



На правах рукописи

Чижик Вера Константиновна

**SSCP-АНАЛИЗ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ
ФИТОФТОРОЗА *PHYTOPHTHORA INFESTANS***

Специальность: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в лаборатории ДНК маркеров растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва

Научный руководитель: **Мартынов Виктор Викторович**
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК маркеров растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Официальные оппоненты: **Еланский Сергей Николаевич**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Игнатов Александр Николаевич
доктор биологических наук, заместитель генерального директора по научной работе общества с ограниченной ответственностью Исследовательский Центр «ФитоИнженерия»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений» (ФГБНУ ВИЗР)

Защита состоится « 28 » апреля 2020 г. в «12-00» часов на заседании диссертационного совета Д 006.027.01 на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) по адресу: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 42, тел. +7(499) 976-65-44, E-mail: iab@iab.ac.ru; marat131084@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФГБНУ ВНИИСБ

Автореферат разослан « 26 » апреля 2020 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



**Халилуев
Марат Рушанович**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Фитофтороз, возбудителем которого является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, представляет собой одно из экономически наиболее важных заболеваний картофеля, которое наносит ущерб, измеряемый миллиардами долларов в год (Haverkort et al., 2008;). *P. infestans* обнаружен практически во всех регионах России, где возделывается картофель. В нашей стране практически нет сортов картофеля с высокой устойчивостью к этому патогену. Несмотря на значительные усилия, предпринятые для борьбы с фитофторозом, этот патоген все еще представляет собой серьезную угрозу для современного картофелеводства (Fry, 2015). Борьба с фитофторозом не может сводиться только к использованию химических методов защиты картофеля, так как химические методы борьбы требуют многократных дорогостоящих обработок и теряют свою эффективность в результате накопления в популяциях патогена резистентных штаммов. В этой связи особую значимость приобретают биотехнологические методы контроля фитофтороза и борьбы с ним. В частности, технология типирования штаммов *P. infestans* позволит отслеживать быстрые эволюционные изменения в популяциях патогена, приводящие к появлению новых патотипов. Используемые сегодня молекулярно-биотехнологические методы различения и генотипирования *P. infestans* основаны на дескрипторах, маркирующих те участки генома, которые непосредственно не связаны с вредоносностью патогена. Для создания сортов картофеля с высокой и долговременной устойчивостью к фитофторозу необходимы новые знания о взаимодействии полигенной системы защиты растения, к которой относятся гены устойчивости (*R* гены), с детерминантами патогенности *P. infestans*, к которым относятся гены вирулентности (*Avr* гены). Многие гены вирулентности кодируют белки эффекторы, основной функцией которых является подавление иммунитета растения (Van de Wouw and Idnurm, 2019). Определение профиля *Avr* генов может помочь различать патотипы *P. infestans*, судить об их вредоносности и тем самым предсказывать возможные потери урожая. Поэтому актуальной задачей является создание современных биотехнологических методов различения и генотипирования изолятов *P. infestans* по тем участкам генома, которые непосредственно связаны с вирулентностью. Одним из таких методов является SSCP-анализ (Single-Strand Conformation Polymorphism), основанный на выявлении SNP-зависимых изменений конформации одноцепочечной ДНК в денатурирующих условиях. Этот метод мы использовали для разработки технологии различения линий *P. infestans* на основе полиморфизма первичной структуры *Avr* генов.

Степень разработанности темы исследования. Для генотипирования линий *P. infestans* традиционно используют набор растений-дифференциаторов Мастенброка-Блэка,

несущих индивидуальные гены устойчивости к фитофторозу (Malcolmson and Black, 1966). Этот метод трудоемок и обладает существенными недостатками. В частности, многие «моногенные» растения-дифференциаторы Мاستенброка-Блэка на самом деле содержат в своем геноме более одного *R* гена, и, соответственно, расы, отобранные с использованием этих дифференциаторов, также содержат более одного *Avr* гена (Bradshaw et al., 2009; Kim et al., 2012; Zhu et al., 2015). Присутствие дополнительных *Avr* генов в так называемых простых расах *P. infestans* было показано ранее (Соколова и др., 2016; Pankin et al., 2012). Кроме того, традиционно используемый набор дифференциаторов Мастенброка-Блэка содержит только гены устойчивости, перенесенные в картофель из *Solanum demissum*, но не содержит генов, интрогрессированных в новые сорта картофеля из *S. bulbocastanum*, *S. stoloniferum*, *S. venturii* и других селекционно важных сородичей картофеля (Haverkort et al., 2016; Zhu et al., 2015).

Наряду с использованием растений-дифференциаторов и оценкой устойчивости к металаксилу (Кузнецова и др., 2018; Elansky et al., 2015), для различения и генотипирования штаммов *P. infestans* на территории Российской Федерации использовали несколько молекулярных маркеров – тип спаривания, спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы, внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2, гаплотип митохондриальной ДНК и микросателлитные (simple sequence region, SSR) спектры (Еланский., 2012; Еланский и др., 2017; Elansky et al., 2015; Sokolova et al., 2017; Statsyuk et al., 2014), однако все эти маркеры непосредственно не связаны с вирулентностью патогена. Напротив, предлагаемый нами метод различения линий *P. infestans*, основанный на полиморфизме генов вирулентности, позволяет оперативно выявить дескрипторы, непосредственно связанные с вредоносностью патогена.

Идентификация и функциональная характеристика *Avr* генов, кодирующих эффекторы *P. infestans*, является одной из быстро развивающихся областей исследования этого патогена. В частности, хорошо исследован класс RXLR генов *P. infestans*: к настоящему времени идентифицированы 11 генов этого класса: *Avr1* (Du et al., 2015a), *Avr2* и *Avr2-like* (Gilroy et al., 2011), *Avr3a* (Armstrong et al., 2005), *Avr3b* (Rietman, 2011; Wang et al., 2017), *Avr4* (van Poppel et al., 2008), *Avr-blb1 = ipiO* (Vleeshouwers et al., 2008; Champouret et al., 2009), *Avr8 = Avr-Smira2* (Rietman et al., 2012; Stefańczyk et al., 2017), *Avr-Smira1* (Rietman et al., 2012; Jo, 2013), *Avr-blb2* (Oh et al., 2009) и *Avr-vnt1* (Pel, 2010); для части *Avr* генов установлен характер взаимодействия с *R* генами. Однако механизм действия *Avr* генов в клетках растения-хозяина все еще недостаточно исследован.

Распространение некоторых *Avr* генов проанализировано на территориях, соседних с нашей страной (Stefańczyk et al., 2018), однако на территории Российской Федерации состав

Avr генов ранее не исследовали. Все это делает актуальными молекулярно-генетические исследования *Avr* генов у штаммов *P. infestans*, колонизирующих посадки картофеля в нашей стране. Набор эффекторов у патогенов постоянно изменяется в результате эволюции и коэволюции с растением-хозяином (Lo Presti et al., 2015), иными словами, растение-хозяин является важным фактором естественного отбора и эволюции для патогена (Gladieux et al., 2014; Raffaele and Kamoun, 2012). Эти процессы, вероятно, играют решающую роль в быстрой адаптации патогена к растениям-хозяевам и процессах, приводящих к эпидемическому развитию болезни.

Цели и задачи. Цель работы – создать на основе Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) анализа простой и надежный биотехнологический метод различения линий *P. infestans*, основанный на полиморфизме *Avr* генов. Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие задачи:

- оптимизировать условия ПЦР для амплификации *Avr* генов *P. infestans*;
- валидировать метод SSCP-анализа для того, чтобы превратить его в общедоступный и хорошо воспроизводимый метод быстрого различения изолятов *P. infestans* на основе полиморфизма *Avr* генов;
- клонировать *Avr* гены для определения их последовательности и сравнения с ранее охарактеризованными последовательностями тех же генов;
- исследовать изоляты *P. infestans*, собранные на Европейской территории России, и провести биоинформатический анализ полученных данных;
- сравнить состав *Avr* генов у штаммов *P. infestans* с профилями генов устойчивости у колонизированных этими штаммами растений картофеля.

Научная новизна. В настоящей работе SSCP-анализ впервые в мире использован как метод различения изолятов *P. infestans*. SSCP-анализ *Avr* генов обладает хорошей воспроизводимостью и высоким разрешением. Этот метод эффективно выявляет редкие варианты *Avr* генов, что особенно важно при появлении в агроценозах новых патотипов *P. infestans*. Полиморфизм *Avr* генов *P. infestans* на территории Российской Федерации впервые исследован в связи с составом генов устойчивости к фитофторозу у перспективных селекционных доноров – сложных межвидовых гибридов картофеля.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационного исследования характеризуют генетический полиморфизм и особенности распространения *Avr* генов возбудителя фитофтороза *P. infestans*, что позволяет использовать эти данные как технологию генотипирования штаммов *P. infestans*. SSCP-анализ позволяет различать штаммы *P. infestans*, используя дескрипторы, основанные на первичном строении *Avr* генов,

т.е. тех участков генома патогена, которые непосредственно связаны с его вредоносностью. Полученные результаты можно использовать для мониторинга популяций *P. infestans* и при создании новых устойчивых к фитофторозу сортов картофеля.

Методы исследования. Оценка устойчивости растений к фитофторозу и все работы с изолятами *P. infestans* проведены в отделе болезней картофеля и овощных культур Института фитопатологии (М.А. Кузнецова и др.). Референсные образцы ДНК американской и западноевропейских линий *P. infestans* были любезно предоставлены нам проф. Д. Куком (D.E.L. Cooke, the James Hutton Institute, Dundee, UK). Молекулярно-генетические методы, использованные в нашей работе, включали выделение тотальной ДНК из мицелия *P. infestans* и из пораженных фитофторозом листьев растений картофеля, ПЦР амплификацию выделенной ДНК, электрофоретическое разделение ампликонов, SSCP-анализ, клонирование и секвенирование фрагментов ДНК, а также анализ полученных последовательностей с помощью стандартных методов биоинформатики.

Связь работы с научно-исследовательскими программами и темами. Исследования проведены в 2017-2019 гг. в лаборатории ДНК маркеров растений ФГБНУ ВНИИСБ как часть плановой НИР 0574-2018-0010 «Исследование молекулярных механизмов устойчивости картофеля к фитофторозу» и проекта РФФИ №18-016-00144а «Структурные и функциональные особенности генов вирулентности у штаммов возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*, собранных на Европейской территории России».

Положения, выносимые на защиту.

– SSCP паттерны являются надежными маркерами полиморфизма *Avr* генов, пригодными для различения линий *P. infestans* и своевременного обнаружения новых патотипов *P. infestans*.

– Линии *P. infestans*, колонизирующие сорта и гибриды картофеля на Европейской территории Российской Федерации, существенно различаются по составу генов вирулентности.

– Связь SSCP паттернов линий *P. infestans* с устойчивостью или восприимчивостью колонизируемых форм картофеля не всегда удается выявить из-за недостаточной информации о функции *Avr* и *R* генов.

Апробация работы. Результаты исследований были представлены на V и VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологической и химической экологии» (МГОУ, Москва, 2016; 2019); Международной научной конференции «Генетика популяций: прогресс и перспективы», посвященной 80-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова и 45-летию основания лаборатории популяционной

генетики им. Ю.П. Алтухова (ИОГен, Москва, 2017); XVII–XIX Всероссийских научных конференциях молодых ученых «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии», посвященных памяти академика РАСХН Г.С. Муромцева (ВНИИСБ, Москва, 2017–2019); Международной научно-практической конференции «Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль» (ВНИИФ, Большие Вяземы, Московская обл., 2017); Международной научно-практической конференции «Современные проблемы и достижения в защите картофеля от болезней, вредителей и сорняков» (ВНИИФ, Большие Вяземы, Московская обл., 2018); Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» подсекции «Микология и альгология» и секции «Биология» (МГУ, Москва, 2018; 2019); Юбилейной конференции по микологии и микробиологии Национальной Академии Микологии (гостиница «Молодежная», Москва, 2018); Международном форуме Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Гостинный двор, Москва, 2018; 2019), 17 международной конференции Euroblight Workshop (Йорк, Великобритания, 2019).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 19 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ.

Личный вклад автора. Работа является результатом оригинальных исследований. Диссертант лично подготовил обзор литературных источников и провел основную часть молекулярно-генетических исследований, обработку полученных данных и обобщение результатов, а также активно участвовал в подготовке публикаций. Программа исследований, включая выбор необходимых методов исследований, разработана при участии научного руководителя.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 158 страницах машинописного текста и включает список сокращений, использованных в работе, введение, обзор литературы по теме исследования, методы исследования, результаты и обсуждения, заключение и выводы, а также научно-практические рекомендации и список использованной литературы, который включает 190 источников (из них 181 – на иностранном языке). Диссертация содержит 27 рисунков и 17 таблиц.

Благодарности. Автор благодарит проф. А.Н. Игнатова, который предложил использовать SSCP-анализ для изучения *Avr* генов *P. infestans*. Автор выражает признательность М.А. Кузнецовой (отдел болезней картофеля и овощных культур ВНИИ фитопатологии, ВНИИФ), которая предоставила для анализов образцы мицелия изолятов *P. infestans*, собранных в посадках картофеля, и сведения об их фитопатологической

характеристике. Автор выражает глубокую признательность научному руководителю В.В. Мартынову за постоянное внимание к данной работе и помощь в ее выполнении, а также сотрудникам лаборатории ДНК маркеров растений ВНИИСБ: Е.А. Соколовой, О.А. Муратовой и М.П. Бекетовой за поддержку и теплое отношение. Отдельно автор благодарит заведующего лабораторией ДНК маркеров растений Э.Е. Хавкина за ценные советы и замечания. Секвенирование фрагментов ДНК проводили в Центре коллективного использования оборудования ВНИИСБ «Биотехнология».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы дается подробный анализ новейшей отечественной и зарубежной научной литературы, характеризующий биологию и систематику возбудителя фитофтороза *P. infestans* и растения-хозяина картофеля, а также взаимодействие патоген – растение-хозяин на молекулярно-генетическом уровне, включая информацию о генах вирулентности *P. infestans* и генах устойчивости картофеля. Также были проанализированы современные молекулярные методы определения генетического разнообразия *P. infestans*.

Глава 2. Методы исследования

В качестве материала для исследования были использованы следующие линии *P. infestans*:

1. 20 монозооспоровых линий *P. infestans*, контрастных по SSR профилю, выделенных во ВНИИФ из изолятов, собранных на пораженных фитофторозом листьях индивидуальных растений клоновой коллекции сортов и межвидовых гибридов картофеля в полевой коллекции ВИР в Пушкине (С. Петербург) в августе 2015 г. (далее пушкинские линии) Экспериментальное поле ВИР обладает высоким инфекционным фоном, поскольку на нем не производятся обработки фунгицидами. Это обстоятельство и разнообразие *R* генов в коллекции картофеля могли привести к увеличению разнообразия *Avr* генов в популяции *P. infestans*.

2. 16 линий *P. infestans*, выделенных во ВНИИФ из изолятов, собранных на пораженных фитофторозом листьях индивидуальных растений сортов и межвидовых гибридов картофеля на поле ВНИИФ (ОПИ «Раменка») в августе 2018 г. (далее раменские линии), а также линия 161 из коллекции ВНИИФ, которая используется в тесте с отделенными листьями и поражает все растения-дифференциаторы Мاستенброка-Блэка.

3. Образцы ДНК линий *P. infestans* 4_A1, 5_A1, 6_A1, 8_A1, 13_A2, ЕС-1 из западноевропейских коллекций, и американская линия US-8 были любезно предоставлены

нам проф. Д. Куком (D.E.L. Cooke, the James Hutton Institute, Dundee, UK). Они были использованы в качестве референсных линий.

4. 38 образцов пораженных *P. infestans* листьев картофеля, собранных летом 2015 г. в посадках картофеля на территории Люберецкого, Чеховского, Коломенского и Озерского районов Московской области. Каждый образец был собран с индивидуального растения, которые находились друг от друга на расстоянии не менее 10 метров.

Методы исследования. Выделение патогена в чистую культуру, получение монозооспоровых линий и определение их вирулентности проводились в отделе болезней картофеля и овощных культур ВНИИФ. Для выделения тотальной ДНК, проведения ПЦР, электрофоретического разделения ампликонов и клонирования фрагментов ДНК были использованы стандартные методики и коммерческие наборы реактивов. Секвенирование фрагментов ДНК проводили на анализаторе ABI PRIZM 3130xl (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ ВНИИСБ.

SSCP-анализ генов вирулентности. В ходе данной работы был валидирован метод различения линий *P. infestans* на основе SSCP-анализа генов вирулентности и разработан протокол, подходящий для эффективного обнаружения полиморфизма этих генов. Технология SSCP-анализа основана на способности одноцепочечных молекул ДНК образовывать уникальные вторичные структуры, конформации которых зависят от их нуклеотидной последовательности, и позволяет обнаружить изменения в последовательности относительно коротких фрагментов ДНК (Sheffield et al., 1993). Изменения вторичной структуры молекулы ДНК сказываются на ее подвижности: при электрофорезе в неденатурирующем полиакриламидном геле образуются характерные паттерны, состоящие из зон с различной электрофоретической подвижностью.

В настоящем исследовании протокол анализа был следующим: к 1.5-4 мкл ПЦР-продукта добавляли 7 объемов денатурирующего буфера (95% формамида, 0.05% бромфенолового синего, 0.05% ксилен цианола, 20 mM ЭДТА) и инкубировали в течение 10 минут при температуре 95°C. Затем образцы немедленно помещали в лед и наносили на 8% ПААГ (40:1 акриламид:бис-акриламид). Для проведения электрофореза использовали камеру для вертикального электрофореза PROTEAN II xi Cell (Bio-Rad, США), размер геля 16 x 20 x 1 см. Электрофоретическое разделение проводили в 0.5X TBE буфере при температуре 4°C и напряжении 200 В в течение 4.5 часов. Детекцию результатов электрофореза проводили путем инкубации геля в 300 мл 1X раствора красителя SYBR Green I (Sigma Life Science, Германия) в 0.5X TBE буфере с последующей визуализацией в ультрафиолете (длина волны 312 нм). Для определения последовательностей фрагментов ДНК, образующих эти зоны, их

вырезали из геля и элюировали ТЕ-буфером crush and soak методом. Для каждой такой зоны было получено не менее 10 клонов.

Условия проведения ПЦР Avr генов. Последовательности праймеров и условия ПЦР для генов *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3b*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1* были заимствованы из литературных источников; для амплификации генов *Avr3a*, *Avr4*, *Avr8* (*Avr-Smira2*), *Avr-Smira1* и *Avr-blb1* (*ipiO*) авторами были созданы праймеры (они обозначены *), обеспечивающие размер ампликона, оптимальный для SSCP-анализа (Таблица 1). Программа амплификации была следующей: 94°C, 3 мин; 35 циклов (94°C, 30с; Т отжига °C, 30с; 72°C, 1 мин); финальный синтез 72°C, 5 мин.

Таблица 1. Последовательности праймеров и условия ПЦР

Avr ген	Последовательность 5' –3'		Длина фрагмента (п.н.)	Т°C отж.	Ссылка
<i>Avr1</i>	Avr1F	CCGGATTCGACCACGACAAGG	557	69	Du et al., 2015a
	Avr1R	AAATGGTACCACAACATGTCCACCAAGC			
<i>Avr2</i>	AVR2F4	ATGCGTCTCGCCTACATTTT	340	61	Gilroy et al., 2011
	AVR2R4	TGTCACCCTTAATTTTCAAATGC			
<i>Avr2-like</i>	avr2F6	AGGCTCTCGATCTTGTGTCY	392	61	Gilroy et al., 2011
	avr2R6	TAGCTCCTTTTGTACCTTACTTTGT			
<i>Avr3a</i>	Avr3aSF	GTTTAATGTGGCTGCGTTG	239	53	*
	Avr3aR	CTGAAAАСТААТАТССАГТГА			
<i>Avr3b</i>	Avr3bF	TACTCGACTTCAAAGGGGGA	378	60	Wang et al., 2017
	Avr3bR	TTAGAAATTGTTCTTTGCGGTCA			
<i>Avr4</i>	Avr4SF	GGCACGCCACTGGAAAАAGTC	220	61	*
	Avr4SR	GCGCAACCCACCTAAGGAGC			
<i>Avr8</i> (<i>Avr-Smira2</i>)	Avr8F2	ACAAGTATCCCTCTCGTTCCTTC	661	66	*
	Avr8Sm2R	TTACGATGTTTTCGCTTCTTTAAAАAGC			
<i>Avr-Smira1</i>	AvrSm1F1	ATGCGTCTAAGCTCCACATTTCT	717	65	*
	AvrSm1R	TTATCCGGAGGGGTTTAGC			
<i>Avr-blb1</i> (<i>ipiO</i>)	IPIOF	CATCCAAGATTTCGCTTTCTGTCG	266	63	*
	IPIO1R	GCTTATCGGCGTCTCTCCGG			
	IPIO4R	GGATGCTTGTCTTTGTAGCTAGC	283		
<i>Avr-blb2</i>	Avrblb2F	AATCCCCGACGWGTCTCG	307	65	*
	Avrblb2R	GTCTACCCCTTTCTCGAAGTC			
<i>Avr-vnt1</i>	Avr-vnt1-SP-F	GTAACGACCCCGACCAAGTT	393	66	Pel, 2010
	Avr-vnt1-R	TCAAGCTCTAATAGGATCAAGC			

Для анализа последовательностей ДНК использовали следующие электронные ресурсы и пакеты программ: Oligo Analyzer 1.0.3, MEGA X, SplitsTree4.14.8, BioEdit v7.0.5, DNASTAR Lasergene 7.1, GenDoc2.7, DNASP 6, NCBI Blast

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), онлайн-программа The meme suite (<http://meme-suite.org/>).

Глава 3. Результаты и обсуждение

Оптимизация условий ПЦР и валидирование метода SSCP-анализа для быстрого скрининга генов вирулентности *P. infestans*

Для изучения репертуара генов вирулентности у линий *P. infestans* использовали две стратегии: 1) секвенировали произвольно отобранные клоны амплифицированных *Avr* генов и 2) проводили SSCP-анализ ПЦР-продуктов, полученных в результате амплификации *Avr* генов, а затем клонировали и секвенировали отдельные электрофоретические зоны SSCP паттернов, превращая эти паттерны в дескрипторы полиморфизма *Avr* генов. Второй подход позволяет с высокой вероятностью обнаруживать минорные аллели, которые могут быть пропущены в первом случае.

При SSCP-анализе полиморфизма по 11 генам вирулентности, гены *Avr4* и *Avr8* оказались мономорфными. Этот результат был подтвержден при помощи секвенирования нескольких случайно выбранных образцов *P. infestans*. Все остальные *Avr* гены образуют от двух до шести SSCP паттернов, пригодных для различения линий *P. infestans*. Все паттерны, полученные в ходе SSCP-анализа, надежно воспроизводились.

Зоны, образующие паттерны, были клонированы и секвенированы. Зоны, отличающиеся по электрофоретической подвижности, – это фрагменты ДНК, различающиеся по нуклеотидной последовательности. Последовательности ДНК из зон с одинаковой подвижностью в разных паттернах одного *Avr* гена (они обозначены одной цифрой) не различаются (рис. 1).

Последовательности ДНК из отдельных зон в этих паттернах были сопоставлены с последовательностями *Avr* генов в Генбанке NCBI. Пятьдесят две новые последовательности были зарегистрированы в этом банке. Большинство отклонированных нами последовательностей соответствуют вирулентным аллелям *Avr* генов, которые не распознаются соответствующими генами устойчивости картофеля. Степень гомологии с генами-прототипами составляет 93-99%.

Метод SSCP-анализа позволяет оперативно определять различные аллельные варианты *Avr* генов. Поэтому, в отличие от SSR и митохондриальных маркеров, результаты SSCP-анализа генов вирулентности могут не только служить в качестве популяционных маркеров, но и непосредственно связаны с его патогенностью.

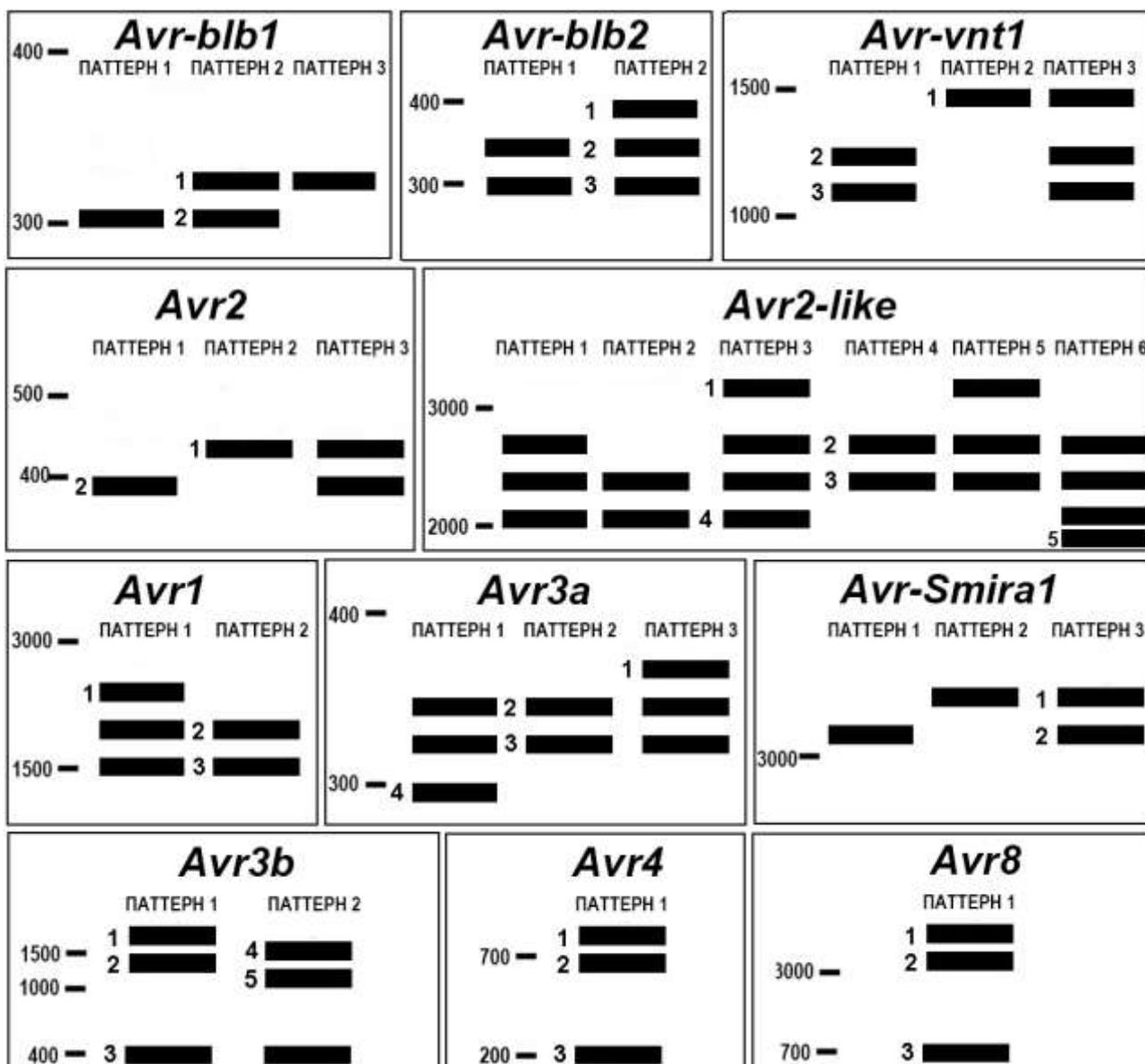


Рис. 1. SSCP паттерны *Avr* генов в линиях *P. infestans*; 1-5 зоны электрофоретической подвижности, слева – маркер молекулярной массы, п.н.

Распределение SSCP паттернов в выборках *P. infestans*

Линии *P. infestans* заметно различаются в трех выборках патогена как по составу SSCP паттернов, отражающих аллельный полиморфизм генов вирулентности, так и по их распределению (рис. 2).

Паттерн 1 гена *Avr2* был обнаружен нами ранее в изолятах из Московской области (Chizhik and Martynov, 2017). Такое распределение паттернов может быть связано с тем, что на разных территориях выращивают сорта картофеля, которые отличаются по составу генов устойчивости. Также сказываются различия в климатических условиях и географическая удаленность, приводящая к частичной изоляции восточноевропейских популяций.

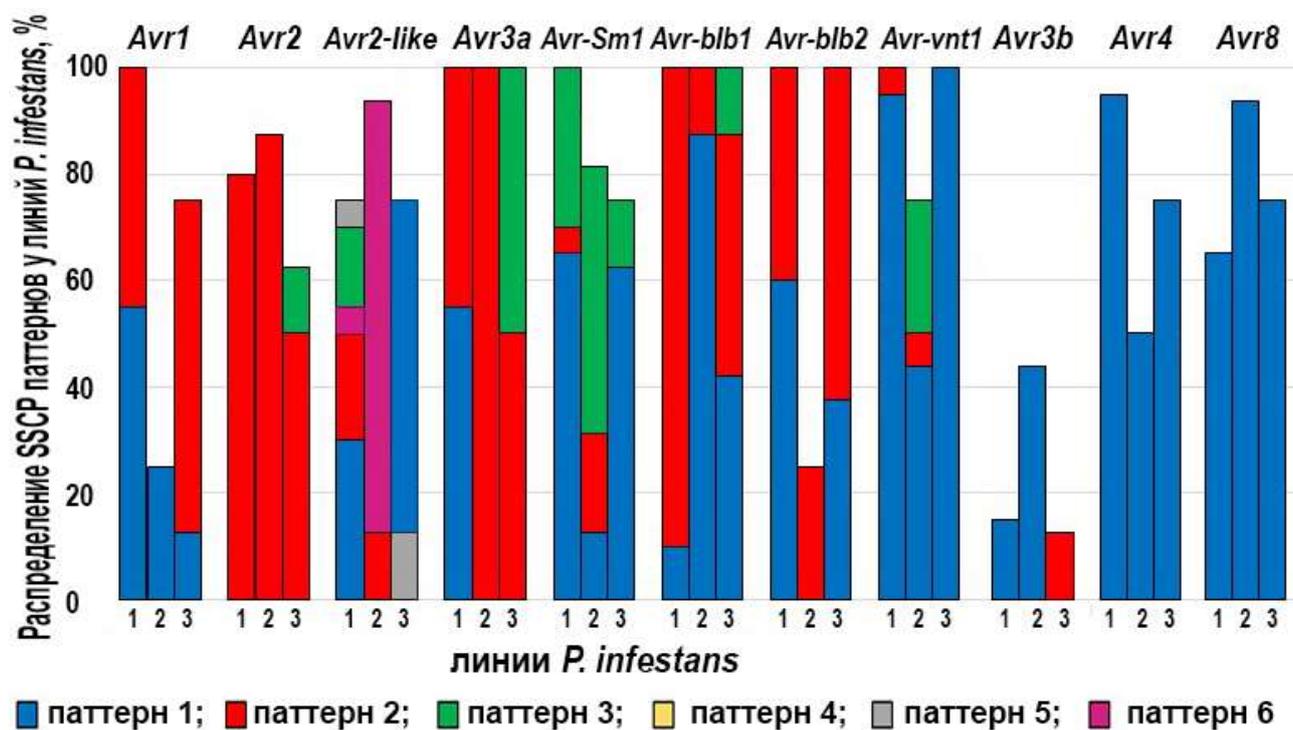


Рис. 2. Частота встречаемости SSCP паттернов Avr генов в изученных выборках *P. infestans*, %. 1 – пушкинские линии; 2 – раменские линии; 3 – штамм 161, референсные линии из Европы и США

Некоторые популяции *P. infestans* представляют собой клональные линии, разнообразие в которых невелико, это было показано для территории Северных Анд (Cárdenas et al., 2011) и для европейских популяций *P. infestans*, представленных в основном доминирующими клональными линиями (Cooke et al., 2012). Нам не удалось обнаружить характерные для Западной Европы линии на территории Ленинградской и Московской областей. Проанализированные нами линии значительно различаются по составу генов вирулентности. Исключение составляют пушкинские монозооспоровые линии, выделенные из одного изолята, которые в основном не различаются между собой как по составу Avr генов, так и по SSR локусам, проанализированным ранее (Sokolova et al., 2017). Небольшие различия можно объяснить наличием соматоклональной изменчивости. Популяция, собранная на территории Ленинградской области, оказалась более полиморфной, около трети паттернов были найдены только в этой популяции. В популяции Московской области было обнаружено два специфичных паттерна. Таким образом, популяции *P. infestans* из Ленинградской и Московской областей оказались полиморфными, они отличаются друг от друга и от линий, характерных для Западной Европы, и содержат различные аллельные варианты генов вирулентности. Нам не удалось выделить доминирующей клональной линии на Европейской территории Российской Федерации.

Сравнительное исследование полиморфизма *Avr* генов в различных линиях *P. infestans*

Нами был изучен полиморфизм 11 генов вирулентности *P. infestans*: *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr8*, *Avr-Smira1*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1* в 20 линиях, выделенных из изолятов, собранных в генетической коллекции картофеля ВИР (Пушкин, Ленинградская область), 16 линиях, выделенных из изолятов, собранных на стационаре Института фитопатологии в Раменках (Московская область), и в референсных образцах *P. infestans* из Западной Европы и США.

Все исследованные последовательности гена *Avr1* относились к вирулентному варианту и отличались друг от друга шестью SNPs в положениях: 195, 225, 309, 316, 338 и 382, из которых замены в положениях: 309, 316, 338 и 382 были обнаружены нами впервые. Замены C195T и T225A были известны ранее и также обнаружены в наших образцах, что указывает на то, что они являются горячими точками мутагенеза.

Для некоторых генов вирулентности, в частности, для гена *Avr2*, SSCP-анализ был оптимизирован на материале, собранном летом 2015 г. на территории четырех районов Московской области. Для гена *Avr2* был обнаружен зарегистрированный ранее полиморфизм K31N. Во всех пушкинских и раменских линиях ген *Avr2* был представлен аллельным вариантом *Avr2^K*, в то время как в референсных линиях и изолятах, собранных в других районах Московской области, встречается также аллель *Avr2^N*. Вирулентный гомолог этого гена, обозначаемый как *Avr2-like*, оказался, по результатам SSCP-анализа, наиболее полиморфным. Однако по аминокислотной последовательности эффектора все обнаруженные варианты соответствуют двум аллелям: *Avr2-like^{TV}* и *Avr2-like^{MI}*. Поскольку экспрессия *Avr2* строго регулируется на ранней стадии развития заболевания, а *Avr2-like* является вирулентным, сорта, содержащие только ген устойчивости *R2*, в большинстве случаев будут поражаться фитофторозом. Таким образом, для популяции *P. infestans* в Московской области характерна высокая степень полиморфизма первичной структуры этого гена. Кроме того, были выявлены территориальные особенности распределения паттернов.

Каждая из проанализированных нами линий содержала, по крайней мере, один из аллельных вариантов гена *Avr3a*. Нами были обнаружены восемь гаплотипов, включая вирулентный гомолог PEX147-2. Большинство последовательностей соответствует вирулентному аллелю *Avr3a^{EM}* и различаются только одним или несколькими синонимичными SNPs. Отсутствие несинонимичных замен может указывать на то, что ген находится под давлением отбора и, по-видимому, играет значительную роль в патогенезе. Авирулентный аллель *Avr3a^{KI}* был обнаружен только в нескольких референсных линиях и не

встречался в популяциях *P. infestans* из Московской и Ленинградской области, хотя ранее он в них присутствовал (Соколова и др., 2016; Pankin et al., 2012). Это указывает на происходящее изменение структуры популяции патогена, приводящее к появлению все большего числа штаммов, которые будут преодолевать устойчивость растений, содержащих ген *R3a*.

Исследованные нами последовательности гена *Avr3b* отличаются от обнаруженных ранее по нескольким SNPs: G122T, G163A, G253C, C324T, T355C и G371A. Замены G122T, G253C и G371A есть во всех образцах и являются несинонимичными. Эти замены характерны для линий, собранных на территории Московской и Ленинградской области, а у референсных линий они отсутствовали.

Для *Avr4* нам не удалось обнаружить полиморфизм по результатам SSCP-анализа.

Ген *Avr8* обнаружен у 60-70% проанализированных линий, однако, он оказался очень консервативным и полностью идентичен прототипу. Соответствующий ген устойчивости *R8* и его гомологи были обнаружены у многих видов рода *Solanum*, что делает этот ген перспективным для селекции картофеля.

В проанализированных образцах преобладает вирулентный аллель гена *Avr-Smira1*. В нескольких линиях был обнаружен авирулентный вариант этого гена. Ген отличается высоким уровнем полиморфизма нуклеотидной и аминокислотной последовательностей: в частности, из 25 обнаруженных SNP замены в положениях: 81, 132, 135, 369, 486, 531, 612 и 624 были синонимичными. Эти последовательности соответствовали семи гаплотипам.

Для гена *Avr-vnt1* было обнаружено три аллельных варианта, которые являются авирулентными. Отсутствие вирулентного варианта гена *Avr-vnt1* делает генетический материал *S. venturii* и *S. phureja* перспективным для селекционных программ на долговременную устойчивость к фитофторозу картофеля.

Для гена *Avr-blb1* были обнаружены в основном аллели, относящиеся к I классу. Поскольку аллели I класса *Avr-blb1* распознаются геном *Rpi-blb1* и, следовательно, являются авирулентными, а гены, относящиеся ко II классу, несут вирулентную функцию, но только в отсутствие генов I класса, мы можем сделать вывод, что все исследованные нами линии будут авирулентными на растениях, содержащих ген *RB/Rpi-blb1*. Этот вывод хорошо согласуется с широким спектром долговременной устойчивости к фитофторозу, который обеспечивает ген *Rpi-blb1*.

Ген *Avr-blb2* также представлен в основном авирулентными формами что, делает ген *Rpi-blb2* перспективным для создания устойчивых сортов.

Северо-Западной Европе, Китае и Индии (Cooke et al., 2012; Dey et al., 2018; Li et al., 2013). Американская линия US-8 и остальные референсные линии, за исключением 4_A1, образуют кластер III, отличный от пушкинских и раменских линий. Особое положение занимает слабоагрессивная линия 87/2-2, в которой присутствуют в основном авирулентные формы генов. Она колонизовала наименее устойчивый сорт картофеля Robijn, в котором по данным молекулярного анализа, присутствует только маркер гена устойчивости R2. Полученные результаты позволяют предполагать, что растение может являться фактором отбора для патогена, таким образом, на более устойчивых растениях будут отбираться более агрессивные линии *P. infestans*. Популяция, собранная на территории Ленинградской области, оказалась более полиморфной, что может быть связано с большим разнообразием R генов в коллекции картофеля ВИР (г. Пушкин) и высоким инфекционным фоном в почве.

Сравнение SSCP-анализа генов вирулентности с другими методами генотипирования *P. infestans*

Дендрограмма, построенная на основе SSCP паттернов, неплохо согласуется с результатами проведенного ранее (рис. 3B) генотипирования по 12 SSR локусам (Sokolova et al., 2017). По результатам генотипирования нам удалось обнаружить пять кластеров, остальные линии имеют индивидуальный профиль. Разнообразие SSCP паттернов в раменских линиях невелико, также эти линии мало различаются по результатам SSR генотипирования. Пушкинские линии отличаются большим разнообразием как по SSCP паттернам, так и по SSR локусам. Результаты SSCP-анализа, в отличие от SSR-анализа, в целом согласуются с территориальной принадлежностью изученных нами линий.

Для большей части гибридов картофеля, заселенных описанными в настоящем исследовании линиями *P. infestans*, ранее был определен состав R генов (Fadina et al., 2017). Некоторые из полученных профилей генов устойчивости и генов вирулентности, а также результаты тестов на растениях-дифференциаторах (Sokolova et al., 2017) сопоставлены в таблице 2.

Данные о составе Avr генов, выявленных молекулярными методами, и факторов вирулентности, определенных фитопатологическим методом, совпадают лишь в 10-30% случаев, что можно объяснить ограничениями обоих методов. В частности, в геноме *P. infestans* находят гены вирулентности, которые комплементарны генам устойчивости из разных видов рода *Solanum*, в то время как в тесте с растениями-дифференциаторами Мастенброка-Блэка участвуют только гены устойчивости, перенесенные из *S. demissum*. Соответственно, такой набор дифференциаторов не выявляет гены вирулентности *Avr-blb1*,

Avr-blb2 или *Avr-vnt1*, распознающие важнейшие для современной селекции гены устойчивости к фитофторозу (Haverkort et al., 2016). С другой стороны, SSCP-анализ, как и все методы, основанные на ПЦР, позволяет оценить только структурный полиморфизм гена, но не его функциональные особенности.

Таблица 2. Сравнение состава генов вирулентности *P. infestans* с профилем генов устойчивости картофеля и факторами вирулентности, выявленными с помощью растений-дифференциаторов

Клон гибрида картофеля; R гены	Линии <i>P. infestans</i>	Avr гены	Факторы вирулентности
<i>Пушкинские линии P. infestans</i>			
18/40-2000; <i>R1, Rpi-vnt1.3</i>	18/1-1	<i>avr1, Avr2^K, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (I), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)</i>	1234567891011
113(50-1KWA); <i>R1, Rpi-blb2</i>	103-1, 103-2, 103-3	<i>avr1, Avr2^K, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (I), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)</i>	123467891011
160-17; <i>Rpi-blb2</i>	43/1-1	<i>avr1, Avr2^K, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (I), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)</i>	12347891011
Robijn; <i>R2</i>	87/2-2	<i>avr1, Avr2^K, Avr2-like^{TV/MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (II), Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V2)</i>	12378
<i>Раменские линии P. infestans</i>			
18/40-2000; <i>R1, Rpi-vnt1.3</i>	163	<i>Avr2^K, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (I), Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V2)</i>	н.д.
<i>Референсные линии P. infestans</i>			
н.д.	161	<i>avr1, Avr2^K, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8, Avr-Smiral1 (I, II), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1, V3)</i>	1234567891011
н.д.	6_A1 (4100a)	<i>Avr2^{K/N}, avr3a^{EM}, Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1, V3)</i>	н.д.
н.д.	13_A2 (3928a)	<i>avr3a^{EM}, Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1, V3)</i>	н.д.

Avr-Smiral1 (I) – вирулентный класс генов, *Avr-Smiral1 (II)* – авирулентный класс генов; *Avr-blb1 (I)* – авирулентный класс генов, *Avr-blb1 (II)* – вирулентный класс генов; н.д. – нет данных.

Некоторые линии патогена были изолированы из одних и тех же гибридов и сортов картофеля в разные годы в Ленинградской и Московской областях. Эти изоляты различаются по аллельному составу *Avr* генов. Линии 87/2-2 и 5 инфицировали сорт Robijn, однако они

значительно отличаются по составу *Avr* генов. Возможно, это связано с накоплением в популяции Московской области штаммов с большим количеством генов вирулентности, обусловленным наличием на этой площадке большого количества устойчивых гибридов картофеля. Ранее здесь была собрана высокоагрессивная линия 161, поражающая весь набор растений-дифференциаторов Мастенброка-Блэка.

При использовании для первичного скрининга линий *P. infestans* SSCP-анализ обнаруживает полиморфизм нуклеотидных последовательностей и позволяет отбирать полиморфные варианты для дальнейшего анализа.

Таблица 3. Новые последовательности *Avr* генов, зарегистрированные по результатам исследования

<i>Avr</i> ген	№ регистрации в Генбанке NCBI
<i>Avr1</i>	MH450289-MH450291, MK287363-MK287365
<i>Avr2</i>	KY354764, KY354765
<i>Avr2-like</i>	KY354766-KY354769, MF956401, MF956402, MF956406-MF956410, MF956413-MF956416, MF956418- MF956421, MF956430, MF956431
<i>Avr3a</i>	MH450287, MH450288
<i>Avr3b</i>	MK287366-MK287369
<i>Avr-Smiral</i>	MH423619, MH423620
<i>Avr-blb1</i>	MH220872-MH220876
<i>avr-blb2</i>	MK776760-MK776766
<i>Avr-vnt1</i>	MH423614-MH423617

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе была предпринята попытка выявить структурные особенности некоторых генов оомицета *P. infestans*, обуславливающих его вредоносность по отношению к картофелю, и использовать эти данные для различения изолятов на основе полиморфизма этих генов. Изучение этой проблемы на молекулярно-генетическом уровне позволяет лучше понять взаимодействие возбудителя фитофтороза с растениями картофеля как пример взаимозависимой эволюции двух организмов. В практическом отношении полученные результаты представляют новый метод распознавания и генотипирования линий *P. infestans*, основанный на составе *Avr* генов. В будущем анализ существующей коллекции изолятов *P. infestans*, собранных на Европейской территории России, позволит использовать SSCP-анализ как метод идентификации штаммов этого патогена. Полученные данные о полиморфизме *Avr* генов на Европейской территории Российской Федерации смогут помочь разработке новых средств борьбы с фитофторозом и новой стратегии селекции на долговременную устойчивость к этой болезни. Это может быть осуществлено путем

создания коллекции штаммов, отражающих наиболее распространенные в популяции гаплотипы, а также через поиск новых генов устойчивости при помощи метода эффекторомики.

Мы впервые исследовали полиморфизм 11 генов вирулентности *P. infestans* в посадках картофеля на территории Европейской части России: продуктами этих генов являются цитоплазматические RXLR эффекторы, подавляющие иммунитет растения-хозяина. Эти *Avr* гены были выбраны для исследования, поскольку соответствующие им гены устойчивости картофеля хорошо охарактеризованы и широко используются в современной селекции картофеля на устойчивость к фитофторозу.

Для оценки полиморфизма генов вирулентности был оптимизирован протокол SSCP-анализа. Это позволило проводить первичный скрининг и отбирать для дальнейшего исследования только те образцы, которые являются полиморфными. Выявленные паттерны изучаемых генов встречались с различной частотой у линий из Ленинградской и Московской областей и линий из Западной Европы и США. Наиболее яркие различия в аллельном составе характерны для генов *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr-Smiral*, *Avr-blb1* и *Avr-blb2*.

Среди последовательностей *Avr* генов, выявленных при SSCP-анализе, 52 охарактеризованы впервые (таблица 3). Для всех этих генов, за исключением *Avr4* и *Avr8*, были выявлены новые аллели, характерные для Европейской части России. Обнаруженные *Avr* гены сравнивали с генами-прототипами из Генбанка NCBI. Подавляющее большинство последовательностей генов *Avr1*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr4*, *Avr-vnt1* и *Avr-Smiral* соответствует известным вирулентным вариантам этих генов, которые избегают распознавания соответствующими генами устойчивости картофеля. Ген *Avr-blb2* в нашем исследовании был представлен вирулентными и авирулентными вариантами приблизительно в равной степени. Для гена *Avr-blb1* обнаружены преимущественно авирулентные варианты. Гены *Avr2*, *Avr3b* и *Avr8* были представлены только авирулентными вариантами.

Мы сравнили состав *Avr* генов в линиях *P. infestans* с составом факторов вирулентности, идентифицированных с помощью растений-дифференциаторов Мастенброка-Блэка (расовый состав *P. infestans*) и с результатами SSR (simple sequence region) генотипирования. Состав *Avr* генов, исследованных с помощью молекулярных маркеров, не вполне согласуется с составом генов вирулентности, выявленных фенотипическим методом, по реакции растений-дифференциаторов, несущих гены устойчивости. Мы склонны объяснять такое расхождение неполнотой каждого из использованных наборов дескрипторов и тем, что многие растения-дифференциаторы содержат в своем геноме более одного гена устойчивости к фитофторозу. Генотипирование с

помощью SSCP паттернов во многом, но не полностью согласуется с результатами генотипирования по 12 SSR локусам. Обнаруженные расхождения можно связать с особенностями эволюции локусов, используемых для различения линий *P. infestans*. SSR локусы относятся к относительно стабильной части генома *P. infestans* и не связаны напрямую с вирулентностью, в то время как вредоносность и агрессивность патогена непосредственно связаны с генами вирулентности и их полиморфизмом, выявляемым SSCP-анализом.

Новые данные о полиморфизме *Avr* генов способствуют изучению эволюции генома *P. infestans* и могут быть использованы селекционерами для определения методом эффектомики соответствующих генов устойчивости, на которых строится современная селекция картофеля.

ВЫВОДЫ

1. Для различения линий *P. infestans*, основанном на полиморфизме генов вирулентности (*Avr* генов), была валидирована технология SSCP-анализа. Эта технология эффективно выявляет редкие варианты *Avr* генов, что особенно важно для обнаружения в агроценозах новых патотипов *P. infestans*.

2. SSCP паттерны являются хорошо воспроизводимыми маркерами аллельного полиморфизма *Avr* генов, которые пригодны для массового скрининга и различения штаммов *P. infestans*.

3. Среди *Avr* генов *P. infestans*, относящихся к семейству RXLR эффекторов, в изученной коллекции полиморфными оказались *Avr1*, *Avr2*, *Avr2-like*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr-Smira1*, *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, а гены *Avr4* и *Avr8* являются более консервативными. Для всех этих генов, за исключением *Avr4* и *Avr8*, были выявлены новые аллели, характерные для Европейской части России.

4. В линиях *P. infestans*, которые колонизируют устойчивые к фитофторозу межвидовые гибриды картофеля из генетической коллекции ВИР, преобладают вирулентные варианты *Avr* генов, в то время как неустойчивые сорта заселяются линией, в которой преобладают авирулентные варианты этих генов. Высокоагрессивные линии 6_A1 и 13_A2, по данным SSCP-анализа, отличаются наименьшим числом *Avr* генов, однако, в их геноме присутствуют гены вирулентности *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, которые позволяют преодолевать устойчивость большинства сортов картофеля.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

В отличие от наиболее распространенного метода генотипирования штаммов *P. infestans* по SSR локусам, SSCP-анализ выявляет полиморфизм, непосредственно связанный с вирулентностью, так что определение состава *Avr* генов позволяет оценить потенциальную вредоносность различных штаммов *P. infestans*. Использование методов молекулярно-генетического анализа *Avr* генов для раннего обнаружения новых штаммов *P. infestans* и их характеристики позволит прогнозировать возможные потери урожая. Полученную информацию можно будет использовать для характеристики вирулентности изучаемых штаммов *P. infestans*, что в свою очередь позволит давать прогноз повреждающей способности этих штаммов, если известны гены устойчивости к фитофторозу у сортов картофеля, выращиваемых в этих агроценозах.

Не менее важным является использование *Avr* генов как высокоспецифичного инструмента для поиска и различения генов устойчивости к фитофторозу методом эффекторомики на всех этапах селекции картофеля, от работы с генетическими коллекциями до определения подлинности сортов семенного картофеля.

Полученные данные могут быть использованы в учебном процессе в высшей школе, в частности, в курсах по генетике и фитопатологии.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из перечня ВАК

1. **Чижик, В.К.** Полиморфизм гена *Avr2* оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в популяции Московской области / В.К. Чижик, В.В. Мартынов // Генетика. – 2017. – Т. 53. – №12. – С. 1411-1418. doi: 10.7868/S0016675817120037
2. **Чижик, В.К.** Распознавание штаммов возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* методом SSCP анализа генов вирулентности / В.К. Чижик, Е.А. Соколова, В.В. Мартынов, М.А. Кузнецова, Э.Е. Хавкин // Биотехнология. – 2018. – Т. 34. – № 6. – С. 4-11. doi: 10.21519/0234-2758-2018-34-6-4-11
3. **Martynov, V.V.** Polymorphism of avirulence genes in potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* as characterized by SSCP analysis / V.V. Martynov, V.K. Chizhik, E.A. Sokolova, M.A. Kuznetsova, E.E. Khavkin // Agri Gene. – 2019. – №13. – P. 100093. <https://doi.org/10.1016/j.aggene.2019.100093>
4. **Мартынов, В.В.** Генетика взаимодействия патоген-хозяин на примере фитофтороза картофеля / В.В. Мартынов, В.К. Чижик // Генетика. – 2020. – Т. 56. – № 3. – С. 251-259. doi: 10.31857/S0016675820030108

Материалы конференций

5. **Чижик, В.К.** Оценка полиморфизма гена вирулентности *Avr2 Phytophthora infestans* в популяции Московской области с использованием SSCP метода / В.К. Чижик // Матер. V межд. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы биологической и химической экологии». Москва, 2016. – С. 139 – 142.
6. **Чижик, В.К.** Изучение полиморфизма первичной структуры гена вирулентности *Avr2 Phytophthora infestans* в популяции Московской области / В.К. Чижик, В.В. Мартынов // Матер. межд. науч. конф. «Генетика популяций: прогресс и перспективы». Москва, 2017. – С. 316 – 318.
7. **Чижик, В.К.** Применение метода SSCP для изучения полиморфизма гена вирулентности *Avr2 Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в популяции Московской области / В.К. Чижик // Матер. XVII молодеж. науч. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва, 2017. – С. 10 – 11.
8. **Чижик, В.К.** Применение метода SSCP для анализа генетического полиморфизма *Phytophthora infestans* / В.К. Чижик, Е.А. Соколова, В.В. Мартынов // В кн.: Эпидемии болезней растений: мониторинг, прогноз, контроль. ВНИИФ, 2017. – С. 280–287.
9. **Мартынов, В.В.** SSCP-анализ генов вирулентности и прогноз повреждающей способности штаммов возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* / В.В. Мартынов, Е.А. Соколова, В.К. Чижик // Матер. межд. науч.-практ. конф. «Современные проблемы и достижения в защите картофеля от болезней, вредителей и сорняков». Большие Вяземы, 2018. – С. 17.
10. **Чижик, В.К.** Полиморфизм *Avr* генов в монозооспоровых линиях *Phytophthora infestans*, колонизирующих картофель в полевой коллекции ВИР / В.К. Чижик, Е.А. Соколова // Матер. межд. науч. конф. «Ломоносов-2018». Москва, 2018. – С. 1.
11. **Чижик, В.К.** Применение метода SSCP для изучения полиморфизма *Avr* генов в монозооспоровых линиях *Phytophthora infestans* / В.К. Чижик // Матер. XVIII молодеж. науч. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии». Москва, 2018. – С. 73–74.
12. **Чижик, В.К.** Полиморфизм генов вирулентности в популяции возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans*, колонизирующей генетическую коллекцию картофеля ВИР в Пушкине (С. Петербург) / В.К. Чижик, В.В. Мартынов, Е.А. Соколова, М.А. Кузнецова, Е.В. Рогозина, Э.Е. Хавкин // Матер. юбил. конф. по микологии и микробиологии Национальной Академии Микологии. Москва, 2018. – С. 346–349.
13. **Мартынов, В.В.** Гены вирулентности патогена и гены устойчивости растения как факторы колонизации растений картофеля возбудителем фитофтороза *Phytophthora infestans*

/ В.В. Мартынов, Е.А. Соколова, В.К. Чижик, М.А. Кузнецова, Е.В. Рогозина, Э.Е. Хавкин// Матер. межд. форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни». Москва, 2018. – С. 29–30.

14. **Чижик, В.К.** Применение SSCP-анализа для оценки полиморфизма генов вирулентности *Phytophthora infestans* / В.К. Чижик, В.В. Мартынов, Е.А. Соколова, М.А. Кузнецова, Э.Е. Хавкин // Матер. межд. конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2019. – С. 33–34.

15. **Чижик, В.К.** Полиморфизм генов вирулентности у штаммов *Phytophthora infestans* / В.К. Чижик, В.В. Мартынов // Матер. VI межд. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы биологической и химической экологии». Москва, 2019. – С. 113–114.

16. **Чижик, В.К.** Полиморфизм RXLR эффекторов в линиях возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* / В.К. Чижик // Матер. межд. науч. конф. «Ломоносов-2019». Москва, 2019. – С. 1–2.

17. **Чижик, В.К.** Различение штаммов возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* на основе SSCP анализа генов вирулентности / В.К. Чижик // Матер. XIX всерос. науч. конф. «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и сельскохозяйственной микробиологии». Москва, 2019. – С. 155–156.

18. **Chizhik, V.K.** The repertoire of *Avr* genes in two East European populations of *Phytophthora infestans* / V.K. Chizhik, V.V. Martynov, E.A. Sokolova, M.A. Kuznetsova, E.V. Rogozina, E.E. Khavkin // In: Schepers HTAM, (ed.) WUR Special Report no. 19, Wageningen. – 2019. – P. 239-241.

19. **Martynov, V.V.** Rapid discrimination of *Phytophthora infestans* (a)virulence genes by SSCP analysis / V.V. Martynov, V.K. Chizhik, E.A. Sokolova, M.A. Kuznetsova, T.I. Ulanova, E.E. Khavkin // In: Schepers HTAM, (ed.) WUR Special Report no. 19, Wageningen. – 2019. – P. 241-248.