

УДК 574.2:577.2

DOI: 10.18384/2310-7189-2015-4-29-36

Мартынов В.В.*Московский государственный областной университет***ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИМОРФИЗМА ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ ГЕНА AVR4 ООМИЦЕТА PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY**

Аннотация. В работе приводится описание полиморфизма первичной структуры гена вирулентности Avr4 оомицета *P. infestans* в полевых образцах *P. infestans* из Московской и Владимирской областей. В частности, в нуклеотидных последовательностях гена Avr4 было выявлено четыре сайта однонуклеотидного полиморфизма, которые можно отнести к горячим точкам мутагенеза (положения 180, 278, 376 и 439). В зависимости от нуклеотидного состава в вышеуказанных положениях среди нефункциональных вариантов гена Avr4 было выявлено пять аллельных вариантов. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что ген Avr4 обладает значительным полиморфизмом первичной структуры, но для выяснения причин этого полиморфизма и характера эволюции этого гена, а также установления частот выявленных аллелей в популяциях *P. infestans*, необходимо проведение дополнительных популяционно-генетических исследований.

Ключевые слова: молекулярная генетика, гены вирулентности, аллель, фитопатоген.

V. Martynov*Moscow State Regional University***DESCRIPTION OF THE PRIMARY STRUCTURE POLYMORPHISM OF AVR4 GENE IN PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY**

Abstract. The paper describes the primary structure polymorphism of the oomycete virulence gene Avr4 in field samples of *P. infestans* from the Moscow and Vladimir regions of Russia. It is found that in nucleotide sequences the Avr4 gene exhibits four site of single nucleotide polymorphism that can be attributed to hot spots of mutagenesis (at 180, 278, 376 and 439). Depending on the nucleotide composition, among the non-functional variants of the Avr4 gene, five allelic variants are identified. Based on these data, it was concluded that the Avr4 gene has considerable polymorphism of the primary structure, but in order to elucidate the causes of this polymorphism and the nature of the evolution of this gene, as well as to establish the allele frequencies in populations of *P. infestans*, additional population-genetic studies are required.

Key words: molecular genetics, virulence genes, alleles, phytopathogens.

Фитофтороз является одним из вредоноснейших заболеваний картофеля, которое угнетает рост и развитие растений в период формирования клубней и вызывает гниение клубней во время хранения. Возбудителем фитоф-

© Мартынов В.В., 2015.

тороза является оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. Этот патоген проникает в ткани растения, нарушает целостность клеток, забирает из них питательные вещества, перемещается по отдельным органам и всему растению, воздействует на растительный

организм продуктами своего метаболизма.

Для защиты от патогенов растения обладают врожденным иммунитетом, который можно условно разделить на два типа: неспецифический, развивающийся в ответ на консервативные «молекулярные паттерны, ассоциированные с патогенами» (PAMPs), и зависящий от передачи сигнала через трансмембранные «паттерн-распознающие рецепторы» (PRRs); и специфический или вторичный, развивающийся в ответ на присутствующие у патогенов эффекторных белки, распознаваемые цитоплазматическими рецепторами. Связывание PAMPs с рецепторами приводит к индукции базальной защитной реакции, которая вызывает комплексные изменения в клетке, в конечном итоге приводящие к апоптозу [1; 3].

Однако эволюция патогенов, направленная на преодоление базальной защитной реакции, привела к появлению у них эффекторных белков, подавляющих эту первичную защитную реакцию. В частности, у *P. infestans* были описаны гены, кодирующие эффекторные белки, одним из которых является ген вирулентности *Avr4*. Этот ген кодирует белок, принадлежащий к семейству RXLR-dEER эффекторов, и обладает полиморфизмом, связанным с функцией: мутантные варианты вирулентны, вариант дикого типа авирулентный и распознается соответствующим геном *R4* устойчивости картофеля [9].

Однако данный полиморфизм был описан только для некоторых изолятов из зарубежных коллекций, и, кроме того, в генетических базах данных отсутствуют нуклеотидные последовательности этих полиморфных вариан-

тов. В связи с этим целью настоящей работы было охарактеризовать полиморфизм первичной структуры гена *Avr4* в российских полевых образцах *P. infestans*. Полученные данные являются вкладом в изучение механизмов изменчивости у *P. infestans* на молекулярном уровне, и в дальнейшем они могут быть использованы при разработке мер борьбы с фитофторозом картофеля.

Материалы и методы

В качестве *материала* *Phytophthora infestans* использовали пораженные фитофторозом листья растений картофеля, собранные летом 2013 г. в посадках картофеля вблизи поселка Юрьево (Владимирская область) и поселка Детково (Московская область). Каждый из образцов был собран с индивидуального растения. Эти растения находились друг от друга на расстоянии не менее 10 м. Всего было собрано четыре образца – два из Московской и два из Владимирской области. Для подтверждения того, что растение поражено именно фитофторозом, использовали тест-набор для экспресс – определения фитофторы в полевых условиях производства фирмы ООО «Генконтроль». 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 [8].

Методы. *Выделение ДНК.* Тотальную ДНК выделяли из гербарных образцов при помощи набора реагентов «SILICA plant» производства ООО компании «Биоком» по протоколу фирмы – производителя. Для выделе-

ния тотальной ДНК брали фрагмент высушенного листа растения площадью примерно 1 см².

Условия ПЦР. Препараты тотальной ДНК амплифицировали с праймерами Avr4F (ATGCGTTTCGCTT-CACATTTTGCTG) и Avr4R (СТААГАТАТGGGCCGTCTAGCTG), подобранными, исходя из нуклеотидной последовательности гена *Avr4 P. infestans*, зарегистрированной в базе данных NCBI под номером EF672355. Эти праймеры амплифицировали всю кодирующую последовательность гена *Avr4* размером 864 п.н.

Программа для амплификации была следующей: 94°C – 3 мин. (первичная денатурация), затем 35 циклов, состоящих из следующих этапов: 94°C – 30 сек., 60°C – 30 сек. и 72°C – 1 мин., и 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., USA). Электрофоретическое разделение продуктов амплификации проводили в 1% агарозном геле в 0,5X TBE-буфере.

Клонирование и секвенирование. ПЦР-продукты клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) по протоколу фирмы-производителя, которым трансформировали компетентные клетки *E.coli* штамма DH5α, и секвенировали по два клон из каждого образца (по методу Сэнгера с помощью набора реактивов Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems, Inc., USA) на автоматическом секвенаторе ABI PRIZM 3730 (Applied Biosystems, Inc., USA) согласно инструкциям производителя. Надежность прочтения при секвениро-

вании подтверждали тем, что каждый клон секвенировали в двух повторностях с прямого и обратного праймера, и полученные таким образом сиквенсы для каждого клон были идентичны по нуклеотидной последовательности. В общей сложности было получено 8 нуклеотидных последовательностей 8 клонов.

Математическая обработка данных. Поиск последовательностей, гомологичных последовательностям, полученным в результате секвенирования, проводили в базе данных GeneBank NCBI при помощи программы BLAST. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программы ClustalW, доступной на сервере GeneBee (www.belozersky.msu.ru/genebee), с последующим анализом результатов этого выравнивания при помощи программы GeneDoc. Производные аминокислотные последовательности были получены с помощью программы EditSeq.

Результаты

Были получены данные о нуклеотидной последовательности и полиморфизме гена *Avr4* в полевых образцах *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bruy из Московской и Владимирской областей РФ. Всего было получено восемь последовательностей из четырех образцов, два из которых были собраны во Владимирской, а два – в Московской области. Из каждого образца было клонировано и отсеквенировано по две последовательности гена *Avr4*. Все полученные последовательности имели размер 863 п.н. и были гомологичны аннотированному гену *Avr4 P. infestans* на 98%.

Гипотетическая трансляция с использованием стандартного генетического кода показала, что ни одна из полученных последовательностей не кодирует нормальный полноразмерный белок *Avr4*, т.е. они представляют собой нефункциональные (вирулентные) варианты гена *Avr4*. Все полученные последовательности были зарегистрированы в базе данных GeneBank NCBI под номерами KR013197, KR013198, KR013199, KR013200, KR013201, KR013202, KR013203 и KR013204. Полученные последовательности методом множественного выравнивания сравнили между собой и с ранее зарегистрированными и аннотированными в NCBI последовательностями гена *Avr4 P. infestans*, для которых были указаны раса и гаплотип изолята, из которого они были получены (табл. 1). В результате подробного анализа множественного выравнивания исследуемых последовательностей было установлено, что в целом исследуемые нуклеотидные последовательности гена *Avr4* различаются между собой по 37 сайтам однонуклеотидного полиморфизма, но большинство из этих однонуклеотидных полиморфизмов, а именно 22, встречаются только в какой-либо одной из 19 исследуемых последовательностей. Эти полиморфизмы в дальнейшем не рассматривались, так как нельзя исключить того, что они являются артефактами.

Функциональные варианты отличаются от всех нефункциональных вариантов по 11 сайтам однонуклеотидного полиморфизма (положения 55, 96, 122, 416, 423, 479, 492, 527, 570, 661 и 811), а также тем, что в нефункциональных вариантах имеет место делеция нуклеотида в положении 196 (здесь и далее

нумерация нуклеотидов указывается в соответствии с их положением в функциональных вариантах), которая приводит к сдвигу рамки считывания и, вероятно, к синтезу нефункционального белка. Кроме того, было выявлено еще четыре сайта однонуклеотидного полиморфизма, которые можно отнести к горячим точкам мутагенеза (положения 180, 278, 376 и 439). Нуклеотидами в этих положениях различаются между собой нефункциональные варианты гена *Avr4* (табл. 2). Кроме того, нуклеотидами в этих положениях некоторые нефункциональные варианты дополнительно отличаются от функциональных вариантов.

В зависимости от нуклеотидного состава в положениях 180, 278, 376 и 439 среди нефункциональных вариантов гена *Avr4* можно выделить 5 аллельных вариантов, а именно вариант I, который имеет в вышеуказанных положениях нуклеотиды такие же, как у функционального варианта, вариант Ia, который отличается от варианта I нуклеотидом в положении 376, вариант Ib, который отличается от варианта Ia нуклеотидом в положении 278, а от варианта I – нуклеотидами в положениях 278 и 376, вариант Ic, который отличается от варианта I нуклеотидами в положениях 180 и 376, от варианта Ia – нуклеотидом в положении 180 и от варианта Ib нуклеотидами в положениях 180 и 278, и вариант II, который отличается от варианта I по всем четырем нуклеотидам, от вариантов Ia и Ib – тремя нуклеотидами в положениях 180, 278, 439, и от варианта Ic вариант II отличается двумя нуклеотидами в положениях 278 и 439. Все эти варианты оказались представлены в данном исследовании разным числом последовательностей.

Наиболее представленным оказался вариант II, он характерен для восьми последовательностей. Вариант I представлен шестью последовательностями. Варианты Ia, Ib и Ic представлены одной последовательностью каждый. При этом распределение этих вариантов не связано с расой патогена. Образцы из Владимирской области содержат вариант I, а один образец из Московской области содержит вариант II, а другой варианты I и Ic. В вариантах, которые имели в положении 278 нуклеотид Т, это приводило к образованию в последовательности стоп-кодона раньше, чем в вариантах, которые имели в положении 278 нуклеотид А или С, и, таким образом, эти варианты кодировали усеченный белок, состоящий из 92 аминокислотных остатков, в то время как варианты с нуклеотидом 278А или 278С кодировали усеченный белок, состоящий из 97 аминокислотных остатков. Обе вовлеченные в исследование последовательности функциональных вариантов гена *Avr4* оказались консервативными, они кодируют абсолютно одинаковые белковые последовательности.

Обсуждение результатов

Эффекторные белки играют важную роль в жизненном цикле биотрофических фитопатогенов, в том числе *P. infestans* [3]. Как правило, у *P. infestans* определяется только наличие авирулентной или вирулентной формы ответствующего *Avr* гена при помощи набора растений-дифференциаторов, т.е. генетический полиморфизм оценивается на уровне фенотипа. Однако такой подход к оценке полиморфизма в значительной степени уже исчерпал себя, так как подавляющее большин-

ство изолятов *P. infestans* имеет максимальное число вирулентных форм *Avr* генов.

В тоже время было показано, что *Avr* гены, в частности гены *Avr3a* и *Avr4*, обладают полиморфизмом первичной структуры [5; 9], но это было сделано на зарубежных изолятах. При этом было показано, что популяции *P. infestans* Московской области являются высокополиморфными по другим молекулярным маркерам [6]. Поэтому можно ожидать, что российские популяции также обладают полиморфизмом первичной структуры генов вирулентности, в частности гена *Avr4*. Целью настоящей работы было охарактеризовать полиморфизм гена вирулентности *Avr4* в образцах *P. infestans* из Московской и Владимирской областей, чтобы наметить пути его дальнейшего изучения.

Большинство проанализированных последовательностей (2 из 19) представляют собой вирулентную (нефункциональную) форму гена *Avr4*, что косвенно подтверждает предположение о распространенности вирулентных форм в современных популяциях *P. infestans*. Две авирулентные формы оказались весьма консервативными, а среди вирулентных форм было выявлено два основных аллельных варианта, один из которых (вариант I) по четырем выявленным полиморфным положениям полностью идентичен функциональному (авирулентному) варианту, а другой по этим же положениям (вариант II) полностью от него отличается. Также было выявлено три промежуточных варианта (Ia, Ib и Ic), которые, вероятно, являются переходными формами между вариантом I к вариантом II.

Наблюдаемая картина, по-видимому, отражает характер эволюции гена *Avr4*. Известно, что RXLR-dEER эффекторы эволюционируют под действием сильного положительного отбора, чтобы избежать распознавания соответствующим R-белком растения [7]. Для гена *Avr4* было показано, что за распознавание кодируемого им эффекторного белка отвечает несколько доменов в С-концевой области этого белка (три W-домена и один Y-домен) [11]. Мутации гена *Avr4*, приводящие к сдвигу рамки считывания, приводят к образованию усеченного белка размером 92 или 97 аминокислотных остатков, лишённого этих доменов и сохраняющего только RXLR-dEER-домен, отвечающий за проникновение эффекторного белка в клетку хозяина. В работе [11] высказывается предположение, что точечные мутации в нефункциональных (вирулентных) формах гена *Avr4*, находящиеся правее делеционной мутации в положении 196 (т.е. ближе к 3'-концу), появились эволюционно позднее и без давления отбора.

Однако возможно, что, наоборот, горячие точки мутагенеза в области 3'-конца в положениях 278, 376 и 439 возникли под давлением отбора раньше, чем мутация в положении 196, и они изменяли аминокислотную последовательность без нарушения рамки считывания, как это имеет место в случае другого гена вирулентности *P. infestans* *Avr3a*, у которого вирулентная и авирулентная формы отличаются друг от друга точечными мутациями,

изменяющими аминокислотную последовательность [2; 4]. В пользу этой гипотезы свидетельствует тот факт, что мутация в положении 278 в нормальном белке приводила бы к замене аминокислоты в положении 93, а другая мутация (в положении 376) находится в первом W-доме белка *Avr4*, распознаваемом системой защиты растения, и она приводит к образованию стоп-кодона. Кроме того, такой характер эволюции гена *Avr4* может обеспечивать полиморфизм гена устойчивости *R4* картофеля, ответственного за распознавание эффекторного белка *Avr4*.

Этот ген еще не охарактеризован на молекулярном уровне, но было показано, что одни и те же изоляты *P. infestans* по-разному взаимодействовали с имеющими ген *R4* растениями из двух разных наборов растений-дифференциаторов, что свидетельствовало о функциональном полиморфизме этого гена [10]. То есть различные нефункциональные варианты гена *Avr4* могли оказаться вирулентными на растении с одним генотипом по гену *R4*, и авирулентными на растении с другим генотипом по гену *R4*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что ген *Avr4* обладает значительным полиморфизмом первичной структуры, но для выяснения причин этого полиморфизма и характера эволюции этого гена необходимо проведение дополнительных популяционно-генетических исследований, для которых полученные в данной работе результаты могут послужить хорошей отправной точкой.

Таблица 1

**Нуклеотидные последовательности гена *Avr4*,
использованные для множественного выравнивания**

Регистрационный номер в GeneBank NCBI	Описание последовательности
KR013197, KR013198, KR013203, KR013204	Нефункциональные варианты гена <i>Avr4 P. infestans</i> из образцов из Владимирской области
KR013199, KR013200, KR013201, KR013202	Нефункциональные варианты гена <i>Avr4 P. infestans</i> из образцов из Московской области
KF188215	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 1.4 гаплотипа 1
KF188216	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 1.4 гаплотипа 2
KF188217	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 3 гаплотипа 1
KF188218	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 3 гаплотипа 2
KF188219	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 3 гаплотипа 3
KF188220	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 3 гаплотипа 4
KF188221	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 11 гаплотипа 1
KF188222	Нефункциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 11 гаплотипа 2
KF188223	Функциональный вариант гена <i>Avr4 P. infestans</i> из изолята расы 11 гаплотипа 3
EF672355	Ген, кодирующий эффекторный белок <i>Avr4 P. infestans</i>
EF672354	Ген, кодирующий усеченный эффекторный белок <i>Avr4 P. infestans</i>

Таблица 2

**Варианты аллельного полиморфизма гена *Avr4*
и нуклеотиды, которыми они различаются**

Варианты <i>Avr4</i>	Обозначение варианта	Образцы	Порядковые номера нуклеотидов			
			180	278	376	439
Функциональный	WT	PiAvr4, <i>Avr4-r11-h3</i>	T	T	G	G
Нефункциональные	I	1-B1, 1-B2, 2-B2, 2-B3, 1-D1, <i>Avr4-r1.4-h1</i>	T	T	G	G
	Ia	<i>Avr4-r3-h1</i>	T	T	T	G
	Ib	<i>Avr4-r3-h4</i>	T	C	T	G
	Ic	1-D2	C	T	T	G
	II	2-D5, 2-D6, <i>Avr4-r1.4-h2</i> , <i>Avr4-r3-h2</i> , <i>Avr4-r11-h1</i> , <i>Avr4-r11-h2</i> , <i>Avr4 EF672354</i> , <i>Avr4-r3-h3</i>	C	A	T	A

ЛИТЕРАТУРА:

1. Вахрушева О.А., Недоспасов С.А. Система врожденного иммунитета у растений // Молекулярная Биология. 2011. Т. 45 (№ 1). С. 20–29.
2. Armstrong M.R. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm / M.R. Armstrong, S.C. Whisson, L. Pritchard et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. P. 7766–7771.
3. Bent A.E., Mackey D. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions // Annu. Rev. Phytopathol. 2007. Vol. 45. P. 399–436.
4. Bos J.I. The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana* / J.I. Bos, T.D. Kanneganti, C. Young et al. // Plant J. 2006. Vol. 48. P. 165–176.
5. Cárdenas M. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region / M. Cárdenas, A. Grajales, R. Sierra et al. // BMC Genet. 2011. Vol. 12 (pub. 23). 13 p.
6. Elansky S. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow Region, Siberia and Far East / S. Elansky, A. Smirnov, Y. Dyakov et al. // J. Phytopathology. 2001. Vol. 149. P. 605–611.
7. Jiang R. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members / R. Jiang, S. Tripathy, F. Govers et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 4874–4879.
8. Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // Nature. 2001. Vol. 411. P. 695–697.
9. van Poppel P., Guo J., van de Vondervoort P. et al. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector / P. van Poppel, J. Guo, P. van de Vondervoort et al. // Mol. Plant–Microbe Interact. 2008. Vol. 21. P. 1460–1470.
10. van Poppel P., Huigen D.J., Govers F. Differential recognition of *Phytophthora infestans* races in potato *R4* breeding lines // Phytopathology. 2009. Vol. 99 (10). P. 1150–1155.
11. van Poppel P. Recognition of *Phytophthora infestans* *Avr4* by potato *R4* is triggered by C-terminal domains comprising W motifs / P. van Poppel, R. Jiang, J. Sliwka et al. // Mol. Plant Pathol. 2009. Vol. 10 (5). P. 611–620.