксилу. Показатели типа спаривания при фенотипическом анализе и с помощью CAPS маркера W16 совпали в 90% случаев (табл. 2). Можно

со всей определенностью утверждать, что молекулярный метод определения типа спаривания надежен и позволяет получить результаты намного быстрее и с меньшими затратами труда,

чем традиционный фитопатологический метод. Более того, как показало недавнее исследование [6], аллель-

ный полиморфизм маркера W16 позволяет дифференцировать патотипы *P. infestans*.

Таблица 1

Изменения частот аллелей наиболее переменных SSR локусов у изолятов, собранных в Европейской части России

SSR локусы	Посадки картофеля в Пушкине (ВИП)			Коммерческие посадки картофеля, 2014-2015 гг.
	2013 г.	2014 г.	2015 г.	
	Аллели, в скобках – их частоты			
SSR11	331 (0.15) 341 (0.55) 355 (0.30)	341 (0.73) 355 (0.27)	331 (0.12) 341 (0.40) 355 (0.48)	331 (0.11) 341 (0.55) 355 (0.33)
D13	118 (0.65) 136 (0.05) 138 (0.10) 140 (0.15) 154 (0.05)	null (0.52) 118 (0.074) 134 (0.11) 136 (0.15) 152 (0.074) 154 (0.074)	118 (0.28) 134 (0.65) 136 (0.04) 154 (0.03)	136 (0.76) 138 (0.054) 140 (0.03) 142 (0.054) 152 (0.054) 154 (0.054)
G11	154 (0.10) 156 (0.05) 162 (0.20) 168 (0.65)	null (0.07) 154 (0.29) 156 (0.29) 160 (0.07) 162 (0.21) 168 (0.07)	null (0.14) 154 (0.17) 156 (0.29) 160 (0.33) 162 (0.05) 164 (0.02)	null (0.06) 142 (0.08) 154 (0.36) 156 (0.11) 160 (0.11) 162 (0.25) 164 (0.03)
Pi63	270 (0.15) 273 (0.05) 276 (0.30) 279 (0.50)	270 (0.27) 273 (0.23) 279 (0.50)	270 (0.1) 273 (0.35) 279 (0.55)	270 (0.32) 273 (0.19) 276 (0.03) 279 (0.46)
Pi02/ SSR3	258 (0.30) 266 (0.05) 268 (0.60) 270 (0.05)	258 (0.23) 266 (0.15) 268 (0.62)	258 (0.07) 268 (0.93)	258 (0.17) 268 (0.83)
SSR4	284 (0.40) 288 (0.05) 290 (0.40) 292 (0.05) 294 (0.14)	284 (0.30) 288 (0.21) 290 (0.15) 292 (0.04) 294 (0.30)	284 (0.38) 288 (0.29) 290 (0.17) 292 (0.06) 297 (0.03) 299 (0.07)	284 (0.28) 288 (0.28) 292 (0.14) 294 (0.28) 297 (0.03)
SSR6	240 (0.30) 242 (0.20) 244 (0.50)	240 (0.15) 242 (0.50) 244 (0.35)	242 (0.48) 244 (0.52)	240 (0.06) 242 (0.47) 244 (0.47)

Характерно, что в 2013 г. 60–70% изолированных в Пушкине генотипов принадлежали к А2 типу спаривания, а в 2014–2015 гг. доля А2 генотипов сни-

жалась до 30–40%. Тип А1 преобладал и в изолятах, собранных в коммерческих посадках картофеля.

Таблица 2

Определение типа спаривания у изолятов *P. infestans* фитопатологическим (Ф) и молекулярным (М) методами анализа (2013-2015 гг.)

Изоляты*	Ф	М	Изоляты	Ф	М	Изоляты	Ф	М	Изоляты	Ф	М	Изоляты	Ф	М
2-13	A2	A2	7-14	A1	A1	Лен. 17-14	A1	A1	Астр. 64-14	A1	A1	Яр. 69-15	A1	A1
4-13	A1	A1	36-14	A2	A2	Лен. 22-14	A1	A1	Астр. 65-14	A1	A1	Сверд. 72-15	A1	A1
111-13	A1A2	A2	43-14	A2	A2	Лен. 23-14	A1	A1	Тул. 71-14	A2	A2	Сверд. 81-15	A2	A2
7-13	A2	A2	82-14	A1	A1	Лен. 24-14	A1	A1	Тул. 72-14	A2	A2	Чув. 87-15	A1	A1
106-13	A1	A1	109-14	A1	A1	Лен. 28-14	A1A2	A2	Моск. 29-15	A1	A1	Чув. 98-15	A2	A2
132-13	A1A2	A2	119-14	A1	A1	Лен. 32-14	A1	A1	Моск. 51-15	A1	A1			
113-13	A1A2	A2	132-14	A2	A1	Астр. 44-14	A1A2	A2	Моск. 56-15	A2	A1			
131-13	A1	A1	28-14	A1	A2	Астр. 45-14	A1A2	A2	Моск. 59-15	A1A2	A1			
87-13	A2	A2				Астр. 60-14	A1	A1	Яр. 65-15	A2	A2			

* протокол описан подробнее ранее [1]; в нумерации изолятов второе число обозначает год отбора проб.

Примечание: Астр. – Астраханская обл.; Лен. – Ленинградская обл.; Моск. – Московская обл. ВНИИФ; Сверд. – Свердловская обл.; Тул. – Тульская обл.; Чув. – Чувашия. Яр. – Ярославская обл. Все остальные изоляты собраны в Пушкинской коллекции ВИР.

Металаксилустойчивые изоляты встречались довольно редко и были обнаружены только в Ленинградской и Свердловской областях (табл. 3).

Состав генов вирулентности. Расы (патотипы) *P. infestans* традиционно определяют по составу генов вирулентности, выявляемых с помощью набора растений-дифференциаторов, несущих гены устойчивости к фитофторозу, интрогрессированные из дикорастущего вида *Solanum demissum* [5; 16]. При филогенетическом анализе по числу и составу генов вирулентности наша выборка изолятов и линий

распалась на три больших кластера (табл. 3). В первый кластер попали формы с наименьшим средним количеством генов на изолят. Среди них выделяется субкластер 1a – патотип, лишенный генов вирулентности 1, 2 и 4, которые распространены среди других изолятов. В субкластер 1b вошли остальные изоляты и линии с небольшим числом генов вирулентности. Во второй кластер объединили патотипы с 6–9 генами, среди которых отсутствовал ген вирулентности 8. В третий кластер попали патотипы с 6–11 генами вирулентности, среди которых обя-

зательно присутствует ген 8. У изолятов 2013 г. и монозооспоровых линий, выделенных из изолятов, собранных в 2015 г., преобладали гены вирулентности, относящиеся к кластеру 3. У пушкинских изолятов 2014 г. и изолятов, выделенных в коммерческих посадках картофеля, мы находим гены, характерные для кластера 2.

Эти данные еще раз свидетельствуют о том, что миграция патогена является важным фактором формирования популяций *P. infestans*. Если географически отдаленные изоляты не слишком различаются по SSR локусам и генам вирулентности, то можно заключить, что распространение рас с зараженным семенным картофелем определяет основные различия между изолятами, собранными в пушкинских и коммерческих посадках картофеля.

Профили Avr генов. Мы провели анализ изолятов *P. infestans* по четырем генам авирулентности *Avr2*, *Avr3a*, *Avr4* и *Avr-blb1 = ipiO*. К настоящему моменту наиболее подробно исследованы два аллеля гена *Avr2* в изолятах и линиях из Пушкина и коммерческих посадках картофеля. В 2013 г. доминантный аллель *Avr2* присутствовал менее чем у половины образцов. В 2014–15 гг. оба гомолога гена *Avr2* были обнаружены примерно у 40% всех исследованных изолятов, один *AVR2* был обнаружен у 30% и один *AVR2-like* – у 20–40% образцов. Сходные соотношения аллелей описаны в работе Gilroy и др. [12]. Следует отметить, что соответствующий *AVR2-like* ген вирулентности 2, выявленный с помощью фитопатологических методов, распространен очень широко и присутствует у 75–90% исследованных образцов *P. infestans*.

Соответствие между *Avr* генами, охарактеризованными по нуклеотидной последовательности, и генами вирулентности, выявленными с помощью растений-дифференциаторов, исследовано совершенно недостаточно. В нашем случае аллельный состав четырех исследованных нами *Avr* генов мало соответствовал составу одноименных генов вирулентности, определяемых с растениями-дифференциаторами (см. табл. 3). В качестве причин такого рассогласования можно указать тот факт, что исследованные нами *Avr* гены соответствуют лишь небольшой части известных сейчас 11 генов вирулентности [20; 21]. С другой стороны, часть растений-дифференциаторов содержит более одного гена устойчивости [14]. Вдобавок использованный набор дифференциаторов не содержал генов устойчивости, характерных для видов, иных, чем *S. demissum*, например, *Rpi-blb1*, который распознает *Avr* ген *ipiO I, II* [20]. Между тем несколько таких генов присутствуют в гибридах картофеля, с которых собирали изоляты *P. infestans* [2]. Поэтому в дальнейшем необходимо расширить спектр клонируемых *Avr* генов и определить их функциональную активность.

Наши фитопатологические наблюдения не выявили связи между профилями генов вирулентности изолятов и их агрессивностью в тесте с клубнями картофеля [1].

Заключение

Наши исследования показали, что обнаруженные в Западной и Центральной Европе высокоагрессивные штаммы *P. infestans* отсутствовали в 2013–2015 гг. в посадках картофеля в Европейской части нашей страны. Метод

Таблица 3

**Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов
и монозооспоровых линий *P. infestans***

Кластер ¹	Изоляты и монозооспоровые линии	Устойчивость к металаксилу ²	AVR гены ³	Гены вирулентности	Агрессивность ⁴
Изоляты, собранные в Пушкине в 2013 г.					
2	2-13	Ч	<i>AVR2KN/avr2TV/MI</i>	12341011	н.д.
1b	4-13	Ч	<i>AVR2K</i>	234810	СА
3	111-13	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	12347891011	н.д.
2	7-13	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	124561011	н.д.
3	106-13	СУ	<i>AVR2K/avr2TV/MI</i>	12345781011	УА
2	132-13	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	12341011	УА
3	113-13	СУ	<i>avr2TV/MI</i>	1234567891011	НА
1a	131-13	СУ	<i>AVR2K /avr2MI</i> <i>IpiO I,II</i> <i>avr3aEM, avr1</i>	356781011	СА
3	87-13	СУ	<i>avr2TV/MI, IpiO I,II;</i> <i>avrSm1(avr9)</i>	1234567891011	УА
Изоляты, собранные в Пушкине в 2014 г.					
2	7-14	Ч	<i>AVR2KN/avr2TV/MI</i>	124561011	УА
2	53-14	Ч	<i>avr2TV/MI, IpiO I,II</i> <i>AvrSm1(Avr9)</i>	125671011	УА
2	36-14	Ч	<i>AVR2/avr2</i>	12345671011	УА
1b	43-14	Ч	<i>AVR2/avr2</i>	12367	СА
2	82-14	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	12345671011	ВА
2	109-14	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	12345671011	УА
2	119-14	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	12345671011	УА
2	132-14	Ч	<i>AVR2K /avr2MI</i>	12341011	УА
3	28-14	Ч	<i>AVR2K /avr2MI</i>	1234567891011	ВА
3	Стандарт N161	Ч	<i>AVR2K /avr2MI; avr1; avr3a-EM; Pex-147-2; IpiOI,II;</i> <i>avrSm1(avr9).</i>	1234567891011	УА
Монозооспоровые линии из изолятов, собранных в Пушкине в 2015 г.					
3	18/1-1 - 18/1-5	Ч	<i>AVR2K/avr2 MI</i>	1234567891011	СА-ВА
3	42/2-1 - 42/2-5	Ч	<i>AVR2K</i>	12347891011	УА
3	42/3-1; 42/3-2	Ч	<i>AVR2K/avr2TV/MI</i>	12347891011	УА-ВА
3	43/1-1 - 43/1-3	Ч	<i>AVR2K/avr2MI</i>	12347891011	СА
3	53/1-1			12345678911	УА
3	53/1-2 - 53/1-5	Ч	<i>AVR2K/avr2MI</i>	1234567891011	СА-ВА

1b	87/2-2	Ч	AVR2K/ <i>avr2TV/MI</i> <i>avr3a EM, avr4</i>	12378	YA
3	103-1 - 103-4	Ч	AVR2K/ <i>avr2MI</i> <i>avr3a EM, avr4, IpiO</i>	123467891011	CA-YA
3	107-1			123478910	CA
3	107-2	Ч	AVR2K	12347891011	HA
2	117/2-1- 117/2-2	Ч - СУ		12345791011	CA-YA
2	117/2-3	Ч	AVR2K	1235791011	CA
1b	109/1-1			123578	YA
2	109/1-2	Ч	<i>avr2MI, avr3a EM, avr4</i>	12345791011	CA
3	120-1 - 120-5.	Ч	AVR2K	12347891011	CA-BA
н.д.	11/1-1 - 11/1-5.	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	н.д.	
3	11/2-1			134781011	
3	11/2-2	Ч	<i>avr2TV/MI</i>	1234781011	CA
Изоляты из коммерческих посадок в регионах России					
3	Лен. 17-14	У	AVR2	34781011	н.д.
2	Лен. 28-14	Ч	AVR2/ <i>avr2</i>	125671011	н.д.
2	Лен. 32-14	Ч	AVR2	12345671011	н.д.
1b	Астр. 44-14	У	AVR2/ <i>avr2</i>	34711	н.д.
2	Астр. 45-14	У	AVR2/ <i>avr2</i>	34671011	н.д.
2	Тул. 71-14	У	<i>avr2</i>	1245671011	н.д.
2	Тул. 72-14	СУ	<i>avr2</i>	12345671011	н.д.
1b	Моск. 29-15	Ч	AVR2/ <i>avr2</i>	12346	н.д.
3	Моск. 51-15	Ч	AVR2/ <i>avr2</i>	123467810	н.д.
2	Моск. 56-15	Ч	<i>avr2</i>	12345671011	н.д.
2	Моск. 59-15	Ч	AVR2	12345671011	н.д.
1a	Яр. 65-15	Ч	AVR2/ <i>avr2</i>	31011	н.д.
1b	Яр. 69-15	Ч	<i>avr2</i>	2671011	н.д.
2	Сверд. 72-15	У	<i>avr2</i>	1234671011	н.д.
1b	Сверд. 81-15	У	AVR2	234511	н.д.
3	Чув. 87-15	Ч	AVR2/ <i>avr2</i>	1234781011	н.д.

¹Кластеры патотипов на основе генов вирулентности. ²Ч – чувствительный, СУ – слабоустойчивый, У – устойчивый. ³Аминокислотный полиморфизм в AVR2/*avr2* [3, 12]. ⁴Уровень агрессивности изолятов *P. infestans*: HA – неагрессивный (расчетные потери урожая менее 5%); CA – слабоагрессивный (расчетные потери урожая от 5 до 15%); YA – умеренно агрессивный (расчетные потери урожая от 16 до 35%); BA – высокоагрессивный (расчетные потери урожая более 35%) [1]; н.д. – нет данных.

SSR генотипирования обладает достаточно разрешающей способностью, хорошо различает штаммы патогена и выявляет их изменения по территории и годам наблюдений. Однако для целей мониторинга необходимо создать общепринятую классификацию восточноевропейских штаммов *P. infestans* по 12 SSR локусам, выделив ключевые дескрипторы/дискриминанты.

Молекулярный метод определения типа спаривания надежен и позволяет получить результаты намного быстрее и с меньшими затратами труда и средств, чем традиционный фитопатологический метод.

К настоящему времени нам не удалось установить соответствие между генами вирулентности, выявленными с

помощью растений-дифференциаторов, и *Avr* генами. Скорее всего, дело в том, что исследованные нами *Avr* гены соответствуют лишь части генов вирулентности [20], в свою очередь, набор дифференциаторов неполон: он не распознает *Avr* гены патогена, соответствующие нескольким важнейшим *Rpi* генам, интрогрессированным в исследованные нами гибриды из *S. stoloniferum* и других недостаточно изученных дикорастущих сородичей картофеля [2]. Фитопатологические наблюдения не выявили связи между спектром генов вирулентности изолятов и их агрессивностью. Эта проблема требует дальнейших углубленных исследований [22].

Статья поступила в редакцию 23.05.2018

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова М. А., Козловский Б. Е., Бекетова М. П. и др. Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов *Phytophthora infestans*, собранных с устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля // Микология и фитопатология. 2016. Т. 50. С. 175–184.
2. Фаина О. А., Бекетова М. П., Соколова Е. А. и др. Упреждающая селекция: использование молекулярных маркеров при создании доноров устойчивости картофеля к фитофторозу на основе сложных межвидовых гибридов // Сельскохозяйственная биология. 2017. Т. 52. № 1. С. 84–94.
3. Чижик В.К., Соколова Е.А., Мартынов В.В. Применение метода SSCP для анализа генетического полиморфизма *Phytophthora infestans* // Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль / под ред. С.С. Санина. Б. Вяземы: ВНИИФ. 2017. С. 280–287.
4. Armstrong M. R., Whisson S. C., Pritchard L. etc. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm // Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 2005. Vol. 102. Pp. 7766–7771.
5. Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute 1920-2008. // Potato Research. 2009. Vol. 52. Pp. 141–172. [Электронный ресурс]. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11540-009-9126-5> (дата обращения: 27.04.2018).
6. Brylińska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E. etc. Evaluation of PCR markers for *Phytophthora infestans* mating type determination // European Journal of Plant Pathology. 2018. [Электронный ресурс]. URL: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1445-4> (дата обращения: 27.04.2018).
7. Champouret N., Bouwmeester K., Rietman H. etc. *Phytophthora infestans* isolates lacking class I ipiO variants are virulent on *Rpi-blb1* potato // Molecular Plant–Microbe. Interactions. 2009. Vol. 22. Pp. 1535–1545. doi: 10.1094/MPMI-22-12-1535.

8. Chmielarz M., Sobkowiak S., Dezbski K. etc. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland // *Plant Pathol.* 2014. Vol. 63. Pp. 203–211. DOI: 10.1111/ppa.12076
9. Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S. etc. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen // *PloS Pathog.* 2012. 8(10): e1002940. doi:10.1371/journal.ppat.1002940
10. Du, J., Vleeshouwers, V. G. New strategies towards durable late blight resistance in potato // *The Potato Genome.* Springer, Cham. 2017. Pp. 161-169. doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_10
11. Fry W. E. *Phytophthora infestans*: New Tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. 54:22.1–22.19 . doi:10.1146/annurev-phyto-080615-095951
12. Gilroy E. M., Breen S., Whisson S. C. etc. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants // *New Phytologist.* 2011. Vol. 191. Pp. 763–776. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03736.x.
13. Judelson H. S., Spielman L. J., Shattock R. C. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans* // *Genetics.* 1995. Vol. 141. Pp. 503–512.
14. Kim H.-J., Lee H.-R., Jo K.-R., etc. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes // *Theoretical and Applied Genetics.* 2012. Vol. 124. Pp. 923–935. doi: 10.1007/s00122-011-1757-7.
15. Li Y., Cooke D. E. L., Jacobsen E. etc. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* // *Journal of Microbiological Methods.* 2013. Vol. 92. Pp. 316–322. doi: 10.1016/j.mimet.2012.11.021.
16. Malcolmson J.F., Black W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // *Euphytica.* 1966. Vol. 15. Pp. 199–203.
17. Sokolova E. A., Kuznetsova M. A., Ulanova T.I. etc. 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. No. 18. Pp. 259–267. [Электронный ресурс]. URL: www.wur.eu/AAVR (дата обращения: 27.04.2018).
18. Statsyuk N. V., Kuznetsova M. A., Kozlovskaya I. N. etc. Characteristics of the *Phytophthora infestans* population in Russia // *PPO-Special Report,* Wageningen, 2010. No 14. Pp. 247–254. [Электронный ресурс]. URL: www.wageningen.nl.UR/ppo (дата обращения: 27.04.2018).
19. van Poppel P. M. J. A., Guo J., van de Vondervoort P. J. I. etc. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector // *Molecular Plant–Microbe Interactions.* 2008. Vol. 21. Pp. 1460–1470. doi: 10.1094/MPMI-21-11-1460.
20. Vleeshouwers V. G. A. A., Raffaele S., Vossen J. H. etc. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors // *Annual Review of Phytopathology.* 2011. Vol. 49. Pp. 507–531. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095326.
21. Vossen J. H., Jo K. R., Vosman B. Mining the genus *Solanum* for increasing disease resistance // *R. Tuberosa*, ed., *Genomics of Plant Genetic Resources.* Springer Netherlands. 2014. Pp. 27–46. doi: 10.1007/978-94-007-7575-6.
22. Young, G. K., Cooke, L. R., Watson, S., Kirk, W. W., Perez, F. M., & Deahl, K. L. The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations. *Plant Pathology.* 2018 () doi.org/10.1111/ppa.12856.

REFERENCES

1. Kuznetsova M.A., Kozlovskii B.E., Beketova M.P., et al. [Phytopathological and molecular characterization of *Phytophthora infestans* isolates collected from resistant and susceptible genotypes of potato]. In: *Mikologiya i fitopatologiya* [Mycology and Phytopathology], 2016, no. 50, pp. 175–184.
2. Fadina O.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., et al. [Pre-emptive breeding: the use of molecular markers when creating a donor of the potato resistance to late blight based on complex interspecific hybrids]. In: *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya* [Agricultural biology], 2017, no. 52, pp. 84–94.
3. Chizhik V.K., Sokolova E.A., Martynov V.V. Primenenie metoda SSCP dlya analiza genicheskogo polimorfizma *Phytophthora infestans* [The application of the SSCP method for analysis of genetic polymorphisms in *Phytophthora infestans*]. In: *Epidemii boleznei rastenii: monitoring, prognoz, kontrol' / pod red. S.S. Sanina* [Epidemics of plant diseases: monitoring, forecasting, and control / Edited by S.S. Sanin]. Bol'shiye Vyazemy, VNIIF Publ., 2017, pp. 280–287.
4. Armstrong M. R., Whisson S. C., Pritchard L. et al. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. In: *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 2005, Vol. 102, pp. 7766–7771.
5. Bradshaw J.E. Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute 1920–2008. In: *Potato Research*, 2009, vol. 52, pp. 141–172.
6. Brylińska M., Sobkowiak S., Stefańczyk E. et al. Evaluation of PCR markers for *Phytophthora infestans* mating type determination. In: *European Journal of Plant Pathology*. 2018. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1445-4> (accessed: 27.04.2018).
7. Champouret N., Bouwmeester K., Rietman H. et al. *Phytophthora infestans* isolates lacking class I ipiO variants are virulent on Rpi-blb1 potato. In: *Molecular Plant–Microbe. Interactions*, 2009, Vol. 22, pp. 1535–1545.
8. Chmielarz M., Sobkowiak S., Dezbinski K. et al. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland. In: *Plant Pathol.*, 2014, Vol. 63, pp. 203–211.
9. 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. In: *PloS Pathog.*, 2012, no. 8 (10): e1002940.
10. Du, J., Vleeshouwers, V. G. New strategies towards durable late blight resistance in potato. In: *The Potato Genome*. Springer, Cham., 2017, pp. 161–169.
11. Fry W. E. *Phytophthora infestans*: New Tools (and Old Ones) Lead to New Understanding and Precision Management. In: *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2016, 54:22.1–22.19.
12. 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. In: *New Phytologist*, 2011, vol. 191, pp. 763–776.
13. Judelson H.S., Spielman L.J., Shattock R.C. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. In: *Genetics*, 1995, vol. 141, pp. 503–512.
14. 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. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, vol. 124, pp. 923–935.
15. Li Y., Cooke D. E. L., Jacobsen E. et al. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. In: *Journal of Microbiological Methods*, 2013, vol. 92, pp. 316–322.
16. Malcolmson J.F., Black W. New R genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. In: *Euphytica*, 1966, vol. 15, pp. 199–203.
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. In: Schepers H.T.A.M. (ed.). *PAGV-Special Report*. Wageningen, DLO Foundation, 2017, no 18, pp. 259–267.
18. Statsyuk N.V., Kuznetsova M.A., Kozlovskaya I.N. et al. Characteristics of the *Phytophthora infestans* population in Russia. In: *PPO-Special Report*, Wageningen, 2010, no 14, pp. 247–254.
19. van Poppel P.M.J.A., Guo J., van de Vondervoort P.J.I. et al. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. In: *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 2008, vol. 21, pp. 1460–1470.
20. Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J. H. et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. In: *Annual Review of Phytopathology*, 2011, vol. 49, pp. 507–531.
21. Vossen J.H., Jo K.R., Vosman B. Mining the genus *Solanum* for increasing disease resistance. In: *Tuberosa R., ed. Genomics of Plant Genetic Resources*. Springer Netherlands, 2014, pp. 27–46.
22. Young G.K., Cooke L.R., Watson S., Kirk W.W., Perez F.M., Deahl K.L. The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations. In: *Plant Pathology*, 2018.
-

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект 16-04-00098). Фитопатологическая оценка изолятов *Phytophthora infestans* выполнена в рамках Государственного задания 0598-2015-0018.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project 16-04-00098). Phytopathological evaluation of *Phytophthora infestans* is performed within the framework of State Task No. 0598-2015-0018.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Соколова Екатерина Андреевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии;

e-mail: katesokol83@mail.ru

Кузнецова Мария Алексеевна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий отделом болезней картофеля Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии;

e-mail: kuznetsova@vniif.ru

Рогожин Александр Николаевич – кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии;

e-mail: rogozhin@vniif.ru

Демидова Валентина Николаевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела болезней картофеля Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии;

e-mail: devalya82@mail.ru

Уланова Тамара Ивановна – технолог отдела болезней картофеля Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии;

e-mail: tamra53@mail.ru

Сметанина Татьяна Ивановна – технолог отдела болезней картофеля Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии;

e-mail: tanekhka.smetanina.58@mail.ru

Рогозина Елена Вячеславовна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела генетических ресурсов картофеля Всероссийского института генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова;

e-mail: rogozinaelena@gmail.com

Хавкин Эмиль Ефимович – доктор биологических наук, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии;

e-mail: emil.khavkin@gmail.com

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ekaterina A. Sokolova – PhD in Biological Sciences, Senior Researcher, Institute of Agricultural Biotechnology;

e-mail: katesokol83@mail.ru

Maria A. Kuznetsova – PhD in Biological Sciences, Leading Researcher, Head of Department, Institute of Phytopathology;

e-mail: kuznetsova@vniif.ru

Alexander N. Rogozhin – PhD in Agricultural Sciences, Senior Researcher, Institute of Phytopathology;

e-mail: rogozhin@vniif.ru

Valentina N. Demidova – PhD in Biological Sciences, Researcher, Institute of Phytopathology;

e-mail: devalya82@mail.ru

Tamara I. Ulanova – Technologist, Institute of Phytopathology;

e-mail: tamra53@mail.ru

Tatiana I. Smetanina – Technologist, Institute of Phytopathology;

e-mail: tanekhka.smetanina.58@mail.ru

Elena V. Rogozina – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, N.I. Vavilov Institute of Plant Genetic Resources (VIR);

e-mail: rogozinaelena@gmail.com

Emil E. Khavkin – Doctor of Biological Sciences, Head of Laboratory, Institute of Agricultural Biotechnology;

e-mail: emil.khavkin@gmail.com

ПРАВИЛЬНАЯ ССЫЛКА НА СТАТЬЮ

Соколова Е.А., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Демидова В.Н., Уланова Т.И., Сметанина Т.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Молекулярные методы исследования и мониторинга возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. 2018. № 3. С. 110–124. DOI: 10.18384/2310-7189-2018-3-110-124

FOR CITATION

Sokolova E., Kuznetsova M., Rogozhin A., Demidova V., Ulanova T., Smetanina T., Rogozina E., Khavkin E. Molecular Methods of Research and Monitoring of Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans*. In: *Bulletin of the Moscow State Regional University, Series: Natural Sciences*, 2018, no. 3, pp. 110–124.

DOI: 10.18384/2310-7189-2018-3-110-124