МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ» (ФГБНУ ВНИИСБ)

На правах рукописи

Чижик Вера Константиновна

SSCP-анализ генов вирулентности возбудителя фитофтороза Phytophthora infestans

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат биологических наук,

Мартынов В. В.

Оглавление

Список сокгащении	4
ВВЕДЕНИЕ	б
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1 Иммунитет растений и особенности взаимодействия пат	соген —
растение-хозяин	14
1.2 Возбудитель фитофтороза <i>P. infestans</i>	21
1.2.1 Систематическое положение P. infestans	21
1.2.2 Жизненный цикл <i>P. infestans</i>	
1.2.3 Особенности генома P. infestans	
1.3 Гены вирулентности (Avr гены) P. infestans, их функции	, модульное
строение, механизмы возникновения и изменчивости	
1.3.1 Модульное строение RXLR эффекторов	
1.3.2 Функции эффекторных белков и механизмы их распоз	навания в
клетке	
1.3.3 Механизмы возникновения и изменчивости генов виру	улентности
	• •
1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i>	
1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i>	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i> 1.4 Гены устойчивости (<i>R</i> гены) картофеля 	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i> 1.4 Гены устойчивости (<i>R</i> гены) картофеля 1.4.1 Модульное строение <i>R</i> генов 	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i> 1.4 Гены устойчивости (<i>R</i> гены) картофеля 1.4.1 Модульное строение <i>R</i> генов 1.5 Молекулярные методы определения генетического разн 	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i> 1.4 Гены устойчивости (<i>R</i> гены) картофеля 1.4.1 Модульное строение <i>R</i> генов 1.5 Молекулярные методы определения генетического разн <i>infestans</i>	
 1.3.4 RXLR эффекторы P. infestans 1.3.5 CRN эффекторы P. infestans 1.4 Гены устойчивости (R гены) картофеля 1.4.1 Модульное строение R генов 1.5 Молекулярные методы определения генетического разн <i>infestans</i> ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i>	
 1.3.4 RXLR эффекторы <i>P. infestans</i> 1.3.5 CRN эффекторы <i>P. infestans</i>	

3.1 Оптимизация условий ПЦР и валидирование метода SSCP-анализа
для быстрого скрининга генов вирулентности <i>P. infestans</i>
3.1.1 Распределение SSCP паттернов в выборках P. infestans
3.2 Исследование полиморфизма гена вирулентности Avr2 в
популяциях Московской области91
3.3 Сравнительное исследование полиморфизма Avr генов в различных
линиях <i>P. infestans</i>
3.4 Филогенетический анализ Avr генов, основанный на разнообразии
SSCP паттернов
3.5 Сравнение профиля Avr генов P. infestans с факторами
вирулентности и профилем генов устойчивости растений картофеля 120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ
ВЫВОДЫ130
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 132

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

Avr (avirulence gene) – ген вирулентности

DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns) – молекулярные структуры, связанные с повреждением

ETI (Effector-Triggered Immunity) – иммунитет, индуцируемый эффекторами

HR (Hypersensitive Response) – сверхчувствительный ответ

ipiO (in planta induced O) – образец О, индуцируемый in planta

MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) – митоген-активируемые протеинкиназы

NB-LRR (Nucleotide Binding site and Leucine-Rich Repeat) – нуклеотидсвязывающие и лейцин-богатые повторы

ORF (Open Reading Frame) – открытая рамка считывания

PAMPs/MAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns/Microbial-Associated Molecular Patterns) – молекулярные паттерны, ассоциированные с

патогенами/микробами

PEX (Phytophthora Extracellular Protein) – внеклеточный белок Phytophthora

PTI/MTI (PAMPs-triggered immunity/MAMPs-triggered immunity) – иммунитет, стимулируемый патогенами

RLKs (Receptor Like Kinases) – рецептор-подобные киназы

RLPs (Receptor Like Proteins) – рецептор-подобные белки

R/Rpi (Resistance gene against *Phytophthora infestans*) – ген устойчивости к *Phytophthora infestans*

RXLR-s/dEER (R – аргинин, X – любой аминокислотный остаток, L – лейцин, s – серин, d – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота)

SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – полиморфизм одного нуклеотида

SP (Signal Peptide) – сигнальный пептид

SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism) – анализ конформационного полиморфизма одноцепочечных молекул ДНК

SSR (Single Sequence Repeats) – короткие тандемные повторы Effector-omics (effector genomics) – эффекторомика

введение

Фитофтороз, возбудителем Актуальность темы исследования. 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 SSCP-анализ (Strand Conformation методов является Polymorphism), на SNP-зависимых основанный выявлении изменений конформации ДНК Этот одноцепочной В денатурирующих условиях. метод МЫ использовали для разработки технологии различения линий P. infestans на основе полиморфизма первичной структуры Avr генов.

Степень разработанности темы исследования. Для генотипирования *P*. линий infestans традиционно используют набор растенийдифференциаторов 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 Мастенброка-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 – изоферментов спаривания, спектры пептидазы тип И глюкозо-6фосфатизомеразы, 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, эффекторы Р. infestans, одной кодирующих является ИЗ быстро развивающихся областей исследования этого патогена. В частности, хорошо класс RXLR генов *P. infestans*: к настоящему исследован 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), Avr9 = Avr-Smiral (Rietman et al., 2012; Jo, 2013), Avrblb2 (Oh et al., 2009) и Avr-vnt1 (Pel, 2010); для части RXLR 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*, колонизующих 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 биоинформационный 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 колонизуемых 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; научной конференции «Генетика 2019); Международной 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 микробиологии Национальной И Академии Микологии микологии (гостиница «Молодежная», Москва, 2018); Международном форуме Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни (Гостиный двор, Москва, 2018; 2019), 17 международной конференции Euroblight Workshop (Йорк, Великобритания, 2019).

Публикации. По результатам исследования опубликовано 18 печатных работ, в том числе 3 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. Фадиной 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».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Иммунитет растений и особенности взаимодействия патоген – растение-хозяин

Растения часто подвергаются атаке широкого спектра патогенов, к которым относятся вирусы, бактерии, простейшие, грибы, оомицеты, нематоды и насекомые. Растительные патогены выработали разнообразные механизмы проникновения внутрь растения, в том числе через устьица, раны или непосредственно через эпидермис. Устьица являются основным способом проникновения для многих патогенных микроорганизмов. Однако у растения существуют механизмы, позволяющие быстро вызывать закрытие блокируя устьиц при распознавании патогена, таким образом, его проникновение. Основную роль в этом процессе играет салициловая кислота (SA). Напротив, жасмонаты и жасмоновая кислота (JA) вызывает раскрытие устьиц. Многие патогены оказывают влияние на репрессоры транскрипции генов пути синтеза ЈА, индуцируют передачу сигналов ЈА или выделяют вещества, сходные по структуре, что приводит к раскрытию устьиц (Toruño et al., 2016). Для проникновения через эпидермис необходимо преодолеть такие физические барьеры, как клеточная стенка и кутикула растения. Грибные патогены способны выделять фермент кутиназа, что приводит к разрушению кутикулы. Кроме того, у некоторых грибов образуется специализированная инфекционная структура, называемая аппрессорией, которая плотно прижимается снаружи к поверхности клетки и способствует локализации секреции ферментов, разрушающих клеточную стенку растения.

Попадая в ткани растений, патогены забирают из них питательные вещества, перемещается по отдельным органам и всему растению, воздействуя на растительный организм продуктами своего метаболизма. Для того чтобы выжить, растению необходимо своевременно распознать патоген и активировать соответствующие защитные механизмы. Молекулы возбудителя, присутствие которых стимулирует развитие иммунного ответа растения, называют элиситорами. Они являются незаменимыми компонентами и продуктами метаболизма патогена или принимают участие в патогенезе и подавлении ответных иммунных реакций.

Первая группа элиситоров обозначается как консервативные молекулярные паттерны (Pathogen/Microbial Associated Molecular Patterns, PAMPs/MAMPs) возбудителя (Fawke et al., 2015). К ним относятся некоторые липиды, полисахариды, белки и гликопротеины оомицетов, такие как:

 полиненасыщенные жирные кислоты: 20:4–5,8,11,14эйкозотетраеновая кислота и 20:5–5,8,11,14,17-эйкозопентаеновая кислота, которые могут вызывать специфические разрывы мембран и/или активизацию метаболизма оксилипинов;

– β-глюканы и родственные полисахариды. Глюканы являются главным компонентом клеточных стенок *P. infestans*. Также они являются иммуномодуляторами: среди них есть элиситоры, индуцирующие устойчивость, и супрессоры, снижающие устойчивость у сортов картофеля, устойчивых к фитофторозу;

– элиситины представляют собой семейство гидрофильных белков, которые участвуют в транспорте стеринов из зараженного растения в мицелий. Некоторые паразитические оомицеты, включая виды *Phytophthora*, способность необходимые утратили синтезировать стерины, для спороношения. INF1 *P*. infestans формирования Белок связывает дегидроэргостерол и катализирует перенос стеролов между липосомами (Дьяков, 2015; Fawke et al., 2015);

- семейство белков CBEL, необходимое для адгезии с целлюлозой.

Патогены выделяют ферменты, которые разрушают клеточную стенку растения, в результате чего образуются олигомеры определенной структуры, которые относятся к группе элиситоров, связанных с повреждением клеточной стенки растений (Damage-Associated Molecular Patterns, DAMP). Они распознаются мембранными рецепторными киназами, взаимодействующими с клеточной стенкой растения (Wall Associated Kinases, WAK). Показано, что киназы этого семейства определяют целостность олигогалактуронатов растительной клеточной стенки и способны активировать сигнальные каскады и транскрипцию генов устойчивости (Шафикова и Омеличкина, 2015).

Патогенам необходимо избежать, подавить или иным образом воздействовать на иммунитет, чтобы колонизировать растение. Эффекторы – это молекулы, продуцируемые и секретируемые патогенами для подавления защитных реакций растения (Raffaele and Kamoun, 2012). Они вмешиваются в физиологические процессы в организме хозяина, способствуя колонизации. Эффекторы могут влиять на метаболизм клетки хозяина, приводить к некрозу или маскировать присутствие патогена. Многие эффекторные белки обладают консервативными мотивами (такими как мотивы RXLR, CRN, LysM, RGD, DELD, EAR, RYWT, Y/F/WXC или CFEM), локализованными в их N- или C-терминальных областях. Эффекторы либо транслоцируются в клетки растения-хозяина через специальные структуры и функционируют в цитоплазме или ядре хозяина, либо находятся в апопласте клеток растения и действуют в межклеточном пространстве (Liu at al., 2019). Бактерии обладают множественными системами секреции, которые облегчают эффекторов. Наиболее секрецию изученным секреторным путем грамотрицательных бактерий является система секреции третьего типа (T3SS), которая доставляет эффекторы в клетку и играет роль в патогенезе. Нематодные эффекторы могут непосредственно секретироваться в клетки из стилета или доставляться в апопласт растения за счет подкожной секреции. Насекомые, такие как тля, также могут доставлять эффекторы с помощью стилета. Грибы и оомицеты выделяют эффекторы через специальные структуры – гаустории и аппрессории (Toruño et al., 2016).

Эффекторы делят на две широкие категории согласно их локализации: апопластические, которые накапливаются в межклеточном пространстве

растения, и цитоплазматические, которые доставляются в растительную инфекционную клетку через специальную структуру, называемую гаусторией. эффекторы Апопластические секретируемые включают гидролитические ферменты, такие как протеазы, липазы и гликозилазы, разрушающие растительную ткань; ингибиторы ферментов И некротизирующие токсины, такие как NLP (Nep1-like) и SCR (PcF-like small cysteine-rich) белки (Haas et al., 2009; Raffaele and Kamoun, 2012). Цитоплазматические эффекторы способны перемещаться в ближайшие клетки, возможно, через плазмодесмы. К ним относят семейство эффекторов, содержащих RXLR мотив, и семейство эффекторов CRN (CRinkling and Necrosis) (Rietman et al., 2012). Наиболее изученными и многочисленными являются RXLR эффекторы. Считается, что этот мотив играет роль в связывании белка на поверхности клетки хозяина с фосфатидилинозит-3фосфатом (PI3P), после чего эффектор внедряется с помощью везикулярного эндоцитоза (Anderson et al., 2015; Jiang et al., 2008; Win et al., 2007). Однако, такой механизм проникновения в клетку оспаривается некоторыми авторами, на основании того, что липидное связывание эффекторных белков может быть опосредовано положительно заряженным лизином, а не RXLR мотивом (Lu et al., 2013; Sun et al., 2013; Wawra et al., 2012). У CRN белков также консервативный N-концевой который присутствует мотив, предположительно служит для транслокации в цитоплазму клетки-хозяина. У некоторых грибов роль эффекторов могут выполнять sRNA (Small RNA) (Liu et al., 2019; Weiberg et al., 2013).

В отличие от животных, обладающих приобретенной (адаптивной) иммунной системой, растения, чтобы распознавать патогены, полагаются на врожденный иммунитет, который условно делят на специфический и неспецифический. Неспецифический иммунитет основан на рецепторных белках (Pattern Recognition Receptors, PRRs), расположенных В плазматической мембране и которые распознают цитоплазме, В И

связываются с MAMPs, индуцируя развитие первичной или базальной защитной реакции, обозначаемой как MTI (MAMPs-triggered immunity) (Bent and Mackay., 2007). Существует два типа PRRs: рецептор-подобные белки (Receptor Like Proteins, RLPs) и рецептор-подобные киназы (Receptor Like Kinases, RLKs). RLKs состоят из внеклеточного лейцин богатого домена (Leucine Reach, LRR), трансмембранного домена и внутриклеточного киназного домена, который может связываться с MAMPs и инициировать сигнальный каскад, активизирующий MTI. LRR-домен является наиболее переменной частью PRRs и отвечает за распознавание MAMPs. У RLPs отсутствует киназный домен, делает ИХ неспособными что самим инициировать передачу сигналов и активацию МТІ и, следовательно, требует связывания с корецептором (Baxpyшева и Hegocnacob, 2011; Chatziavgerinos, 2015).

Ha цитоплазматические эффекторы втором уровне защиты распознаются белками-рецепторами, содержащими нуклеотид-связывающий домен и домен, содержащий лейцин-богатые повторы (Nucleotide-Binding Leucine Rich Repeat intracellular receptors, NB-LRR). Эти белки кодируются генами устойчивости или *R*-генами. Таким образом, узнавание осуществляется за счет прямого или косвенного взаимодействия R-белка и соответствующего эффекторного белка. являющегося продуктом авирулентного (Avr) гена. Ранее считалось, что R-гены взаимодействуют Avr генами, согласно модели Флора ген-на-ген, однако, было показано, что во многих Avr-R парах прямое взаимодействие отсутствует. Эта модель так же предполагает, что эффективность белка устойчивости сильно зависит от стабильности и изменчивости соответствующего эффекторного белка. Распознавание эффекторного белка R-белком приводит К развитию иммунитета, индуцируемого эффекторами (effector-triggered immunity, ETI), приводящего к сверхчувствительному ответу (hypersensitive response, HR). МАРК Он заключается В запуске каскада и активации факторов транскрипции WRKY (триптофан-аргинин-лизин-тирозин), что приводит к локальному апоптозу клеток (Möller and Stukenbrock, 2017) и физически предотвращает дальнейшее распространение патогена. При этом важную роль играют убиквитин-зависимая система протеолиза и ЕЗ лигазы, широко представленные в геномах растений. Размер очага некротизации при HR зависит от генотипа растения и патогена и может варьировать от 1-2 до 29 клеток. Взаимоотношения патогена и растения-хозяина описывают как совместимые, если растение восприимчиво к поражению И как несовместимые, если растение сохраняет устойчивость (Рогозина, 2011). На устойчивых растениях Avr белки являются факторами авирулентности. В связи с опасностью распознавания, эффекторные гены часто подвергаются быстрым эволюционным изменениям в популяциях патогенов (Fouché et al., 2018).

представления взаимодействии Современные 0 растительного организма и биотрофного патогена описаны с помощью зигзаг модели, постоянный процесс совершенствования которая отражает стратегий нападения патогена и механизмов иммунного ответа растения (Jones and Dangl, 2006). Согласно этой модели, первый слой защиты растений включает в себя обнаружение MAMPs для активации MTI, чтобы остановить дальнейшее развитие инфекции. Однако патогены секретируют эффекторы, которые подавляют МТІ. В свою очередь растения разработали второй уровень защиты, который включает в себя R гены, которые прямо или косвенно воспринимают эффекторы возбудителя, и запускают ЕТІ. Это приводит к возникновению мутантных форм эффекторов, которые сохраняют свои функции, но при этом не распознаются генами устойчивости. В коэволюции растение-патоген следующим шагом является эволюция генов устойчивости, которые будут распознавать новые формы эффекторов (Рисунок 1).



Рисунок 1. Зигзаг модель эволюции иммунной системы растений и эффекторов патогенов (по Jones and Dangl, 2006)

Однако, как и любая модель, она имеет ограничения. В частности, зигзаг модель не является количественной или прогностической основой для непосредственного изучения взаимодействия растений и микробов. Она не взаимодействие распространяется на между растением хозяином И некротрофным патогеном, не учитывает DAMP, влияние окружающей среды (абиотические и биотические факторы), не отражает количественные характеристики процесса. Зигзаг модель чрезвычайно широко используется и дает представление об эволюционном развитии компонентов иммунной (Pritchard Birch. системы И эффекторов and 2014). Кроме того. взаимоотношения растения и биотрофного патогена в настоящее время рассматривают как компромисс (trade-off), позволяющий колонизируемому растению и патогену выжить и оставить максимальное число потомков. Резонно было бы предположить, что такой механизм реализуется и при взаимодействии P. infestans с картофелем.

1.2 Возбудитель фитофтороза *P. infestans*

1.2.1 Систематическое положение P. infestans

P. infestans относится к роду *Phytophthora*, класс оомицеты (*Oomycota*) (Thines and Kamoun, 2010). На сегодняшний день род Phytophthora включает в себя более 150 видов, которые объединяют в 10 филогенетических клад (Martin et al., 2014). Однако определение четких и объективных границ между видами остается проблемой во всех кладах Phytophthora (Mideros et al., 2018). Было показано, что *P. infestans* представляет собой комплекс видов, к которому относится еще пять представителей: P. mirabilis, P. betacei, P. ipomoeae, P. phaseoli и P. andina. P. mirabilis был обнаружен в Центральной Америке, где он поражает только *Mirabilis jalapa*, являющееся декоративным и лекарственным растением. *Р. betacei* является патогеном *S. betaceum* (Mideros et al., 2018). *P. ipomoeae* заражает два вида *Ipomoea longipedunculata* и *I. purpurea*, которые эндемичны для высокогорных районов центральной Мексики. P. phaseoli, первоначально классифицированная как P. infestans, распространена по всему миру, но поражает только плоды *Phaseolus lunatus*. В результате генетических исследований в отдельный вид была выделена Р. andina, apean которой ограничен территорией Андского района Эквадора и Перу (Oliva et al., 2010). Согласно некоторым данным, *P. andina* является гибридом, возникшим в результате скрещивания P. infestans и другого неописанного вида *Phytophthora* (Goss et al., 2011).

Эти наблюдения, наряду с данными филогенетического анализа на основе молекулярных маркеров, показывают, что данный вид является полифилетическим или комплексом видов, который включает, по крайней мере, две генетически отличные линии (Cárdenas et al., 2011; Forbes et al., 2016; Oliva et al., 2010). Специализация патогена к определенному хозяину считается одним из наиболее значимых изолирующих механизмов. В частности, было показано, что одноаминокислотный полиморфизм в протеазе хозяина и взаимное одноаминокислотное изменение в эффекторе патогена

лежит в основе экологического разделения *P. infestans* и *P. mirabilis*, которое произошло около 1300 лет назад (Dong et al., 2014).

В связи с мицелиальным строением, оомицетов долгое время относили к царству грибов (*Fungi*) (Bouwmeester et al., 2009). Однако, согласно данным молекулярной филогенетики и геносистематики, эти таксоны разошлись еще до отделения грибов от растений и животных (Рисунок 2) (Raffaele and Kamoun, 2012).



Рисунок 2. Филогенетическое древо эукариотов (по Raffaele and Kamoun, 2012)

Таким образом, таксономически оомицеты ближе к бурым (*Phaeophyta*) и диатомовым (*Bacillariophyta*) водорослям, чем к настоящим грибам. В связи с этим, они получили название «грибоподобные организмы», «псевдогрибы» или «микоиды». К ним относятся группа хромистов (*Chromista*) или страменопил (*Straminopila*).

Оомицеты и грибы имеют ряд важных биологических различий. Клеточные стенки оомицетов состоят из β-глюкана и целлюлозы, а не хитина, как у настоящих грибов. Митохондрии имеют трубчатые кристы, в то время как у грибов они дисковидной формы (Bouwmeester et al., 2009). Гифы оомицетов редко септируются. Оомицеты диплоидны на бесполой стадии развития, мейоз и прорастание ооспор происходят без редукционного деления ядер, тогда как грибы обычно гаплоидны. Для оомицетов характерен диполярный гетероталлизм, заменяющий двуполость (Еланский и др., 2017). Запасными веществами являются миколаминарин и β -глюкан, что роднит оомицетов с бурыми и диатомовыми водорослями. Полагают, что эти таксоны эволюционировали от их фототрофных предков (Lamour and Kamoun, 2009), хотя эта гипотеза оспаривалась некоторыми авторами (Stiller, 2009). Более 60% видов оомицетов являются патогенами растений. Согласно некоторым данным, в пределах класса оомицетов способность заражать растения развивалась как минимум три раза (Raffaele and Kamoun, 2012; Thines and Kamoun, 2010). Представителей рода *Phytophthora* относят к ауксотрофам, поскольку они нуждаются в экзогенных источниках стеролов и тиамина.

1.2.2 Жизненный цикл P. infestans

P. infestans поражает клубни, стебли и листья картофеля (Solanum tuberosum), а также листья и стебли томатов (S. lycopersicum) и некоторых других членов семейства Solanaceae, к которым относятся сорняки, присутствующие на картофельных полях; паслен черный (S. nigrum) и паслен сладко-горький (S. dulcamara). Несмотря на свою способность заражать эти виды растений, популяции *P. infestans* обычно разделяются на генетически различимые линии, которые в основном ограничены одним хозяином. Лабораторные перекрестные инокуляционные тесты выявили адаптацию к определенному хозяину, проявляющуюся в различных паттернах экспрессии генов (Kröner et al., 2019). В отличие от большинства представителей рода *Phytophthora*, *P. infestans* обычно поражает верхние части растений (Raffaele and Kamoun, 2012).

P. infestans и родственные виды – гемибиотрофы (Oh et al., 2010). Для гемибиотрофных патогенов характерно наличие биотрофной стадии, которая проходит в живых клетках растения, служащих основным источником питательных элементов и некоторых незаменимых веществ (например, стеролов). Она необходима для перехода к некротрофной фазе и завершения жизненного цикла. *P. infestans* требуется приблизительно 2-3 dpi (day post

infection, дней после заражения) для завершения биотрофной стадии (Fry, 2008). Для патогенов, имеющих самые большие размеры геномов среди возбудителей болезней растений, характерно наличие биотрофной фазы и возможность к заражению одного или нескольких видов растений-хозяев (Raffaele and Kamoun, 2012).

Жизненный цикл *P. infestans* представлен на Рисунке 3.



Рисунок3.ЖизненныйциклP.infestans(http://www.kartofel.org/bolezn/phytophth/fitoftora_simptom.htm)

Для проникновения в растительную клетку патогены часто используют естественные отверстия, такие как устьица и раны, чтобы избежать специализированных барьеров растений, таких как кутикула листьев. Следующим барьером для патогена является межклеточное пространство с рН около 3.2, которое содержит защитные ферменты и антимикробные соединения. Растительные клетки окружены клеточной стенкой, поэтому *P*. некоторые фитопатогены, В частности infestans, образуют специализированные структуры, называемые гаустории, для проникновения в клетку растения (Seman, 2013). Питаясь тканями листа, *P. infestans* вызывает образование темных пятен, которые во влажную погоду чернеют и загнивают.

Бесполое осуществляется размножение С помощью структур, называемых спорангиеносцы. Они прорастают наружу через устьица на нижней поверхности листа и образуют налет белого цвета при высокой влажности и оптимальном диапазоне температур около 18-22°C. На концах спорангиеносцев формируются лимоновидные зооспорангии. Присутствие свободной воды значительно способствует распространению спорангиев. Попадая на поверхность листа картофеля, в присутствие капельножидкой воды, спорангии прорастают 6-8 зооспорами, которые после периода движения округляются, покрываются оболочкой и прорастают ростковой трубкой, которая через устьице проникает в ткань листа и развивает мицелий внутри тканей растения. Также спорангии способны заражать клубни. Весной зараженные побеги прорастают из инфицированных клубней. Патоген выживает в зимний период либо в виде мицелия в клубнях, почве, остатках ботвы, либо в складских помещениях (Еланский и др., 2017).

Для *P. infestans* характерен гетероталлизм, заменяющий двуполость. Для полового размножения необходимо, чтобы штаммы с разным типом спаривания (обозначаемые как A1 и A2) инфицировали одно и то же растение. В популяциях *P. infestans* в Московской области были обнаружено оба типа спаривания (Кузнецова и др., 2018). Два типа спаривания различаются по выработке гормонов, и не различаются морфологически. В образующихся мужских (антеридии) и женских (оогонии) структурах проходит мейоз, затем гаплоидные ядра сливаются с образованием диплоидной ооспоры. Ооспоры сохраняют жизнеспособность в течение нескольких лет в почве и при благоприятных условиях могут прорастать, образуя бесполое спороношение. Иногда образуются самофертильные и партеногенетические ооспоры. Однако, главным образом, для *P. infestans* характерно вегетативное размножение. В недавнем исследовании было показано (Knaus et al., 2019), что в Мексике, в центре происхождения *P. infestans* представлены в основном диплоидными формами, в то время как в других частях мира популяции представлены преимущественно клональными линиями, для которых характерна триплоидность. Для популяций *P. infestans* в Московской области характерен высокий уровень полиморфизма, все образцы отличаются по 12 SSR локусам (Sokolova et al., 2017), в популяциях присутствуют оба типа спаривания, однако плоидность *P. infestans* остается неизвестной.

1.2.3 Особенности генома P. infestans

Изучение генома *P. infestans* является ключевым инструментом для понимания ее патогенного успеха. Для многих оомицетов характерны огромные фенотипические различия даже при бесполом размножении. Генетическая основа этого явления не ясна, но оно может быть обусловлено нестабильностью генома, которая, в свою очередь, вызвана действием мобильных генетических элементов, генной конверсией, митотической рекомбинацией, и/или нестабильностью хромосом. Последовательности, аналогичные мобильным генетическим элементам встречаются в геноме *Phytophthora* в большом количестве. В связи с наличием небольших, трудно различимых хромосом, гаплоидное число хромосом *P. infestans* может быть характерна трисомия (van der Lee et al., 2004; van Poppel et al., 2008; Knaus et al., 2019).

Полногеномное секвенирование *P. infestans* было осуществлено в 2009 году из изолята T30-4. Было обнаружено множество повторов в ДНК, на которые приходится около 74% генома *P. infestans*, однако признаков дублирования целого генома или масштабного сегментарного дублирования обнаружено не было (Haas et al., 2009). Размер генома *P. infestans* составляет около 240Mb, что значительно превышает геномы таких представителей рода *Phytophthora* как *P. sojae* (95Mb) и *P. ramorum* (65Mb), которые являются возбудителями фитофторозной корневой гнили сои и внезапной гибели дуба,

соответственно. Однако, геном *P. betacei* почти вдвое превышает геном *P. infestans* (Mideros et al., 2018).

Более трети генома составляют мобильные генетические элементы, среди которых наиболее распространены Gypsy Pi-1 и LTR (new Gypsy long terminal repeat). Геном *P. infestans* содержит гораздо больше мобильных генетических элементов, чем геномы *P. sojae* и *P. ramorum* (Tyler et al., 2006). Увеличение размера генома, не характерное для паразитов, вероятно, представляет собой пример эволюционного компромисса, поскольку затраты на поддержание дополнительной ДНК уравновешиваются функциональными преимуществами, которые она предоставляет (Raffaele and Kamoun, 2012). Это в свою очередь приводит к пластичности генома, которая позволяет приспосабливаться патогену к организму-хозяину, а также дает возможность заражать новые виды растений, которые раньше не поражались данным патогеном.

P. infestans, P. sojae и P. ramorum представляют собой три основных филогенетических клады рода *Phytophthora*. Их геномы обогащены генами, участвующими в клеточных процессах, таких как репликация ДНК, транскрипция и трансляция белка, в то время как гены, играющие роль в клеточных недопредставлены. Различия защитных механизмах, обнаруживаются В количестве репертуаре генов вирулентности, И специфичных каждого хозяина. Сравнение для трех геномов рода Phytophthora выявило необычную организацию их генома, который содержит области, богатые генами домашнего хозяйства (house-keeping), в которых плотность генов относительно высока, а повторы отсутствуют, и участки с низкой плотностью генов, содержащие большое число повторов И мобильных элементов. При этом такие участки не отличаются по содержанию GC от остальной части генома, что согласуется с данными о распространении ретротранспозонов *Phytophthora*, В геноме предшествующем расхождению нескольких видов (Raffaele and Kamoun,

2012). Гены вирулентности, как правило, находятся в таких участках. Таким образом, была сформулирована концепция двухскоростной эволюции генома, согласно которой, геном P. infestans состоит из двух частей. Одна часть богата генами, кодирующими RXLR эффекторы, и эволюционирует быстро. Эта повышенная скорость эволюции достигается за счет того, что мобильные элементы создают высокодинамичные геномные области, которые обеспечивают формирование разнообразия, а также за счет создания вставок/делеций или дупликаций (Fouché et al., 2018; Raffaele and Kamoun, 2012). Другая часть содержит гены домашнего хозяйства и эволюционирует медленно, что обеспечивает стабильность основного генома (Dong et al., 2014; Möller and Stukenbrock, 2017). Схожей организацией генома обладает аскомицет Leptosphaeria maculans (Rouxel et al., 2011) и Verticillium dahliae (de Jonge et al., 2013).

Набор эффекторов у патогенов постоянно видоизменяется в ходе коэволюции с растением-хозяином, иными словами, растение-хозяин является важным фактором естественного отбора и эволюции для патогена (Gladieux et al., 2014; Raffaele and Kamoun, 2012). Это, вероятно, играет решающую роль в быстрой адаптации патогена к растениям-хозяевам и лежит в основе его эволюционного потенциала.

1.3 Гены вирулентности (Avr гены) P. infestans, их функции, модульное строение, механизмы возникновения и изменчивости

Наиболее изученной и многочисленной группой цитоплазматических эффекторов *P. infestans*, по предварительным оценкам насчитывающей около 560 представителей (Haas et al., 2009; Raffaele and Kamoun, 2012), является семейство генов, содержащее RXLR мотив (где R – аргинин, X – любой аминокислотный остаток, L – лейцин). Эффекторные белки действуют на различные пути иммунной системы растений, подавляя ее, что приводит к усилению колонизации растения патогеном (Anderson et al., 2015; Whisson et al., 2016). Локализация эффекторного белка может быть различной и зависит

от локализации его мишени в клетке. Так, эффекторы локализуются в ядре, эндоплазматической сети, митохондриях, пероксисомах и микротрубочках (Wang et al., 2018). RXLR мотив играет роль в связывании белка на поверхности клетки-хозяина с фосфатидилинозит-3-фосфатом и внедрении эффектора внутрь клетки. Кроме RXLR мотива, на N-терминальной части молекулы белка также присутствует консервативный мотив s/dEER. Стерминальная часть молекулы содержит полиморфные домены. Согласно анализу протеома, экспрессия RXLR эффекторов строго ограничена, поскольку приводит возникновению их распознавание К Основными сверхчувствительного ответа в клетках растения-хозяина. механизмами подавления экспрессии генов являются метилирование ДНК и гистонов. Эпигенетический контроль экспрессии эффекторных генов на избегания определенных стадиях инвазии является механизмом распознавания иммунной системой хозяина. На ранней стадии развития болезни экспрессируются около 245 RXLR эффекторов (Yin et al., 2017). Увеличение числа RXLR генов в геноме *P. infestans*, по-видимому, обусловлено неаллельной гомологичной рекомбинацией И тандемной дупликацией (Haas et al., 2009; Möller and Stukenbrock, 2017). Было показано, что количество RXLR эффекторов коррелирует с жизненной стратегией патогена. Наибольшее число таких последовательностей обнаружено в геноме гемибиотрофов. В геномах P. infestans, P. sojae, P. capsici и P. parasitica было обнаружено 563, 390, 370 и 170 последовательностей, кодирующих потенциальные эффекторные белки, соответственно (Jiang et al., 2008; Lamour et al., 2012; Dalio et al., 2018). Количество эффекторных белков с RXLR или RXLR-like мотивами значительно ниже у исследованных биотрофных патогенов, так в геноме Albugo laibachii обнаружено 25, в *P*. Plasmopara halstedii И viticola обнаружено 50 геномах последовательностей, содержащих RXLR мотив. Некротрофные патогены не содержат RXLR эффекторов (Liu et al., 2019).

У *P. infestans* были описаны гены, кодирующие эффекторные белки, относящиеся к классу цитоплазматических RXLR эффекторов, в частности гены *Avr1* (Du et al., 2015а), *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), *Avr9* = *Avr-Smira1* (Rietman et al., 2012; Jo, 2013), *Avr-blb2* (Oh et al., 2009) и *Avrvnt1* (Pel, 2010), а у картофеля были охарактеризованы гены, кодирующие *R* белки, отвечающие за распознавание специфических эффекторных белков *P. infestans*. Таким образом, эффекторному белку соответствует определенный R белок (Таблица 1).

Таблица 1. Гены вирулентности *P. infestans*, их номера в Генбанке NCBI и соответствующие им гены устойчивости картофеля

Avr ген	Универсальное	№ в Генбанке	<i>R</i> ген
	международно-	NCBI	
	принятое обозначение		
	гена		
Avr1	PITG_16663,	XM_002896847,	R1
	PITG_06432	XM_002998511	
Avr2/Avr-blb3	PITG_22870	XM_002902940	R2/Rpi-blb3
Avr3a	PITG_14371	XM_002898796	R3a
Avr3b	PITG_18215	XM_0029978	R3b
Avr4	PITG_07387	XM_002904373	R4 *
Avr8 (Avr-	PITG_07558	XM_002904498	R8 (Rpi-
Smira2)			Smira2)
Avr9 (Avr-	PITG_07750	XM_002904490	R9a (Rpi-
Smira1)			Smira1)
IpiO (Avr-blb1)	PITG_21388	XM_002895005	RB/Rpi-
			blb1/Rpi-sto1

Avr-blb2	PITG_20300/PEXRD40	XM_002895872	Rpi-blb2
	PITG_04090/PEXRD39	XM_002905755	
	PITG_18683	XM_002997266	
	PITG_04085	XM_002905749	
	PITG_04086	XM_002905750	
	PITG_20303	XM_002895876	
	PITG_20301	XM_002895873	
Avr-vnt1	PITG_16294	XM_002897316	Rpi-vnt1.1

* Этот ген не охарактеризован молекулярными методами

1.3.1 Модульное строение RXLR эффекторов

Для многих патогенных организмов характерно наличие эффекторных белков небольших размеров (около 300 а.о.) (De Carvalho et al., 2017). Nтерминальная область эффекторного белка представлена консервативными доменами, которые, как предполагают, принимают участие в транслокации в клетку; С-терминальный участок, напротив, высокополиморфен и играет роль в избегании распознавания патогена иммунной системой растения за счет специфического взаимодействия с белком мишенью. Все эффекторные белки *P. infestans*, относящиеся к семейству RXLR эффекторов, содержат RXLR и s/dEER мотивы. RXLR мотив находится в N-терминальной области белка, как правило, в пределах 40 а.о. от сигнального пептида (SP – signal peptide) (Wawra et al., 2017). RXLR и s/dEER мотивы находятся на расстоянии 5-25 а.о. друг от друга. В связи с вышесказанным, RXLR и s/dEER мотивы обеспечивают мощный биоинформационный инструмент для идентификации потенциальных эффекторных белков патогенных оомицетов (Yin et al., 2017) (Рисунок 4).



последовательностях генов вирулентности *P. infestans*, полученных в результате данного исследования (<u>http://meme-suite.org/</u>)

Для RXLR белков характерно обилие остатков цистеина, что придает компактную структуру белку (Fouché et al., 2018). В С-терминальной области у некоторых RXLR белков *P. infestans* были обнаружены W и Y мотивы, участвующие в подавлении апоптоза клетки (Seman, 2013).

В геномах некоторых паразитических грибов также были обнаружены RXLR и RXLR-like ([RHK]X[LMIFYW]) мотивы (Selin et al., 2016; Schmoll et al., 2016). Таким образом, грибы и оомицеты, относящиеся к разным царствам живых организмов, используют сходные стратегии заражения своих растений-хозяев, которые возникли, предположительно, в результате конвергентной эволюции (Meng et al., 2009).

Двойной **RXLR-EER** мотив близок по последовательности И расположению мотиву PEXEL или RXLXE/D/Q, обнаруженному В эффекторных белках Plasmodium spp. Этот мотив необходим малярийному плазмодию для проникновения В клетки крови животных-хозяев (Bouwmeester et al., 2009). Было показано, что фрагмент эффекторного белка Avr3a P. infestans, содержащий RXLR-EER мотив и GFP (green fluorescent protein), обеспечивает транслокацию GFP в эритроциты. При замене мотива **RXLR-EER** белка на RXLXE/D/Q сохраняется способность V К проникновению в клетки растения-хозяина. образом, Таким данный механизм проникновения в клетки является очень древним и общим как для патогенов растений, так и для патогенов животных (Birch et al., 2009).

1.3.2 Функции эффекторных белков и механизмы их распознавания в клетке

Подавление иммунитета растения является главной функцией RXLR белков (Oh et al., 2010). Эта функция может осуществляться за счет ингибирования протеаз, маскирования присутствия патогена (связывание хитиназ), взаимодействия с фитогормонами или структурного сходства с ними (компоненты биосинтеза и восприятия SA и JA являются мишенью для эффекторов различных патогенов), манипулирования везикулярным транспортом, который является важной частью базальной защиты растения, манипулирования экспрессией генов счет действия на за факторы транскрипции (эффектор Pi03192 *P*. infestans взаимодействует С транскрипционными факторами NAC хозяина, предотвращая их локализацию в ядре, влияя тем самым на их функцию) и подавления механизма сайленсинга (PSR – *Phytophthora* suppressor of RNA silencing влияет на биогенез малых РНК) (Boevink et al., 2016; Chaparro-Garcia et al., 2015; Hörger et al., 2013; Van Damme et al., 2012; Toruño et al., 2016; Qiao et al., 2013). Анализ возможных функций эффекторных белков, особенно так называемых «основных/коровых эффекторов», имеет решающее значение для понимания механизмов патогенности/симбиоза и стратегий защиты растений, что в свою очередь позволяет разрабатывать стратегии селекции устойчивых к патогенам сортов (Liu et al., 2019).

Было показано, что некоторые эффекторы способны подавлять как MTI, так и ETI (Yin et al., 2017). Экспрессия эффекторных генов регулируется стадией взаимодействия растения-хозяина и патогена. Некоторые RXLR эффекторы *P. infestans* действуют на предшествующем инфицированию этапе, другие в фазу биотрофного питания возбудителя и наконец, третьи экспрессируются на некротрофной стадии (Рогозина, 2011). Эффекторы, экспрессирующиеся на некротрофной стадии могут быть либо неспецифичными, либо действовать как токсины, вызывая некроз у определенных генотипов растений, обладающих доминантными генами чувствительности. Клонирование генов чувствительности показало, что они напоминают внутриклеточные иммунные рецепторы растений, с сайтами NB и архитектурой домена LRR. Таким образом, некротрофные эффекторы могут использовать активацию NB-LRR в растениях для индуцирования чувствительности к эффекторам. В течение заражения развития И волн заболевания наблюдается так называемая «смена экспрессии» различных эффекторов. Вне рода *Phytophthora*, смена экспрессируемых эффекторов была показана для Blumeria graminis и видов рода Colletotrichum, однако механизмы регуляции этих процессов остаются малоизученными (Toruño et al., 2016).

Для нескольких RXLR эффекторов были определены мишени, находящиеся в разных частях растительной клетки (Таблица 2). Однако для большинства эффекторных белков механизм действия и мишень в растительной клетке остаются неизвестными. В недавнем исследовании было показано, что некоторые Avr белки *P. infestans* могут иметь несколько мишеней в клетке организма-хозяина (Wang et al., 2018).

Существует несколько гипотез, объясняющих непрямое распознавание эффектора. Согласно «сторожевой» гипотезе (guard hypothesis) R белки белков. Взаимодействие ассоциированы с белками-мишенями Avr эффекторного белка с белком-мишенью приводит к изменению структуры последнего, что распознается R белком и приводит к запуску иммунного ответа. Такой механизм взаимодействия был показан для Avr2 и R2. «Обманная модель» (decoy model) предполагает, что белок-посредник не является мишенью эффектора, а его структурным аналогом, который конкурирует за связывание с эффектором. Согласно «модели приманки» (bait-and-switch model) белки устойчивости могут связывать эффекторы только после того, как они образуют комплекс с белком-посредником. При этом может резко возрастать сродство комплекса растительный белок-

посредник/эффектор к R-белку (Шафикова и Омеличкина, 2015; van Ooijen et al., 2007).

Таблица 2. Известные мишени и механизм действия Avr генов P. infestans в организме растения-хозяина

Эффекторный белок	Механизм действия	Белок-мишень
Avr1	Нарушение везикулярного транспорта за счет ингибирования Sec5; подавление CRN2 индуцированной гибели клеток	Sec5 (subunit of the exocyst complex)
Avr2	Взаимодействует с брассиностероидом и способствует антагонизму между ростом и иммунным ответом	BSL1 фосфатаза, участвующая в сигналинге гормона роста BR
Avr2-like		Bsu-like фосфатаза
Avr3a	Связывание и стабилизация убиквитинлигазы CMPG1; аллельный вариант Avr3a ^{KI} и гомолог PEX147-3 способны подавлять апоптоз, индуцированный элиситором INF1	CMPG1, Sec3
ipiO (Avr- blb1)	Белок іріО насыщает рецепторы LecRK- 1.9 и, конкурируя с интегрином, вызывает распад ткани; Белок іріО4 блокирует ETI, вызванный секрецией I и II класса генов <i>іріО</i>	LecRK-1.9 (legume-like lectin receptor kinase, рецептор RGD)
Avr-blb2	Препятствует секреции папаин-подобной цистеиновой протеазы С14 в пространство рядом с гаусторией	Папаин-подобная цистеиновая протеаза С14 (papain-like Cys protease C14)

В работах Adachi et al., 2019 и Wang et al., 2019 представлена новая модель распознавания патогена и развития НR растения (Рисунок 5).



Рисунок 5. Схема образования резистосомы. а) отдельные компоненты, участвующие в формировании резистосомы, где ZAR1 (CC-NLR HOPZ-ACTIVATED RESISTANCE1) – HOPZ-активированная устойчивость; RKS1 (RESISTANCE RELATED KINASE 1) – рецептор-подобная цитоплазматическая киназа; PBL2 (PBS1-LIKE PROTEIN 2) – BS1-like белок 2; AvrAC – эффекторный белок, активирующий комплекс. b) предполагаемое формирование и функция резистосомы (по Adachi et al., 2019)

Согласно ей, распознавание Avr белка определенным R белком приводит к образованию специальной структуры, называемой резистосомой, которая физически разрывает мембрану клетки. Модель предполагает, что белок устойчивости (ZAR1) находится в виде неактивного АДФ-связанного мономера в комплексе с цитоплазмотической киназой RKS1. Комплекс существует за счет внутримолекулярных взаимодействий, опосредованных LRR доменом белка устойчивости. Уридилирование белка PBL2 с помощью эффектора патогена приводит к связыванию PBL2 с RKS1 в комплексе ZAR1-RKS1. В результате конформационных изменений из NB домена ZAR1 высвобождается АДФ. Это, как предполагается, необходимо для перевода ZAR1 из неактивного в промежуточное состояние. Связывание АТФ с
промежуточным приводит образованию комплексом К пентамера, называемого резистосомой, N-концевые α-спирали белка находятся в центре и образуют воронкообразную структуру. Резистосома транслоцируется из цитозоля к плазматической мембране, где, как предполагается, она нарушает целостность мембраны, образуя поры что, в конечном счете, приводит к апоптозу растительной клетки. Распознавание эффекторных белков приводит к запуску иммунного ответа, в результате чего патоген теряет способность колонизовать растение. Сравнительная геномика выявила несколько механизмов, позволяющих возбудителю избегать распознавания R генами, в первую очередь за счет эпигенетической регуляции экспрессии генов вирулентности (Anderson et al., 2015).

В ходе эволюции в геноме штаммов *P. infestans* появились мутантные формы генов вирулентности, продукты которых избегают распознавания защитной системой хозяина. Например, вирулентный гомолог эффектора Avr2 – Avr2-like также взаимодействует с BSL1, однако ассоциация комплекса Avr2-like BSL1 с R2 киназой не происходит, что приводит к развитию заболевания (Saunders et al., 2012; Gilroy et al., 2011). Вирулентная форма белка Avr3a – Avr3a^{EM} не распознается продуктом гена R3a и отличается от авирулентной формы Avr3a^{KI} двумя аминокислотными заменами (Armstrong et al., 2005). Несинонимичные SNPs приводят к возникновению вирулентных аллелей Atr1 и Atr13 у H. arabidopsidis и Avr1b и Avr3c P. sojae. Для гена Avr4 характерен сдвиг рамки считывания, который приводит к образованию укороченных белков, которые не распознаются продуктом соответствующего гена устойчивости, но при этом остаются вирулентными. Штаммы *P. infestans*, содержащие полноразмерный белок Avr4, всегда являются авирулентными на растениях, содержащих R4. (van Poppel et al., 2009; Vleeshouwers et al., 2011). В случае генов *ipiO* расы *P*. infestans, экспрессирующие эффектор ipiO4, преодолевают устойчивость растений, несущих ген *RB/Rpi-blb1*, так как ipiO4 блокирует димеризацию молекул киназы RB и тем самым препятствует узнаванию патогена (Chen et al., 2012).

1.3.3 Механизмы возникновения и изменчивости генов вирулентности

Эволюция патогенов растений тесно связана с появлением и потерей генов вирулентности. Несмотря на их активное изучение, эволюционное эффекторных происхождение многих генов остается неизвестным. Эволюционный возраст эффектора отражается в степени его сохранности среди видов. Например, эффектор LysM присутствует у большинства грибов И позволяют растительным паразитических не рецепторам распознавать хитин, который составляет основу их клеток (Sánchez-Vallet et al., 2015). Некоторые эффекторы приобретают новые функции, обеспечивая патогенность на разных растениях, например, ингибиторы протеазы Р. infestans и P. mirabilis (Dong et al., 2014). Так же было показано, что, несмотря на большое разнообразие, многие эффекторы представителей рода Phytophthora, вероятно, были получены от общего предка. Более половины белков содержат консервативные С-терминальные мотивы (W, Y и L), которые могут повторяться до восьми раз (Jiang et al., 2008).

Приобретение новых генов путем горизонтального переноса генов (horizontal gene transfer, HGT) также может быть мощным источником адаптации. Горизонтально приобретенные эффекторные гены оказали сильное влияние на эволюционный успех патогена. Это было показано для эффекторного гена *ToxA*, который был обнаружен у неродственных патогенных организмов *Parastagnospora nodorum, Pyrenophora tritici-repentis* и *Bipolaris sorokiniana* (McDonald et al., 2018). Горизонтальный перенос генов также внес большой вклад в геномы оомицетов рода *Phytophthora* и *Pythium* (Savory et al., 2015).

Основными направлениями адаптации патогенов являются гибридизация и интрогрессия, создающих мозаику родительских последовательностей, которая оптимально адаптирована к новым видам и окружающей среде (Stukenbrock, 2016). Гибридизация является одним из наиболее изученных путей введения чужеродных генов в генофонд патогена. Обычно образуется переходная гибридная стадия, которая является совместимой с родительским видом. Затем генетический материал может быть интрогрессирован посредством повторного обратного скрещивания (Fouché et al., 2018).

Отсутствие ортологов гена у близкородственных видов или у предполагаемого донора этого гена, в случае, когда ген был получен горизонтально, делает восстановление источника очень сложным. Неопределенность в отношении ортологии может быть вызвана несколькими факторами. Во-первых, быстрая эволюция эффекторных генов из-за давления отбора, оказываемого растением-хозяином. Во-вторых, эффекторные гены, как правило, утрачиваются гораздо чаще, чем более консервативные гены. В-третьих, эффекторные гены могли возникнуть в результате дупликации гена или из некодирующих последовательностей в недавнем эволюционном прошлом (Plissonneau et al., 2017).

Паралоги генов вирулентности могут возникать путем тандемной дупликации и негомологичной аллельной рекомбинации. Они быстро накапливают мутации, что приводит к дивергенции генов. Эффекторные гены могут также возникать *de novo* за счет мутаций, превращающих некодирующую ДНК в функциональную последовательность с открытой рамкой считывания (open reading frame, ORF). Эволюция гена *de novo* считалась редкой, но недавние исследования показали, что такие гены являются важным источником функционального разнообразия (Plissonneau et al., 2017). Анализ геномов и транскриптомов возбудителей выявил большое количество потенциальных эффекторных генов. Отсутствие консервативного домена белка предполагает, что эти эффекторные гены образуют пул новых и в значительной степени нефункциональных генов. Функциональные гены вирулентности могут эволюционировать из этого пула с помощью

39

дополнительных мутаций (Fouché et al., 2018). Патогены находятся в постоянной «гонке вооружений» с растением-хозяином и способность эффекторов быстро эволюционировать и избегать распознавания является решающим компонентом их успеха.

Высокий уровень полиморфизма эффекторов, возникающий за счет накопления мутаций, приводит к появлению как положительных, так и отрицательных мутаций. При высокой скорости этого процесса, каждый генотип одновременно будет содержать множество мутаций, которые положительно или отрицательно влияют на функциональность эффекторных белков. Важнейшим механизмом адаптивной эволюции является рекомбинация, которая ускоряет закрепление полезных мутаций (Рисунок 6).



Рисунок 6. Жизненный цикл генов вирулентности патогенов. В нижней левой части показаны гены, возникающие *de novo* в результате дупликации и неофункционализации из некодирующих последовательностей. Также гены могут быть получены при помощи гибридизации или горизонтального переноса. Негомологичная рекомбинация может приводить к тому, что не все потомство не получит копию гена. Гены вирулентности могут быть потеряны или инактивированы вставкой транспозона (TE), который нарушает

40

последовательность промотора (P) или открытой рамки считывания (ORF). Эффекторные гены также могут быть инактивированы через эпигенетический сайленсинг, вызванный присутствием TE или через RIP (repeat-induced point) мутации (по Fouché et al., 2018)

Сильное давление отбора приводит к закреплению несинонимичных замен, предотвращающих распознавание иммунной системой растения, но не оказывающих существенного влияния на функцию эффекторного белка. При достаточно сильном давлении отбора *Avr* ген может исчезнуть из генофонда патогена. Следствием частых потерь эффекторных генов является то, что содержание генов в штаммах патогенов должно меняться.

1.3.4 RXLR эффекторы *P. infestans*

1.3.4.1 Ген вирулентности Avr1 P. infestans

Ген устойчивости R1 специфически распознает изоляты P. infestans, несущие ген вирулентности Avr1 (Ballvora et al., 2002; van der Lee et al., 2004). Изоляты P. infestans, которые являются вирулентными на растениях картофеля R1, лишены локуса Avr1, но обладают гомологичным вариантом, обозначаемый как A-L (Avr1-like), который находится в другом локусе (Du et al., 2018).

Ко-экспрессия Avr1 и R1 в Nicotiana benthamiana приводит к развитию HR. Напротив, HR не активируется при ко-экспрессии A-L и R1. Гомология между Avr1 и A-L составляет 83%, у A-L отсутствует Т-область, а также есть ряд отличий в нуклеотидной последовательности С-терминальных мотивов (Рисунок 7).

Белок Avr1 состоит из 208 а.о. и включает в себя сигнальный пептид, RXLR мотив, два мотива W и Y-мотив C-терминальной части молекулы, а также T-область. A-L белок короче Avr1 на 38 а.о. Было показано, что эти отличия определяют вирулентность A-L на растениях, содержащих *R1*.



Рисунок 7. Сравнение аминокислотных последовательностей Avr1 и A-L (по Du et al., 2018)

В исследовании Du et al., 2015а было продемонстрировано, что Тобласть является обязательной для осуществления взаимодействия Avr1-Sec5 (subunit of the exocyst complex), а также для подавления CRINKLER2 (CRN2) индуцированного апоптоза клеток. В тоже время, прямое взаимодействие между Sec5 и A-L отсутствует. Белок Sec5 является одной из субъединиц Ланный белковый комплекс участвует экзоцисты. В целом ряде внутриклеточных процессов, включая экзоцитоз, везикулярный транспорт и рост клетки. Sec5 необходим для секреции связанного с патогенезом белка PR-1 и отложения каллозы, а также играет роль в вызванной CRN2 гибели клеток. При ранениях или патологических процессах каллоза в виде аморфной массы закупоривает поры и перфорации флоэмы, что прекращает деятельность такого ситовидного элемента. P. infestans манипулирует субъединицей экзоцисты и тем самым нарушает везикулярный транспорт, который является важной частью базальной защиты растения. Такой механизм подавления иммунитета не является уникальным и был показан для некоторых других фитопатогенов. Так, Alternaria carthami секретирует белок брефелдин А, ингибирующий образование везикул и накопление каллозы (Nielsen et al., 2012).

Белок Avr1 накапливается как в цитоплазме, так и в ядре клетки растения-хозяина. Механизм распознавания белка Avr1 остается неизвестным, отсутствуют доказательства прямого взаимодействия R1 и Avr1, хотя и было показано, что для развития сверхчувствительного ответа необходимо, чтобы пара R1/Avr1 находилась в цитоплазме. (Du et al., 2015а). Возможно, это связано с тем, что белок-мишень Sec5 также локализован в цитоплазме клетки. Было показано, что мишенью Avr1 также могут быть пероксисомы (Wang et al., 2018).

1.3.4.2 Ген вирулентности Avr2 P. infestans

Как и в случае с Avr1, в геноме *P. infestans* присутствует ген Avr2, авирулентный на растениях R2, и его гомолог, обозначаемый как Avr2-like или A2l, кодирующий белок, который не распознается этим R-белком. Вирулентная форма отличается от авирулентной 13 аминокислотными заменами, из которых восемь находятся в C-концевой области. По-видимому, именно этот полиморфизм обуславливает отсутствие распознавания (Gilroy et al., 2011). Белок Avr2 накапливается в пространстве рядом с гаусторией (Du et al., 2015). Было показано, что Avr2 взаимодействует с фосфатазой BR (brassinosteroid) и способствует антагонизму между ростом и иммунным ответом в растении (Рисунок 8).



Рисунок 8. Модель влияния продукта гена *Avr2* на рост, развитие и иммунный ответ картофеля. Восприятие рецептором BSL1 фосфатазы BR вызывает развитие BR сигналинга, влияющий на CHL1 (Neural cell adhesion molecule L1-like protein), что стимулирует рост и развитие растения, но блокирует иммунный ответ (по Turnbull et al., 2017)

1.3.4.3 Гены вирулентности Avr3a и Avr3b P. infestans

Ген Avr3a относится к наиболее изученным генам вирулентности P. infestans. Ген PEX147 был идентифицирован как Avr3a в 2005 году методом коинфильтрации гена-кандидата и гена устойчивости R3a в Nicotiana benthamiana и в трансгенном картофеле сорта Desiree'. Было описано два аллеля, которые кодируют белки длиной 147 а.о. – вирулентный Avr3a^{EM} (S¹⁹ Е⁸⁰ М¹⁰³) и авирулентный Avr3a^{KI} (С¹⁹ К⁸⁰ I¹⁰³). Они отличаются тремя аминокислотами, одна из которых не связана с вирулентностью, поскольку находится в сигнальном пептиде (Armstrong et al., 2005). Различные аллельные варианты этого гена широко распространены в популяциях Р. infestans, поэтому данный ген часто используется в исследованиях в качестве положительного контроля. Авирулентный аллель, распознающийся геном устойчивости картофеля R3a, редко встречается в популяции патогена. Возможно, это связано с тем, что ген устойчивости *R3a* интрогрессирован во многие сорта культивируемого картофеля. Геном картофеля содержит многочисленные гомологи R3a, расположенные на 11 хромосоме (Huang et 2005). Авирулентный аллель Avr3a^{KI} не только запускает R3aal.. иммунитет, но также способен опосредованный подавлять апоптоз. индуцированный элиситором INF1. Однако эти функции обусловлены разными аминокислотами (Bos et al., 2009). Вирулентный аллель Avr3a^{EM} избегает распознавания R3a, но при этом его способность подавлять апоптоз, индуцированный INF1, значительно снижается. Было показано, что белок Avr3a подавляет CMPG1 (гибель клеток, вызванную U-Box убиквитин E3 лигазой). Согласно предложенной модели взаимодействия, белок Avr3a связывается и стабилизирует CMPG1, тем самым подавляя индуцируемый BAK1 (BRI1-associated kinase 1) /SERK3 (somatic embryogenesis receptor kinase) иммунный ответ. BAK1 принадлежит к семейству LRR рецепторных киназ. Иммунный ответ основан на способности ВАК1 быстро связываться с определенными MAMPs патогена, что приводит к активации митогенактивируемой протеинкиназы 6 (mitogen-activated protein kinase 6, MPK6) и производству активных форм кислорода. В тоже время, белок ВАК1 играет важную роль в передаче сигналов BR для регуляции развития растений. Таким образом, BAK1 функционирует как В передаче сигналов брассиностероидов, так и в отношении иммунитета, вызванного МАМР (Yang et al., 2011). Белок Avr3a также мешать эндоцитозу других PRR через его ассоциацию с белком, участвующим в эндоцитозе и мембранном транспорте (Chaparro-Garcia et al., 2015). Таким образом, он может регулировать специфические аспекты экзоцитоза и эндоцитоза. Было показано, что белки R3a и Avr3a локализуются в цитоплазме клетки, при отсутствии соответствующего белка устойчивости/вирулентности. Когда оба белка оказываются в одной клетке, то происходит их релокализация в эндосому. Такое перемещение необходимо для осуществления иммунного ответа и происходит только в случае распознавания Avr3a (Engelhardt et al., 2012).

В исследовании Bos et al., 2009 было показано, что мутации или делеция RXLR мотива не приводит к утрате функции белка. Критичными для сохранения функции авирулентности являются две полиморфные аминокислоты: K^{80} и I^{103} . Экспрессия этого гена строго контролируется в течение развития инфекции. Консервативное ядро RXLR-эффекторов, экспрессируемых на ранней стадии инфицирования, способны подавлять HR, вызванный экспрессией Avr3a^{KI}. В дальнейшем был обнаружен 51 гаплотип этого гена, однако наиболее распространенным остается аллель *Avr3a^{EM}* (Cárdenas et al., 2011; Yang et al., 2018).

В недавнем исследовании Wawra et al., 2017 с помощью массспектрометрического анализа было показано, что RXLR последовательность нативного Avr3a отщепляется перед секрецией патогеном, затем Nтерминальная область белка подвергается ацетилированию. ЯМР-анализ с высоким разрешением структуры показал, что мотив RXLR хорошо доступен для потенциальных процессирующих ферментов. Процессинг Avr3a в некоторой степени схож с процессингом белков, содержащих мотив PEXEL (*Plasmodium export element*) и TEXEL (*Toxoplasma export element*), обнаруженным у *Plasmodium falciparum* и *Toxoplasma gondii*, соответственно (Curt-Varesano at al., 2016). Эти результаты предполагают, что функция RXLR мотива связана с секрецией белка, а не в самом процессе проникновения в клетку-хозяина (Wawra et al., 2017).

В геноме *P. infestans* обнаружено два паралога гена *Avr3a*, обозначаемые как *PEX147-2* и *PEX147-3*. Степень гомологии с *Avr3a* составляет 95% и 92%, соответственно. За исключением PEX147-2, все варианты Avr3a и PEX147-3 стабильны при экспрессии *in planta*. Паралог *PEX147-3* распознается киназой растения R3a, в то время как *PEX147-2* избегает распознавания. Также по своей нуклеотидной последовательности ген *Avr3a* имеет сходство с геном *avr1b P. sojae*, что может указывать на их общее происхождение.

Ген *R3b* кодирует белок, который на 82% совпадает с *R3a* и находится в том же кластере R3. Ген *R3b* специфически распознает *Avr3b*, и не распознает *Avr3a*, несмотря на их высокое сходство в последовательности (Li et al., 2011). Было показано, что Avr3b может подавлять гибель клеток, вызванную эффектором PITG_22798, однако, механизм этого явления остается неясным (Wang et al., 2017). По данным AFLP анализа, у *P. infestans* в локусе *Avr3b*-*Avr10-Avr11* обнаружен ген, который кодирует выработку белка, сходного по структуре с белком регулятором транскрипции. Возможно, этот ген координирует экспрессию и секрецию всех трех генов вирулентности (Porosuna, 2011; van Poppel et al., 2008).

1.3.4.4 Ген вирулентности Avr4 P. infestans

Ген Avr4 кодирует RXLR белок, состоящий из 287 а.о., содержит три мотива W и один мотив Y на C-конце. Соответствующий ген устойчивости картофеля *R4* не охарактеризован на молекулярном уровне. Мутация рамки

считывания в *Avr4* приводит к образованию процессированных белков и потере функциональности. По сравнению с *Avr4*, укороченный аллельный вариант отличается 15 SNP и 2 однонуклеотидными делециями ($\Delta T^{12} u \Delta T^{196}$) (van Poppel et al., 2008). Эти делеции приводят к сдвигу рамки считывания и образованию укороченного белка длиной 17 а/к. Гомологи *Avr4* выявлены у близкородственных видов рода *Phytophthora: P. phaseoli, P. andina, P. mirabilis,* и *P. ipomoeae*, однако отсутствуют у видов *P. sojae, P. ramorum* и *H. parasitica*, принадлежащими к другой филогенетической ветви (van Poppel et al., 2009). Потеря *Avr4* не может быть компенсация возможна за счет ряда функционально излишних неродственных эффекторов, таким образом, данный ген не имеет решающего значения для вирулентности штамма.

1.3.4.5 Ген вирулентности Avr8 (Avr-Smira2) P. infestans

Ген вирулентности Avr8 (Avr-Smira2) представлен одной копией в геноме T30-4 P. infestans. Avr8 кодирует RXLR белок длиной 244 а.о., содержащий WY-домен на C-конце. Экспрессия белка Avr8 индуцируется на ранней биотрофной фазе взаимодействия с растением, однако экспрессия достигает пика раньше, чем для других генов вирулентности P. infestans. В результате анализа нескольких клональных линий не было обнаружено полиморфизма для этого гена (Jo., 2013). Белок Avr8 распознается соответствующим белком R8 (Rpi-Smira2), который был обнаружен в высокоустойчивом сорте картофеля Sarpo Mira. Ген R8 вносит значительный вклад в устойчивость (Rietman et al., 2012). Было установлено, что у различных видов Solanum, происходящих как из центрального, так и из южноамериканского центра разнообразия секции Petota, присутствует устойчивость к этому гену вирулентности.

1.3.4.6 Ген вирулентности Avr9 (Avr-Smira1) P. infestans

Avr9 (Avr-Smira1) *P*. infestans Ген обладает значительным полиморфизмом. Белок Avr9 распознается соответствующим белком R9 (Rpi-Smira1), который, как и R8, был обнаружен в высокоустойчивом сорте картофеля Sarpo Mira. В своей работе Rietman et. al. 2012 обнаружили два класса аллелей гена Avr-Smiral функциональных И показали, ЧТО авирулентные расы не содержат класс I вариантов гена Avr-Smiral и метионин или аргинин в положениях 156 и 170. В работе Stefańczyk et al., 2018 было показано, что ген представлен множеством аллельных вариантов, несинонимичные замены в основном находятся в С-терминальной части, которая, как известно, участвует в специфичности распознавания. Из этого можно сделать вывод, что такой полиморфизм связан с тем, что у этих белков разные мишени в клетке, либо, что более вероятно, с избеганием распознавания. Такой полиморфизм аминокислотной последовательности может привести к снижению устойчивости у сортов, содержащих ген Rpi-Smira1. Между тем, данный ген является одним из перспективных как потенциально обеспечивающий высокий уровень устойчивой к фитофторозу.

1.3.4.7 Ген вирулентности Avr-vnt1 P. infestans

Ген Avr-vnt1 кодирует RXLR белок, состоящий из 153 а.о., который распознается соответствующим белком устойчивости картофеля Rpivnt1/Rpi-phu1, обнаруженном в S. venturii и S. phureja, соответственно. Было показано, что в геноме *P. infestans* ген Avr-vnt1 представлен четырьмя вариантами, однако, этот полиморфизм не связан с функцией (Pel, 2010). Один аллелей стоп-кодон, ИЗ имеет В результате транслируется неполноразмерный белок, который, скорее всего, является не функциональным. На уровне нуклеотидной последовательности этого гена не удалось обнаружить различий между авирулентными и вирулентными штаммами. Экспрессия Avr-vnt1 строго регулируется, в вирулентных изолятах она отсутствует при наличии интактного гена. Аналогичная стратегия была показана для *Avr2* (Stefańczyk et al., 2017).

Соответствующий ген устойчивости Rpi-vnt1.1 был получен из S. venturii. Ген идентифицирован с помощью классического генетического и физического картирования и было показано, что он кодирует CC-NB-LRR белок, который обладает высокой степенью гомологии с Tm-22 из S. lycopersicum. Белок Tm-22 придает устойчивость к вирусу мозаики томатов (ToMV) (Pel, 2010). Было показано, что трансгенные растения картофеля и томата, несущие ген Rpi-vnt1.1, устойчивы к P. infestans. Позднее были обнаружены аллельные варианты этого гена (Rpi-vnt1.2 и Rpi-vnt1.3), которые несколькими нуклеотидными заменами. Показано, что ген устойчивости Rpi-phu1 из S. phureja (Śliwka et al., 2006) идентичен Rpivnt1.1, что указывает на важность этого гена, а также на общность происхождения S. venturii и S. phureja или генетического обмена между этими видами.

1.3.4.8 Семейства генов Avr-blb1 (ipiO) и Avr-blb2 P. infestans

Гены семейства *ipiO* (*in planta* induced O) впервые были обнаружены с помощью паттернов экспрессии (Pieterse et al., 1994). Мониторинг генетического разнообразия семейства *ipiO* в большом количестве изолятов *P. infestans* и родственных видов привел к обнаружению 13 вариантов, которые можно сгруппировать в три разных класса. Класс I наиболее разнообразен и широко распространен. Класс II значительно отличается от I класса и включает варианты *ipiO3* и *ipiO13*. Класс III включает ген *ipiO4*, который отличается от генов I и II класса 16 аминокислотными заменами и является генетически наиболее отдаленным (Champouret et al., 2009). При помощи коинфильтрации с *Rpi-blb1* в *Nicotiana benthamiana* было показано, что варианты генов, относящиеся к I классу *ipiO*, вызывают HR, то есть являются авирулентными на растениях, содержащих соответствующий ген устойчивости. Гены, относящиеся к классу II, были авирулентными в модельном эксперименте при агробактериальной коинфильтрации с геном RB, но в естественных условиях штаммы P. infestans, содержащие только варианты генов *ipiO* класса II, не вызывали гиперчувствительного ответа у растений, имеющих в своем геноме геном *RB*. Наличие варианта класса I может подавлять функцию вирулентности варианта класса II путем конкуренции за одну и ту же мишень в клетке растения (Champouret et al., 2009). Ген *ipiO4*, относящийся к III классу, всегда является вирулентным и Таким блокирует распознавание I класса генов. образом, штаммы утратившие гены, относящиеся к I классу, всегда вирулентны на растениях, несущих *Rpi-blb1* и его гомологи (Halterman et al., 2010). Позднее, было обнаружено еще 20 аллельных вариантов, относящихся к разным классам Avr-blb1 (Han et al., 2016). Было показано, что в данных парах осуществляется прямое взаимодействие ген-на-ген, которое подтверждается дигибридной дрожжевой системой. В присутствие генов класса I происходит олигомеризация молекулы Rpi-blb1, что приводит к активации белка и индукции иммунного ответа. Белок іріО4 физически взаимодействует с СС доменом белка Rpi-blb1 и блокирует его олигомеризацию (Chen et al., 2012).

Идентификация *ipiO* как *Avr-blb1* была осуществлена с помощью агроинфильтрации белка ipiO в растения, несущие *R*-гены. При этом два варианта гена *ipiO*, а именно *ipiO1* и *ipiO2*, вызвали HR на растениях *S. bulbocastanum*, несущих ген *Rpi-blb1/RB* (van der Vossen et al., 2003; Vleeshouwers et al., 2008). HR наблюдался также на *S. stoloniferum*, содержащего гомологи *Rpi-sto1* и *Rpi-pta1*. Вариант *ipiO4* не вызывал гибели клеток при агроинфильтрации с *Rpi-blb1* и его гомологами. Таким образом, аллели или варианты семейства генов *ipiO* различаются в отношении распознавания *Rpi-blb1* и, следовательно, в авирулентности на растениях, несущих *Rpi-blb1* (Champouret et al., 2009).

У растений активная защита от биотрофных патогенов зависит от функционального взаимодействия между клеточной стенкой и плазматической мембраной клетки. Таким образом, белки, поддерживающие это взаимодействие, также участвуют в иммунитете растения. Эффектор Р. *infestans* ipiO содержит RGD (где R – аргинин, G – глицин, D – аспарагиновая кислота) мотив, обеспечивающий адгезию клеток. Лектин-рецепторная киназа мембраны LecRK-I.9 (legume-like lectin receptor kinase, рецептор RGD) связывает интегрины, пронизывающие клеточные мембраны И объединяющие соседние клетки. Белок іріО насыщает рецепторы и, конкурируя с интегрином, вызывает распад ткани. Клеточная адгезия играет важную роль в защитных реакциях (Bouwmeester et al., 2011; Chen and Halterman, 2017). Было показано, что увеличение экспрессии LecRK-I.9 приводит к повышению устойчивости растения к P. brassicae (Bouwmeester et al., 2011).

Гены I и II класса *ipiO* широко распространены в европейских популяциях *P. infestans*, в отличие от класса III, что делает перспективным использование сортов, содержащих распознающие их гены устойчивости *RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1/Rpi-pta1* (Vleeshouwers et al., 2008).

Как и в случае с Avr-blb1, существует несколько аллельных вариантов гена Avr-blb2, которые отличаются по своей функциональности. Было RB распознавание устойчивости показано, ЧТО на геном влияет аминокислотная замена в положении 69. Последовательности, имеющие фениаланин в этом положении, являются вирулентными. Во время инфекции Avr-blb2 накапливается вокруг гаустории. С помощью транзиентной экспрессии в N. benthamiana, было продемонстрировано, что Avr-blb2 связывается и специфически ингибирует секрецию папаин-подобной цистеиновой протеазы C14 в пространстве рядом с гаусторией (Bozkurt et al., 2011). Этот класс иммунных протеаз является мишенью для множества других апопластических эффекторов (Hörger et al., 2013). Ген Avr-blb2 находится под положительным отбором, и в популяциях *P. infestans* сохраняются различные аллельные варианты, что указывает на то, что специфические аллели вносят вклад в вирулентность (Oliva et al., 2015).

1.3.5 CRN эффекторы P. infestans

Первоначально цитоплазматические эффекторы CRN (Crinkler and Necrosis – скручивание и некроз) были идентифицированы из транскриптов *P. infestans*, кодирующих предполагаемые секретируемые пептиды, которые вызывают скручивание и некроз, характерный для врожденного иммунитета растений (Torto et al., 2003). Несмотря на их первоначальное название, активность, вызывающая гибель клеток, не является общей для всех CRN эффекторов. Более того, многие CRN белки подавляют процессы гибели клеток-хозяев. Таким образом, представляется более вероятным, что CRN эффекторы действуют как регуляторы гибели клеток, а не как индукторы. В связи с этим, в некоторых работах употребляется терминология CR белки (от Crinkler-RHS-type, где RHSPs – Retrotransposon HotSpot Proteins) (Amaro et al., 2017; Zhang et al., 2016). Как и RXLR эффекторы, они широко распространены у представителей класса оомицеты (Amaro et al., 2017). Эти результаты свидетельствуют о том, что CRN являются древним классом консервативных эффекторных белков оомицетов. До сих пор мало что известно об этих эффекторах. Они повсеместно встречаются в растительных патогенных оомицетах и симбиотических грибах, но их количество у разных видов сильно различается. Анализ последовательности генома P. infestans обнаружил 196 CRN-генов, в то время как для *P. sojae* и *P. ramorum* их количество составляет 100 и 19 генов, соответственно. Было показано, что из них экспрессируются порядка 98%, что значительно выше, чем у RXLR эффекторов (Amaro et al., 2017; Haas et al., 2009). Помимо высокого уровня экспрессии, для CRN эффекторов также, как и для RXLR эффекторов, характерна смена «волн экспрессии» во время развития инфекции. Подобно RXLR, CRN представляют собой модульные белки. CRN белок содержит высококонсервативную N-терминальную часть с LxLFLAK мотивом, за HVLVVVP которым следует DWL и мотивы. Считается. что эта последовательность является горячей точкой рекомбинации. С-терминальная

область является полиморфной и отвечает за функцию белка в клетке (Gaulin, 2017). Большинство генов обладают сигнальным пептидом. Структурная организация CRN генов *P. infestans* и *P. sojae* более подробно была изучена в работе Zhang et al., 2016. В частности, было установлено наличие убиквитинового домена, который, как полагают, отвечает за секрецию и транслокацию в клетку. Кроме него, были обнаружены домены эндонуклеазы рестрикции (REase), протеинкиназы, эндонуклеазы HNH (соответствует H-N-H-мотиву, который принимает участие в формировании каталитического центра H-N-H-эндонуклеаз), нуклеазы LK (PHKазы) и множество различных доменов пептидаз, которые, как предполагают, несут свои детерминанты токсичности (Рисунок 9).



Рисунок 9. Структура CRN генов. (А) N-конец белка CRN содержит консервативные домены: сигнальный пептид; домен LXLFLAK, содержащий соответствующий мотив LXLFLAK, связанный с транслокацией; и домен DWL, который заканчивается консервативным мотивом HVLVVVP. С-конец CRN полиморфен (не показано).

(В) Структура CRN, определенная Amaro et al., 2017. N-терминальная область белка у двух видов *Phytophthora* (*P. infestans* и *P. sojae*) содержит домен, похожий на убиквитин (Ubl), который, как полагают, отвечает за секрецию и перемещение в клетку-хозяина. С-терминальная часть белка CRN содержит структуры, имеющие ферментативную функцию. В большинстве случаев С-терминальная область содержит следующую доменную структуру (NTPa3a + HTH + PHKa3a) (по Amaro et al., 2017)

Как и RXLR гены, CRN обычно встречаются в повторяющихся областях генов. Источником их разнообразия является рекомбинация (Haas et al., 2009). В отличие от RXLR эффекторов, локализация которых в клетке может быть различной, все изученные CRN эффекторы локализуются в ядре. По-видимому, локализация в ядре клетки необходима для осуществления функции CRN белков. Тот факт, что все CRN белки накапливаются в ядре, может указывать на то, что они нацелены на идентичный или ограниченный набор процессов в клетке. Однако дальнейшие исследования показали, что эта гипотеза маловероятна, поскольку для CRN белков характерна разная субъядерная локализация, кроме того, было показано, что некоторые CRN белки напрямую взаимодействуют с ДНК, в том числе влияя на экспрессию белков теплового шока (Amaro et al., 2017). CRN эффекторы грибов и оомицетов, по-видимому, действуют как регуляторы гибели клеток и подавления иммунитета хозяина. Высказывается предположение, что для CRN может быть характерна димеризация между разными CRN белками, в результате чего образуются комплексы, усиливающие вирулентность патогена (Li et al., 2016). Белки CRN фосфорилируются на разных этапах жизненного цикла. Было показано, что белок CRN8 обладает киназной активностью и локализуется в ядрах растений, что указывает на то, что он вмешивается в сигнальные пути хозяина во время инфекции. Делеция этого мотива снижает стабильность белка и уменьшает его способность вызывать гибель клеток (Van Damme et al., 2012).

Первоначально обнаруженные в оомицетах и грибах, CRN белки в настоящее время обнаруживаются в широком диапазоне эукариот, включая свободноживущие виды (Zhang et al., 2016). Данный факт указывает на то, что CRN белки могут играть роль не только в колонизации растений, но также и во взаимодействии с другими микроорганизмами путем повреждения ДНК конкурентов (Ramirez-Garcés et al., 2016). Интересно, что некоторые виды наземных растений, такие как *Selaginella moellendorffii, Physcomitrella*

54

patens, A. thaliana, Vitis vinifera, S. tuberosum и S. lycopersicum также содержат CRN белки. Их функция остается неизвестной (Zhang et al., 2016). Эти результаты предполагают либо наличие горизонтального переноса между данными видами, либо то, что все эти гены уже присутствовали у ранних предшественников эукариот (Lin et al., 2014). В связи с этим, микробные эффекторы не должны рассматриваться исключительно в контексте взаимодействия между возбудителем и растением. Эффекторы должны рассматриваться не только как гены вирулентности, но и как молекулы, позволяющие возбудителям осваивать новые экологические ниши путем устранения потенциальных конкурентов (Gaulin, 2017).

1.4 Гены устойчивости (*R* гены) картофеля

Картофель (Solanum tuberosum L.) впервые завезли в Европу в XVI веке и с тех пор он выращивается почти во всех странах мира. Ежегодно 400 производится картофеля около МЛН. тонн (http://www.fao.org/faostat/en/#home). Он считается третьей по значимости культурой в мире после риса (696 млн. тонн) и пшеницы (654 млн. тонн). Картофель дает более высокий урожай, его можно собирать раньше, и он может расти в более суровом климате, чем любая другая основная культура. Адаптация к долгому дню наряду с усилиями по разведению привела к дальнейшему распространению картофеля, который в конечном итоге стал важным источником углеводов и широко распространенным продуктом питания во всем мире. Было много споров о происхождении культурного картофеля, считается, что одомашнивание началось около 7000-10000 лет назад в Андском регионе (Spooner et al., 2005).

Solanum tuberosum является членом семейства Solanaceae, которое включает в себя такие экономически важные культуры как томат (Solanum lycopersicum), перец (Capsicum), баклажан (Solanum melongena) и табак (Nicotiana tabacum). Более 190 видов Solanum секции Petota были идентифицированы в различных частях северной и южной Америки, большинство из них сконцентрировано в Аргентине, Боливии, Мексике и Перу (Hijmans and Spooner, 2001). Эти виды могут быть использованы в качестве генетического ресурса для создания новых сортов, устойчивых к широкому спектру биотических и абиотических факторов (Seman, 2013).

Коэволюция патогена и растения-хозяина в течение миллионов лет привела к тому, что у растений появилось огромное количество иммунных рецепторов, которые способны распознавать различные классы патогенов. Чтобы вызвать заболевание, патогенные организмы должны быть способны преодолевать физические барьеры, подавлять или избегать иммунного ответа и получать питательные вещества из тканей хозяина.

Генетически устойчивые к фитофторозу сорта картофеля являются одной из наиболее эффективных, экономичных и экологически безопасных стратегий борьбы с P. infestans (Champouret et al., 2009; Rodewald and Trognitz, 2013; Yin et al., 2017). Такие сорта содержат гены устойчивости, которые могут распознавать гены вирулентности *P. infestans* и активировать защитные реакции организма для подавления инфекции. Однако, было показано, что некоторые сорта теряют свою устойчивость в течение сезона, поскольку Avr гены способны быстро эволюционировать за счет PAV (present absent variation), инделов и SNP, что приводит к нарушению and взаимодействия между Avr и R белком (Raffaele et al., 2010; Vleeshouwers and Oliver, 2014). Благодаря возрастающему пониманию функций RXLR эффекторов они становятся инструментами современной селекции на устойчивость к фитофторозу картофеля, помогая ускорить и улучшить идентификацию и функциональную характеристику R генов (Vleeshouwers) and Oliver, 2014). Для создания устойчивых сортов картофеля необходимо изучение основного состава экспрессируемых RXLR эффекторов, которые должны вносить существенный вклад в вирулентность патогенов (Dangl et al., 2013). Такой метод показал свою эффективность для борьбы с Xanthomonas axonopodis pv. manihotis (Yin et al., 2017).

Большая часть генов устойчивости была привнесена в геном картофеля путем интрогрессии генетического материала родственного дикорастущего мексиканского вида Solanum demissum, устойчивого к фитофторозу, другие дикорастущие виды также послужили источниками R генов устойчивости к фитофторозу, такие как S. stoloniferum, S. bulbocastanum, S. venturii и S. chacoense (Rodewald and Trognitz, 2013). Растения, содержащие R гены из S. demissum быстро потеряли устойчивость к фитофторозу, напротив, ген Rpiblb1, происходящий из S. bulbocastanum, в течение многих лет считался геном, дающим неспецифическую устойчивость (Champouret et al., 2009). В последние годы были идентифицированы и охарактеризованы R гены картофеля, которые вносят основной вклад в устойчивость. Гены расоспецифичной фитофторозу, устойчивости к перенесенные ИЗ дикорастущих сородичей картофеля, были охарактеризованы фитопатологическими методами и картированы по фенотипу на нескольких группах сцепления (Bradshaw et al., 2009; Gebhardt, 2016), а затем некоторые *R* гены были клонированы из дикорастущих сородичей и форм картофеля, содержащих их генетический материал (Witek et al., 2016), и подробно охарактеризованы, благодаря чему удалось установить некоторые пары эффекторный белок-распознающий его R белок. Гены R1, R2 и R3a были клонированы из Solanum demissum (Huang et al., 2005; Lokossou et al., 2009). Гены Rpi-blb1/RB, Rpi-blb2 и Rpi-blb3 получены из S. bulbocastanum (Lokossou et al., 2009; van der Vossen et al., 2003). Ген Rpi-vnt1.1 был клонирован из S. venturii (Foster et al., 2009; Pel, 2010) (Таблица 3).

Гены устойчивости	Вид Solanum
R1	S. demissum/S. stoloniferum
R2/Rpi-blb3	S. demissum/S. bulbocastanum/S. stoloniferum
R3a	S. demissum
R3b	S. demissum
R4	S. demissum
R8 (Rpi-Smira2)	S. demissum (cv. Sarpo Mira)
R9 (Rpi-Smira1)	S. demissum (cv. Sarpo Mira)
RB/Rpi-blb1/Rpi-sto1	S. bulbocastanum/S. stoloniferum
Rpi-blb2 (R9a)	S. bulbocastanum/S. stoloniferum
Rpi-vnt1.1, Rpi-vnt1.3	S. venturii
Rpi-chc1	S. chacoense

Таблица 3. Гены устойчивости и дикие виды *Solanum* из которых они были получены

В геноме растений существуют сотни NBS-LRR-кодирующих последовательностей (Jupe et al., 2012). *R* гены обычно образуют кластеры, возникающие в результате дублирования и диверсификации, и часто встречаются в регионах с высокой концентрацией повторяющихся элементов Функциональная эффективность (Seman, 2013). R гена зависит OT эволюционной скорости взаимодействующего Avr с ним гена соответствующего патогена. Введение одиночных *R* генов оказалось неэффективным. Популяции патогенов С высоким **ЭВОЛЮЦИОННЫМ** потенциалом обычно сочетают половой и бесполый тип размножения, дрейф генов, большие эффективные размеры популяции и высокую скорость мутаций. Высокий эволюционный потенциал P. infestans объясняется гетероталлическим строением, что позволяет вырабатывать половые ооспоры и переносимые в воздухе бесполые зооспоры.

Были предложены две модели для эволюции R генов. Модель «Arms-Race» (Bergelson et al., 2001) предполагает, что R гены становятся бесполезными после возникновения вирулентных штаммов. Напротив, модель Trench-Warfare (Stahl et al., 1999) предполагает, что полиморфизм R и *Avr* генов динамически изменяется во времени. Скорее всего, имеет место промежуточное состояние между этими двумя моделями. (Rietman, 2011).

Функциональный скрининг с использованием эффекторов может облегчить обнаружение новых R генов и их гомологов. Фенотипическое определение R генов трудно интерпретировать, поскольку устойчивость к одному конкретному изоляту патогена может быть результатом наличия нескольких R генов.

С практической точки зрения следует иметь в виду, что R гены могут вызывать задержку инфицирования, что было показано, например, для гена R2 (Rietman et al., 2012).

1.4.1 Модульное строение *R* генов

Эволюция защитной системы растений связана с появлением белковрецепторов, участвующих в специфическом распознавании эффекторных белков патогенов и индуцирующих развитие «вторичного» ответа. Такие рецепторы являются продуктами генов устойчивости и называются R белками. Они возникли в связи с отсутствием у растений адаптивной иммунной системы. Большая часть R белков структурно относится к суперсемейству NBS-LRR белков, содержащих N-терминальный нуклеотидсвязывающий домен (NBS) и С-терминальный богатый лейциновыми повторами домен (LRR) (Tameling and Takken, 2007). В зависимости от Nтерминального домена гены NB-LRR растений делят на две группы: (TIR)-NB-LRR, содержащие домен, гомологичный Toll и рецептору IL-1 (Toll/interleukin-1 receptor) и (CC)-NB-LRR, содержащие домен типа «суперспираль» (Lee et al., 2015). N-терминальные домены TIR и CC участвуют в образовании гомодимеров, необходимых для активации защитной реакции (Takken and Goverse, 2012). Центральный домен NB-ARC состоит из трех субдоменов: NB, ARC1 и ARC2. Домен ARC был назван на основании его присутствия в APAF-1 (арорtotic protease-activating factor-1). Домен NB-ARC действует как нуклеотид-связывающий и гидролизует ATФ, вызывая конформационные изменения в R белках. Консервативные мотивы, включая P-петлю, RNBSA-D и MHD (метионинэгистидин-аспартат) в доменах NB-ARC, играют важную роль в управлении активацией *R* гена. С-концевые домены LRR функционируют в межбелковых взаимодействиях. Домен LRR взаимодействует с доменом NB-ARC в отсутствии эффекторных белков (Lee et al., 2015).





Рисунок 10. Доменная структура иммунных рецепторов растений (Вахрушева и Недоспасов, 2011)

В отличие от PRRs, распознающих MAMPs, R белки взаимодействуют со специфичными для определенных патогенов эффекторными белками. При этом реализуется взаимодействие по типу «ген-на-ген», что означает, что каждому рецептору растения соответствует распознаваемый им фактор авирулентности патогена (эффекторный белок) (Karasov et al., 2014). Активация R белков в большинстве случаев приводит к развитию программируемой смерти клеток в локальном участке растения, что

физически изолирует инфекцию и предотвращает дальнейшее распространение патогена.

Белки NBS-LRR имеют внутриклеточную локализацию. Распознавание эффекторов патогена в основном опосредуется LRR доменом, в то время как NBS домен действует как молекулярный переключатель, инициируя HR (van Ooijen et al., 2007). В природе время жизни R гена зависит от скорости эволюции взаимодействующего с ним эффектора соответствующего патогена. Популяции патогенов с высоким эволюционным потенциалом с большей вероятностью преодолевают R гены.

1.5 Молекулярные методы определения генетического разнообразия *P*. *infestans*

Учитывая экономическую значимость фитофтороза, его возбудитель широко изучался. В последние годы широкое распространение получили молекулярные методы генотипирования штаммов *P. infestans*. В большинстве своем эти методы основаны на прямом или опосредованном анализе полиморфизма функциональных локусов (спектры пептидазы и глюкозо-6фосфатизомеразы, тип спаривания) или анонимных фрагментов генома (RAPD, AFLP, RFLP, SSR анализ) и на определении гаплотипов митохондриальной ДНК (Cooke and Lees, 2004; Martin et al., 2019). Недавно созданная международная система мониторинга и прогноза распространения наиболее опасных патотипов *P. infestans* основана на анализе изолятов по 12 SSR локусам (Li et al., 2013). Большинство перечисленных методов молекулярного генотипирования используют дискриминанты, маркирующие те локусы генома, которые содержат housekeeping genes, и непосредственно не связаны с вредоносностью патогена. Эта часть генома *P. infestans* является относительно стабильной. Напротив, определяющие вредоносность патогена Avr гены расположены в относительно мобильной части генома, свободной от housekeeping genes и богатой подвижными элементами (Fry, 2016).

Молекулярные маркеры позволяют исследователям отличать генотипы патогена между собой, что важно для изучения популяции патогена. Этими маркерами являются RAPD, RFLP (Goodwin et al., 1992), AFLP, гаплотипы митохондриальной ДНК (Danies et al., 2014; Griffith and Shaw, 1998; Martin et al., 2019), тип спаривания (Mazakova et al., 2006), SSR (Еланский, 2012; Kiiker et al., 2018; Li et al., 2013; Peterson, 2016), генотипирование путем секвенирования (genotyping by sequencing, GBS) (Elshire et al., 2011) или секвенирование отдельных генов (Dong et al., 2014; Goss et al., 2014). Общим для всех этих маркеров является то, что они нейтральны и поэтому не находятся под действием отбора.

1. RFLP (Restriction fragment length polymorphism, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов)

Для фингерпринтига P. infestans с помощью RLFP используют рестриктазу EcoR1 и зонд RG57 (Goodwin et al., 1992), в результате анализа наблюдаются 25-29 полиморфных зон. Такой метод оказался ценным инструментом для мониторинга генетического разнообразия P. infestans и использовался в течение долгого времени. Многие тысячи изолятов по всему миру были генотипированы с помощью RFLP и была создана международная база данных о результатах генотипирования (Forbes et al., 1998) с целью определения и мониторинга популяций *P. infestans*. На данный момент этот поскольку обладает метод примеряется все реже, существенными недостатками, такими как: трудоемкость и невозможность автоматизации необходимость в большом количестве процесса, ДНК, проблемы В интерпретации полученных данных и их воспроизводимости.

2. AFLP (Amplified fragment length polymorphism, полиморфизм длин амплифицированных фрагментов)

Метод широко применяется для изучения полиморфизма популяций и был использован для генетического картирования *P. infestans* (van der Lee et al., 2001; van der Lee et al., 2004). Он показал свою эффективность при

62

разделении отдельных изолятов. Однако данные маркеры наследуются по доминантному типу, что увеличивает количество маркеров, необходимых для оценки параметров популяции. К числу недостатков данного метода можно отнести необходимость в хорошо очищенной ДНК, что означает, что он не быть применен зараженному растительному может к материалу, трудоемкость и трудности в подборе условий проведения анализа. Достоинством метода является широких спектр получаемых фрагментов. Для P. infestans было показано, что с помощью AFLP можно различать изоляты, которые не имели полиморфизма по SSR маркерам (Guo et al., 2009).

3. Определение гаплотипа митохондриальной ДНК

После секвенирования митохондриального генома P. infestans (Paquin et al., 1997) был разработан быстрый и простой метод определения гаплотипов мтДНК (Griffith and Shaw, 1998) который стал одним из самых распространенных в популяционных исследованиях. Митохондриальные ДНК-маркеры позволяют отслеживать специфические линии и сравнивать полученные данные с другими ДНК маркерами. Хотя это мощный инструмент ДЛЯ филогеографического анализа многих организмов, разнообразие мтДНК P. infestans невелико. Метод позволяет определить 4 гаплотипа мтДНК 9 Ia, IIa, Ib, IIb). Для этого используют амплификацию со специфичными праймерами с последующей рестрикцией с помощью рестриктаз MspI и EcoR1.

В работе Martin et al., 2019 применен другой метод оценки генетического разнообразия при помощи митохондриальных маркеров, который позволяет различать отдельные клоны и субклоны *P. infestans*. Было отобрано пять локусов мтДНК для амплификации: rp15-rns, rns-cox2, cox1-nad9, nad3-nad5, nad6-nad4L, что увеличило количество гаплотипов мтДНК с четырех до 37 (17, 6, 8 и 4 для гаплотипов Ia, Ib, IIa и IIb соответственно, и 2 гаплотипа Herb-1).

4. Определение типа спаривания штаммов P. infestans

Определение типа спаривания является важным маркерным признаком infestans поскольку для *P*. характерен гетероталлизм, заменяющий Наличие популяции двуполость. разных типов спаривания В при благоприятных условиях может приводить к переходу к половому размножению и возникновению новых линий патогена. Тип спаривания может быть определен фитопатологически через сращивание с тестерными штаммами, для которых известен тип спаривания. Молекулярный метод определения с использованием CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence) маркера основан на амплификации фрагмента михондриальной ДНК с последующим гидролизом полученных фрагментов с помощью рестриктазы HaeIII (BsuRI) и разделении их в агарозном геле. Данный метод надежен и позволяет получить результаты намного быстрее и с меньшими затратами труда и средств, чем традиционный фитопатологический метод (Mazakova et al., 2006).

5. SSR анализ (Simple sequence repeat, короткие повторяющиеся последовательности, микросателлиты)

В настоящее время микросателлитные маркеры одни из наиболее эффективных используемых И классов ДНК-маркеров широко ДЛЯ классификации. генотипирования, паспортизации и Данные маркеры обладают наибольшей разрешающей способностью и широко применяются идентификации, полиморфизма ДЛЯ оценки внутривидового И генотипирования изолятов P. infestans. Разработан общепринятый протокол мультиплексного ПЦР анализа по 12 микросателлитным локусам (Li et al., 2013). SSR представляют собой короткие последовательности от 2 до 6 п.н., которые тандемно повторяются в геноме несколько раз. Фланкирующие последовательности микросателлитов, как правило, консервативны V представителей SSR высокополиморфными, одного вида. являются кодоминантными, мультилокусными маркерами (Kiiker et al., 2018). Метод SSR позволяет проводить анализ образцов с высокой воспроизводимостью, с

незначительным количеством геномной ДНК, а также использовать ДНК низкого качества. Последующее определение размеров повторов проводят с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Процесс анализа может быть частично автоматизирован за счет использования флуоресцентных меток, что позволяет анализировать продукты амплификации с помощью автоматических секвенаторов и проводить анализ результатов в мультиплексном режиме. К недостаткам данного метода можно отнести необходимость данных о нуклеотидных последовательностях фланкирующих регионов для подбора праймеров.

Эффекторные областях богатых гены находятся В генома, транспозонами и мобильными элементами (Haas et al., 2009; Raffaele and Kamoun, 2012), что предоставляет им уникальную возможность постоянно изменяться. Функциональная избыточность, кодируемая несколькими копиями эффекторных генов, ослабляется через избирательное давление отбора на одну или несколько копий, что, в свою очередь, будет способствовать закреплению мутаций без серьезного влияния на приспособленность патогена. Множественные мутационные механизмы, включая основания, инделы, псевдогенизация сайленсинг замену И характерны для генов вирулентности (Cooke et al., 2012; Raffaele and Kamoun, 2012). Взаимодействие этих мутационных событий приводит к более высокой генетической изменчивости в эффекторных генах, чем в остальном геноме патогена, и усиливает реакцию на отбор, вызванный изменением систем защиты хозяина. Следовательно, вирулентные варианты Avr генов могут быстро возникать из авирулентных вариантов в популяциях патогена, что приводит к исчезновению устойчивости у растений в течение нескольких лет после их коммерциализации (Cooke et al., 2012). Также определенную роль в эволюции эффекторов играют факторы окружающей среды.

P. infestans обладает диплоидным набором генов и, следовательно, линия P. infestans может содержать два аллельных варианта каждого из Значительное генов. увеличение числа аллельных вариантов можно объяснить трисомией, гетерозигоготностью, дупликацией генома И тандемной дупликацией, а также неаллельной гомологичной рекомбинацией (Dey et al., 2018; Haas et al., 2009; Fawke et al., 2015; Fouché et al., 2018; Knaus et al., 2019; van der Lee et al., 2004; Möller and Stukenbrock, 2017). K сожалению, на сегодняшний день локализация Avr генов в геноме и их копийность изучены совершенно недостаточно (van der Lee et al., 2004). Почти для каждого Avr гена выявлены «вирулентные» и «авирулентные» формы. В согласии с моделью «ген-на-ген» (Flor, 1971), авирулентный аллель

специфично распознается соответствующим *Rpi* геном, что вызывает неспецифичную защитную реакцию растения. Вирулентный аллель избегает такого распознавания, благодаря отличиям в строении эффектора, которые не влияют на его функцию. Однако функции многих *Avr* генов не укладываются в модель Флора.

Таким образом, при анализе литературных источников становится очевидным необходимость изучения полиморфизма генома P. infestans на молекулярном уровне и его связи с генотипом организма-хозяина. При этом необходимо изучать полиморфизм факторов вирулентности, так как с ними патогенность ущерб, наносимый картофелеводству. Ho связана И существующие методы не позволяют изучать полиморфизм именно этих участков генома, поэтому существует потребность в новой недорогой и высокопроизводительной технологии для типирования изолятов *P. infestans* на основе участков генома, отвечающих за патогенные свойства. Такая технология может стать востребованной в сельском хозяйстве для ранней диагностики патогенных свойств штаммов патогена, циркулирующих в популяции P. infestans, и предсказания их поражающей способности на сортах картофеля с различным профилем генов устойчивости, а также для описания и паспортизации коллекций штаммов P. infestans. В настоящей работе была предпринята попытка такого исследования, где мы изучали состав и полиморфизм генов вирулентности, вносящих основной вклад в патогенность, в штаммах *P. infestans*, колонизирующих устойчивые сорта и гибриды картофеля с известным набором генов устойчивости на территории европейской части Российской Федерации при помощи метода SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism).

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

В данном разделе использованы следующие принятые обозначения:

Изолят – генетически разнородная культура клеток, изолированная из какого-либо конкретного источника.

Монозооспоровая линия – линия, полученная из одной зооспоры.

Штамм – культура клеток, изолированная в определённое время и в определённом месте.

Раса – функциональная характеристика штамма, означающая, что он поражает растение картофеля с определенным генотипом. Это генотипирование осуществляется с помощью растений-дифференциаторов. Раса *P. infestans* с определенным номером поражает только те растениядифференциаторы Мастенброка-Блэка, в которых содержатся *R* гены *S. demissum* с таким же номером. Номер простой расы означает не присутствие соответствующего гена вирулентности, а отсутствие его авирулентной формы.

Материалом для исследования послужили следующие группы образцов:

1. 20 монозооспоровых линий *P. infestans*, контрастных по SSR профилю, выделенных BO 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) (Таблица 4). Собранные листья помещали между срезами клубней картофеля и в этом виде перевозили в ВНИИФ. Экспериментальное поле ВИР обладает высоким инфекционным фоном, поскольку на нем не производятся обработки. Высокий инфекционный потенциал и богатство *Rpi* генов делают генетическую коллекцию картофеля ВИР чрезвычайно привлекательным объектом для первого исследования *Avr* генов *P. infestans* на территории России. Здесь выращиваются как восприимчивые сорта (например, сорт Robijn) так и гибриды, содержащие различный набор *R* генов (например, гены *R1*, *R2*, *R3a*, *R3b*, *Rpi-Smira1*, *Rpi-vnt1*). Эти факторы могли привести к увеличению разнообразия эффекторов в популяции *P. infestans*.

Таблица 4. Линии *P. infestans* и названия гибридов и сортов картофеля, с которых они были собраны

Название	Пушкинские	Название гибрида или	Раменские
гибрида или	линии <i>P. infestans</i>	сорта растения	линии Р.
сорта растения		(ВНИИФ)	infestans
(ВИР)			-
160-17	43/1-1, 43/1-2,		
	43/1-3	2372-60	96
18/40-2000	18/1-1, 18/1-4	13/11-09	155
50/1 KBA	103-1, 103-2, 103-		
	3, 103-4, 103-5	14/8-09	156
Copт Robijn	87/2-2	15/13-09	157
118-6	109/1-2	16/27-09	158
27	107-1, 107-2	18/40-2000	163
14/8-09	117/2-1, 117/2-2	25-1-2007	165
4-1-2012	120-1	24-1	191
	11/2-1, 11/2-2,		
171-3	11/2-4	24-2	192
		134-6-2006	194
		134-2-2006	195
		135-1-2006	196
		Сорт Atzimba	198
		Copt Eesterling	
		(стандарт 3)	3
		Сорт Robijn (стандарт	
		5)	5
		Сорт Gloria (стандарт	
		6)	6

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 Мастенброка-Блэка. Линии *P. infestans* и названия гибридов и сортов картофеля представлены в Таблице 4.

3. Западноевропейские линии *P. infestans* из коллекций: 4_A1, 5_A1, 6_A1, 8_A1, 13_A2, EC-1 и американская линия US-8, которые 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 четырех районов Московской области (Люберецкий, Чеховский, Коломенский и Озерский районы) (Рисунок 11). В общей сложности было пять точек сбора. Каждый образец собран с индивидуального растения. Они находились друг от друга на расстоянии не менее 10 метров.



Рисунок 11. Карта-схема мест сбора образцов в Московской области. Точка 1 – п. Коренево, поле ВНИИКХ; Точка 2 – п. Коренево, частный сектор; Точка 3 – д. Масловка; Точка 4 – п. Поляны; Точка 5 – п. Лесное

2.2 Методы исследования

2.2.1 Выделение патогена в чистую культуру

Для выделения *P. infestans* кусочки зараженных листьев помещали между стерилизованными спиртом и пламенем горелки ломтиками клубней восприимчивого сорта картофеля *Bintje*, свободного от известных *R* генов устойчивости к фитофторозу. Полученные «сэндвичи» переносили в стерильные чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой под верхней крышкой и инкубировали 3-4 дня при 18-20°C в термостате; к этому времени мицелий прорастал сквозь ломтики. Небольшие кусочки мицелия переносили стерильной иглой на агаризованную овсяную среду. Чистые культуры сохраняли при 5°C и раз в месяц пересевали на ту же среду.

2.2.2 Выделение монозооспоровых линий P. infestans

В пробирку с 10-12 дневной культурой *P. infestans* наливали 8-10 мл стерильной дистиллированной воды и слегка встряхивали, чтобы отделить конидии от мицелия. Несколько капель суспензии, с учетом концентрации конидий, переносили из этой пробирки в следующую пробирку со стерильной дистиллированной водой. Полученную суспензию разбавляли до 1-2 конидии в поле зрения микроскопа (10x1.5x20) и помещали в холодильник на 1.5-2 часа при температуре 10-12°C для выхода зооспор. 4-5 капель суспензии зооспор равномерно распределяли по поверхности агаризованной ржаной среды, разлитой слоем 1-2 мм в чашки Петри из тонкого стекла, что облегчает наблюдение за прорастанием зооспор и их последующий перенос в новые стерильные пробирки. В термостате при температуре 22°C зооспоры прорастали на 3-4 день. В поле зрения микроскопа должна быть одна проросшая зооспора. Зооспоры осторожно вырезали иглой-лопаткой вместе с субстратом и переносили в пробирки на косой агар с овсяной питательной средой; пробирки возвращали в термостат. При температуре 22°С мицелий формировался на 8-12 день, однако не все выделенные зооспоры развивали мицелий.

2.2.3 Определение вирулентности линий P. infestans

Изучение вирулентности изолятов проводили в лабораторных условиях на отделенных долях листьев среднего яруса растений по общепринятой методике, используя набор растений-дифференциаторов из Международного Картофельного Центра (CIP, Lima, Peru), включающий 22 генотипа (*r*, *R1-R11* и различные сочетания этих генов/факторов вирулентности).

Выделение патогена в чистую культуру, получение монозооспоровых линий и определение их вирулентности проводились в отделе болезней картофеля и овощных культур ВНИИФ.

2.2.4 Выделение тотальной ДНК

Из мицелия тотальную ДНК *P. infestans* выделяли с помощью набора AxyPrep Multisource Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, США) согласно протоколу фирмы-производителя. Концентрацию ДНК определяли при 260 нм с помощью UV/Vis NanoPhotometer P300 (IMPLEN, Германия).

Из гербарных образцов тотальную ДНК выделяли при помощи набора pearentroв «SILICA plant» производства ООО компании «Биоком» по протоколу фирмы производителя. Для выделения тотальной ДНК брали фрагмент высушенного листа растения площадью примерно 1 см².

Качество выделения и чистоту нуклеиновых кислот определяли по отношению OD260/OD280. Оптимальное отношение должно равняться 1.8 – 2.0. Отношение меньшее 1.8 свидетельствует о том, что препарат недостаточно хорошо очищен от белков и других UV поглощающих компонентов. Отношение больше 2.0 свидетельствует о наличии хлороформа или фенола.
2.2.5 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), Avr9 (Avr-Smira1) и Avr-blb1 (ipiO) авторами были созданы праймеры (они обозначены *), обеспечивающие размер ампликона, оптимальный для SSCPанализа (Рисунок 12 и Таблица 5).



Рисунок 12. Схематическое изображение амплифицируемых участков *Avr* генов

Avr	П	оследовательность 5'-3'	Длина	T°C	Ссылка
ген			фрагм	отж.	
			ента		
			(п.н.)		
Avr1	Avr1F	CCGGATTCGACCACGACAAG	557	69	Du et
		G			al.,
	Avr1R	AAATGGTACCACAACATGTC			2015a
		CACCAAGC			
Avr2	AVR2F4	ATGCGTCTCGCCTACATTTT	340	61	Gilroy
	AVR2R4	TGTCACCCTTAATTTTCAAAT			et al.,
		GC			2011
Avr2-	avr2F6	AGGCTCTCGATCTTGTGCY	392	61	Gilroy
like	avr2R6	TAGCTCCTTTTGTTACCCTTA			et al.,
		CTTTGT			2011
Avr3a	Avr3aSF	GTTTAATGTGGCTGCGTTG	239	53	*
	Avr3aR	CTGAAAACTAATATCCAGTG			
		А			
Avr3b	Avr3bF	TACTCGACTTCAAAGGGGGA	378	60	Wang
	Avr3bR	TTAGAAATTGTTCTTTGCGG			et al.,
		TCA			2017
Avr4	Avr4SF	GGCACGCCACTGGAAAAAG	220	61	*
		TC			
	Avr4SR	GCGCAACCCACCTAAGGAGC			
Avr8	Avr8F2	ACAAGTATCCCTCTCGTTCC	661	66	*
		TTC			
	Avr8Sm2	TTACGATGTTTTCGCTTCTTT			
	R	AAAAAGC			
Avr9	AvrSm1F1	ATGCGTCTAAGCTCCACATT	717	65	*
		ТСТ			
	AvrSm1R	TTATCCGGAGGGGTTTAGC			
Avr-	IPIOF	CATCCAAGATTCGCTTTCTG	266	63	*
blb1		TCG			
(ipiO)	IPIO1R	GCTTATCGGCGTCTCTCCGG			
	IPIO4R	GGATGCTTGTTCTTGTAGCT	283		
		AGC			
Avr-	Avrblb2F	AATCCCCGACGWGTCTCG	307	65	*
blb2	Avrblb2R	GTCTACCCCTTTCTCGAAGT			
		С			
Avr-	Avr-vnt1-	GTAACGACCCCGACCAAGTT	393	66	Pel,
vnt1	SP-F	SP-F			2010
	Avr-vnt1-	TCAAGCTCTAATAGGATCAAG			
	R	С			

Таблица 5. Последовательности праймеров и условия ПЦР

Реакционная смесь для амплификации содержала 1 мкл 10Х ПЦРбуфера, 100-150 нг тотальной ДНК, 1 мкл 2.5 мкМ dNTP, по 10 пмоль каждого праймера, 1 ед. *Taq* ДНК-полимеразы (Thermo Fisher Scientific, США), для клонирования использовали высокоточную ДНК-полимеразу Phusion (Thermo Fisher Scientific, США), стерильная вода до 10 мкл. Амплификацию ДНК проводили в термоциклере MJ Research PTC-200 (Bio-Rad, США). Программа амплификации была следующей: 94°C, 3 мин; 35 циклов (94°C, 30c; T отжига °C, 30c; 72°C, 1 мин); финальный синтез 72°C, 5 мин.

2.2.6 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК

Для разделения продуктов амплификации использовали электрофорез в 1.5% агарозном геле с 1×ТАЕ (Tris-acetate-EDTA) или 0.5×ТВЕ в присутствии бромистого этидия: в гели объёмом 100 мл добавляли 5 мкл раствора бромистого этидия (10 мг/мл). Длину амплифицированных фрагментов ДНК определяли с помощью маркеров молекулярной массы GeneRuler 100 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США) и GeneRuler 100 п.н. Plus (Thermo Fisher Scientific, США).

Рабочие растворы:

1) 1×ТАЕ-буфер. К 20 мл 50×ТАЕ добавляли 980 мл дистиллированной воды.
Хранили при 4-6°С до 2 недель.

2) 0.5×ТВЕ буфер. К 10 мл 5×ТВЕ буфера добавляли 90 мл дистиллированной воды.

3) 1.5% агарозный гель. 1.5 г агарозы разводили в 100 мл 1×ТАЕ или 0.5×ТВЕ буфера, нагревали до полного и равномерного расплавления геля.

Спектры фрагментов ДНК регистрировали в ультрафиолете (длина волны 312 нм) с помощью цифровой системы Gel Logic 100 Imagyng System (Eastman Kodak, США).

2.2.7 SSCP-анализ генов вирулентности

Для оценки полиморфизма генов вирулентности использовали SSCP-SSCP-анализ представляет собой анализ. метод, используемый ЛЛЯ выявления изменений в нуклеотидной последовательности относительно коротких фрагментов ДНК. Он основан на способности одноцепочечных молекул ДНК образовывать уникальные вторичные структуры, конформации Мутации которых зависят от их нуклеотидной последовательности. нуклеотидной последовательности (полиморфизм) изменяют вторичную структуру молекулы, что приводит к изменению ее подвижности в неденатурирующем полиакриламидном геле (ПААГ). Такие изменения в полиморфизм электрофоретической подвижности указывают на последовательности ДНК. При помощи SSCP-анализа можно обнаружить одиночные нуклеотидные замены, и этот способ широко используется для решения различных задач, связанных с выявлением полиморфизма первичной структуры ДНК (Kong et al., 2004; Martin et al., 2009; Rodríguez et al., 2011). Для перевода ДНК в одноцепочечное состояние используют термическую и химическую денатурацию, после чего проводят разделение в ПААГ (Рисунок 13А).

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°С. 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 хі Cell (Bio-Rad, CША), размер геля 16 х 20 х 1 см. Электрофоретическое разделение проводили в 0.5Х ТВЕ буфере при температуре 4°С и напряжении 200 В в течение 4.5 часов. Детекцию результатов электрофореза проводили путем инкубации геля в 300 мл 1Х раствора красителя SYBR Green I (Sigma Life

Science, Германия) в 0.5Х ТВЕ буфере с последующей визуализацией в ультрафиолете (длина волны 312 нм).



Рисунок 13. А) Принцип SSCP-анализа; В) Электрофореграмма результатов SSCP-анализа. М – маркер молекулярной массы, 1 - Avr1, 2 - Avr2, 3 - Avr3a, 4 - Avr-blb1 (I), 5 - Avr-blb1 (I, II), 6 - Avr-vnt1, 7 - Avr3b

Результатом SSCP-анализа стали паттерны, которые представляют собой набор зон с различной электрофоретической подвижностью (Рисунок 13В).

Известно, что одноцепочечная ДНК может образовывать несколько стабильных вторичных структур, отличающихся ПО подвижности В зависимости от первичного строения, однако, не существует адекватной модели того, как именно те или иные нуклеотидные замены влияют на подвижность фрагментов ДНК в ПААГ (Sunnucks et al., 2000). Также возможно образование гетеродуплексов, когда две различные нуклеотидные последовательности имеют одинаковую подвижность в геле (Rodríguez et al., 2011). Принято считать, что *P. infestans* обладает диплоидным набором генов и, следовательно, возможны два аллельных варианта для каждого из генов. В соответствии с теорией метода, гетерозигота должна образовывать до четырех зон электрофоретической подвижности в ПААГ. Дополнительные зоны могут указывать на трисомию (Dey et al., 2018; van der Lee et al., 2004; van Poppel et al., 2008) или тандемную дупликацию *Avr* генов. Согласно недавнему исследованию (Knaus et al., 2019), на территории Европы и Северной Америки распространены в основном триплоидные формы *P. infestans*. Таким образом, для гетерозигот возможно образование шести зон электрофоретической подвижности.

Для определения нуклеотидных последовательностей полиморфных зон электрофоретической подвижности, обнаруженных по результатам SSCPвырезали из геля, элюировали ТЕ-буфером так ЭТИ ЗОНЫ анализа. называемым методом «crush and soak», который заключался в том, что вырезанные кусочки геля измельчали в пробирке для получения частиц размером менее 1 мм, заливали 30 мкл ТЕ-буфера и инкубировали 36 ч при комнатной температуре. По истечении этого времени, пробирки центрифугировали при 10000 g в течение 10 минут и затем отбирали который реамплификации супернатант, затем использовали для элюированных фрагментов для последующего клонирования. Для каждой такой зоны было получено не менее 10 клонов.

Общая схема эксперимента представлена на Рисунке 14.



Рисунок 14. Блок схема SSCP-анализа

Для SSCP-анализа были использованы следующие растворы:

Таблица 6. Реактивы для приготовления 30% раствора акриламида/бисакриламида (40:1).

Реактивы	Финальный объем 100 мл
Акриламид	30 г
Бисакриламид (N,N'-Метилен-бис-	0.75 г
акриламид)	

Полученный раствор пропустить через фильтр с диаметром пор 0.45. Хранить в холодильнике при 4 °C в бутылке, завернутой в алюминиевую фольгу.

Таблица 7. Реактивы для приготовления 8% ПААГ.

Реактивы		Финальный объем										
	10 мл	20 мл	50 мл	100 мл								
5X TBE	1 мл	2 мл	5 мл	10 мл								
30% AA	2.67 мл	5.34 мл	13.35 мл	26.7 мл								
(акриламид)												
Глицерин	0.25 мл	0.5 мл	1.25 мл	2.5 мл								
H ₂ O	5.95 мл	11.9 мл	29.75 мл	59.5 мл								
10%	120 мкл	240 мкл	600 мкл	1200 мкл								
персульфат												
аммония												
(APS)												
TEMED	12 мкл	24 мкл	60 мкл	120 мкл								

Для 8% PAAG используется только свежеприготовленный раствор персульфата аммония.

Таблица 8. Реактивы для приготовления денатурирующего буфера для SSCP.

Реактивы	Финальный об	бъем	
	200 мкл	400 мкл	500 мкл
95% Формамид	190 мкл	380 мкл	475 мкл
0.5М ЭДТА	8 мкл	16 мкл	20 мкл
Big Dye 6X	2 мкл	4 мкл	5 мкл

2.2.9 Клонирование и секвенирование амплифицированных фрагментов ДНК

Для фрагмента ЛНК накопления клонируемого проводили амплификацию целевой нуклеотидной последовательности из тотальной ДНК c использованием специфичных праймеров. Для прямого секвенирования очищали ДНК от реакционной смеси с помощью набора Cleanup Mini (Евроген, Россия) согласно инструкции фирмы производителя. Для клонирования амлифицированные фрагменты ДНК подвергали электрофоретическому Фрагменты, разделению В агарозном геле. полосой, представленные четкой единичной вырезали из геля под ультрафиолетом при длине волны 254 нм и элюировали из геля, используя набор QiaQuick Gel Purification Kit (Qiagen, США) в соответствии с инструкциями производителя. Очищенные фрагменты ДНК лигировали с помощью набора Quick-TA kit (Евроген, Россия). Компетентные клетки Е. coli штамма XL1-Blue (Евроген, Россия) трансформировали pAL-TA вектором (Евроген, Россия). Все операции проводили согласно протоколу фирмы-производителя. Трансформацию бактериальную В клетку осуществляли методом холодового шока. Культуру клеток, прошедшую трансформацию, по 100 мкм высевали на LB-агар, содержащий ампициллин. Отбор клонов осуществляли с помощью бело-голубой селекции на среде, содержащей IPTG (изопропил β-D-1-тиогалактопиранозид), X-Gal (бром-4хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид) в качестве индуктора и ампициллин. Далее чашки Петри инкубировались при +37°С в течение ночи и на следующий день осуществлялся отбор рекомбинантных клонов с помощью бело-голубой селекции Отобранные клоны подвергали скринингу посредством ПЦР со специфичными праймерами. После скрининга, отобранные колонии E. coli, содержащие вектор со вставкой целевого фрагмента, культивировали в жидкой LB-среде. Из полученной культуры клеток выделяли плазмидную ДНК с помощью набора AxyPrep Plasmid

Miniprep Kit (Axygen, CША) согласно протоколу фирмы-производителя. По десять клонов для каждого образца секвенировали на анализаторе ABI PRIZM 3130 xl (Applied Biosystems, CША).

2.2.10 Биоинформатический анализ

Подбор специфичных праймеров для проведения ПЦР проводили вручную выравниваний на основании анализа множественных С свойств последующей оптимизацией термодинамических каждого программы Oligo Analyzer 1.0.3 олигонуклеотида С помощью (http://www.labtools.us/oligo-analyzer/). Для филогенетического анализа использовали пакет программ MEGA X (https://www.megasoftware.net/) и SplitsTree4.14.8 (<u>http://www.splitstree.org/</u>). С помощью программ BioEdit v7.0.5 (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html) и DNASTAR Lasergene 7.1 (https://www.dnastar.com/software/lasergene/) оценивали первичные результаты секвенирования, такие как общий уровень сигнала по каждому из четырех нуклеотидов (высота пиков), уровень фонового сигнала, степень достоверности идентификации каждого нуклеотида в сиквенсе. С помощью программ GeneDoc2.7 (<u>https://genedoc.software.informer.com/2.7/</u>), сайта Blast nucleotide (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) и программы DNASTAR обрабатывали полученные данные, Lasergene 7.1 сравнивали ИХ С последовательностями из базы данных NCBI. Идентификация RXLR и s/dEER мотивов в последовательностях генов вирулентности P. infestans, полученных в результате данного исследования осуществляли с помощью онлайн-программы The meme suite (http://meme-suite.org/). С помощью программы DNASP 6 (<u>http://www.ub.edu/dnasp/</u>) оценивали полиморфизм нуклеотидной и аминокислотной последовательности, число гаплотипов и коэффициент их разнообразия, коэффициент нейтральности.

ГЛАВА З. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Для изучения репертуара генов вирулентности у штаммов *P. infestans*, колонизующих растения картофеля в этой коллекции, использовали две стратегии. В одном случае, Avr гены амплифицировали из геномной ДНК, отобранные секвенировали, произвольно клоны И полученные последовательности сопоставляли с уже известными Avr генами. В другом случае, ПЦР-продукты, полученные в результате амплификации Avr генов, подвергали SSCP-анализу, и уже отдельные электрофоретические зоны SSCP паттернов клонировали и секвенировали, превращая эти паттерны в хорошо воспроизводимые дескрипторы полиморфизма Avr генов. Необходимо подчеркнуть, что во втором случае с высокой вероятностью обнаруживаются минорные аллели, которые могут быть пропущены в первом случае.

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), Avr9 (Avr-Smiral) И Avr-blb1 (ipiO) авторами были созданы праймеры, ампликона, оптимальный SSCP-анализа. обеспечивающие размер ДЛЯ Условия SSCP-анализа генов вирулентности были подобраны в результате анализа литературных источников (Hansen et al., 2006; Hong et al., 2011; Kakavas et al., 2008; Kong et al., 2003; Martin et al., 2009; Menounos and Patrinos, 2010; Musić and Škorić, 2013; Nahiyan et al., 2011; Rodríguez et al., 2011; Rajatileka et al., 2014; Scoggan and Bulman, 2003; Shen et al., 2017; Sunnucks et al., 2000; Winterpach et al., 1995; Wong and Jeffries, 2006; Ye et al., 2010) и на основе данных, полученных эмпирически.

При SSCP-анализе полиморфизма по 11 генам вирулентности, гены *Avr4* и *Avr8* образуют 1 паттерн и, таким образом, являются мономорфными. Этот результат был подтвержден при помощи секвенирования некоторых случайно выбранных образцов. 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. Распределение паттернов в образцах представлено в Таблице 9.

Таблица 9. Распределение SSCP паттернов генов вирулентности в образцах *P. infestans*

Линии Р.			N⁰	паттерн	на по да	нным S	SSCP-a	анализ	a		
infestans											
	Avr1	Avr2	Avr2-	Avr3a	Avr3b	Avr8	Avr9	Avr-	Avr-	Avr-	Avr4
			like					blb1	blb2	vnt1	
Пушкинские линии P. infestans											
43/1-1	1	2	1	1	0	1	1	2	1	1	1
43/1-2	2	2	1	1	0	1	1	2	1	1	1
43/1-3	2	2	1	1	0	1	1	2	1	1	1
18/1-1	1	2	1	1	0	1	1	2	1	1	1
18/1-4	2	2	1	2	0	1	1	2	1	1	1
103-1	1	2	2	1	0	1	1	2	1	1	1
103-2	2	2	2	1	0	1	1	2	1	1	1
103-3	1	2	2	1	0	1	1	2	1	1	1
103-4	2	2	2	1	0	0	1	1	1	1	1
103-5	1	2	2	1	0	0	1	2	1	1	1
87/2-2	1	2	5	1	0	1	2	1	2	2	1
109/1-2	1	0	6	1	0	0	3	2	2	1	1
107-1	1	2	0	2	0	0	1	2	2	1	1
107-2	1	2	0	2	0	0	1	2	2	1	1
117/2-1	1	2	0	2	0	0	3	2	1	1	1
117/2-2	1	2	0	2	0	0	3	2	1	1	1
120-1	2	2	0	2	0	1	1	2	2	1	1
11/2-1	2	0	3	2	1	1	3	2	2	1	0
11/2-2	2	0	3	2	1	1	3	2	2	1	1
11/2-4	2	0	3	2	1	1	3	2	2	1	1
			Раме	енские л	инии Р	. infest	ans				
96	0	2	6	2	0	1	0	1	0	1	0
155	0	2	6	2	1	0	0	1	0	1	0
156	0	2	6	2	1	1	3	1	0	0	0
157	0	2	6	2	1	1	0	1	0	1	0
158	1	2	6	2	1	1	3	1	2	1	1

163	0	2	6	2	0	1	1	1	2	2	1
165	0	2	6	2	0	1	3	1	2	0	0
191	0	2	6	2	0	1	3	1	2	3	0
192	0	0	6	2	0	1	1	1	0	3	1
194	1	2	0	2	0	1	2	1	0	0	1
195	0	2	6	2	1	1	3	1	0	1	1
196	0	2	6	2	1	1	3	1	0	1	0
198	0	2	6	2	1	1	3	1	0	1	1
3	1	2	6	2	0	1	2	2	0	3	1
5	1	2	6	2	0	1	2	2	0	3	1
6	0	0	2	2	0	1	3	1	0	0	0
			Рефер	оенсные	линии	P. infe	stans				
161	2	2	1	2	0	1	3	2	2	1	1
4_A1 (C1)	2	2	0	2	2	1	1	1	2	1	1
8_A1 (C2)	2	2	1	3	0	1	1	2	2	1	1
5_A1 (C4)	2	0	1	3	0	1	1	3	2	1	1
US-8 (C6)	1	0	5	2	0	1	1	0	1	1	1
EC-1 (C7)	2	2	1	2	0	1	1	2	2	1	1
13_A2	0	0	0	3	0	0	0	1	1	1	0
(3928)											
6_A1	0	3	0	3	0	0	0	1	1	1	0
(4100)											

0 – ген в соответствующем образце не был амплифицирован.

Принято считать, что *P. infestans* обладает диплоидным набором генов и, следовательно, возможны два аллельных варианта для каждого из генов. В соответствии с теорией метода, гетерозигота должна образовывать до четырех зон электрофоретической подвижности в ПААГ. Дополнительные зоны могут указывать на трисомию (Dey et al., 2018; van der Lee et al., 2004; van Poppel et al., 2008) или тандемную дупликацию Avr генов. Согласно недавнему исследованию (Knaus et al., 2019), основанному на полногеномном секвенировании нескольких изолятов, на территории Европы и Северной Америки распространены в основном триплоидные формы *P. infestans*. Таким образом, для гетерозигот возможно образование шести 30H электрофоретической подвижности. На сегодняшний день мало известно о копийности генов вирулентности, аллельных локусах и их локализации в геноме *P. infestans* (van der Lee et al., 2001). Таким образом, авирулентные и вирулентные варианты генов могут находиться в разных локусах.

Зоны, образующие паттерны, были клонированы и секвенированы. Одинаковые по электрофоретической подвижности зоны, клонированные из разных паттернов одного гена (они обозначены одной цифрой), не различаются по нуклеотидной последовательности. Зоны, отличающиеся по электрофоретической подвижности, отличаются и по нуклеотидной последовательности (Рисунок 15).



Рисунок 15. SSCP паттерны *Avr* генов линиях *P. infestans*; 1-5 зоны электрофоретической подвижности, слева – маркер молекулярной массы, п.н.

Нуклеотидные последовательности зон в каждом паттерне отличались друг от друга не более чем на 9%. При этом, в большинстве случаев, мы не обнаружили горячих точек мутагенеза, замены происходили каждый раз в разных частях последовательности. Последовательности ДНК из отдельных зон в этих паттернах были сопоставлены с последовательностями Avr генов, доступных в базе данных NCBI. Те последовательности, которые отличались от ранее описанных генов-прототипов, были зарегистрированны (Таблица 10). Судя по опубликованным данным, большинство отклонированных нами последовательностей соответствуют вирулентным аллелям Avr генов, которые соответствующими генами устойчивости не распознаются картофеля, однако, для Avr-blb1 найдены преимущественно авирулентные варианты гена. Степень гомологии с генами-прототипами составляет 93-99%. Одной из причин является рекомбинация исследованных Avr генов. Интересной задачей является вычленение аллелей, отсутствующих у западноевропейских популяций *P. infestans*.

Таблица 10. Сравнение клонированных нами последовательностей с *Avr* генами-прототипами из базы данных NCBI, в скобках указан % гомологии

Ген и №	№ регистрац	ии в базе данных	Примечание
зоны в	NCBI		
SSCP	Полиморфные	Гены-прототипы из	
паттерне	зоны из SSCP	линии Т30-4	
	спектров		
avr1_1	MH450289	XM_002998511 (99)	Вирулентный
			гомолог, замена С83А
avr1_2	MH450290	XM_002998511 (99)	Вирулентный
			гомолог, замены
			C83A, A316G, A382G
avr1_3	MH450291	XM_002998511 (99)	Вирулентный
			гомолог, замены
			C83A, T309A, A338T
Avr2_1	KY354764	XM_002902939 (99)	$Avr2^{K}$,
			несинонимическая
			замена в положении

			A93T
Avr2_2	KY354765	XM_002902939 (99)	$Avr2^N$,
			синонимическая
			замена в положении
			A57T
Avr2-	KY354766	XM_002902939	Avr2-like ^{1V}
like_1		(93)**	MI
Avr2-	KY354767	XM_002902939	Avr2-like ^{mi}
like_2		(93)**	
AVr2-	KY 354/68	XM_002902939	Avr2-like
$like_5$	KV254760	(93) ⁴⁴	Aur? liko ^{MI}
Iiko A	KI 334709	(93)**	AVI2-like
Avr2-	MH396495	XM_002902939	$Avr2-like^{MI}$
like 5		(93)**	
Avr3a_1	KF154428	XM_002898795 (99)	Avr3a ^{KI}
avr3a_2	MH450287	XM_002898795 (99)	PEX147_2
avr3a_3	MH450288	GQ869422 (99)	Avr3a ^{EM}
Avr9_1	MH423619	XM_002904490 (97)	Авирулентный (II)
			класс
avr9_2	MH423620	XM_002904490 (99)	Вирулентный (I) класс
Avr-	MH220872	XM_002895005 (99)	Авирулентный (I)
blb1_1			класс
Avr-	MH220873	XM_002895005 (97)	Авирулентный (II)
blb1_2			класс
Avr-	MH423614,	XM_002897316 (98)	Соответствует
vnt1_1	MH423618		варианту V2,
			несинонимичная
	MI1/02/15	VM 002807216 (00)	
<i>avr-vm1_2</i>	IVITI423013	AM_002697510 (99)	COOTBETCTBYET
avr-vnt1 3	MH423616	XM_002897316(99-	Барианту VI Соответствует
	MH423617	100)	варианту V3
	1,111,22,017	100)	несинонимичная
			замена СЗ07А
Avr3b	MK287366-	XM_002997802	Замены в положениях:
	MK287369	(PITG_18215) (99)	G122T, G163A,
			G253C, C324T, T355C,
			G371A
avr-	MK776762-	GQ869450 (100),	Вирулентный вариант
blb2_1	MK776765	XM_002905755 (99-	
		100), XM_002895872	

		(08, 100)	
		(90-100),	
		XM_002895873 (99-	
		100), XM_002895876	
		(99).	
Avr-	MK776760,	GQ869454 (100),	Авирулентный
<i>blb2_2</i> ,	MK776761,	GQ869458 (99),	вариант
Avr-	MK776766	GQ869450 (98),	
blb2_3		XM_002905755 (99),	
		XM_002905749 (98).	
Avr4	Не	XM_002904373 (100)	
	зарегистрирован		
Avr8	Не	XM_002904498 (100)	
	зарегистрирован		

**Avr* и *avr* – принятое в литературе условное обозначение авирулентных и вирулентных аллелей гена; ** ген *Avr2-like* отсутствует в геноме T30-4, в качестве прототипа указан ген *Avr2*

Метод SSCP позволяет оперативно определять различные аллельные варианты Avr генов, таким образом, в отличие от SSR и митохондриальных маркеров, полученные с помощью SSCP-анализа генов вирулентности результаты могут не только служить в качестве популяционных маркеров, но и непосредственно коррелируют с вирулентностью патогена. Полученные с SSCP-анализа также отражали территориальную помощью данные принадлежность изученных нами линий, в то время как по результатам генотипирования по 12 SSR локусам многие линии имели индивидуальный профиль (Sokolova et al., 2017). Митохондриальные маркеры, применяемые panee (Griffith and Shaw, 1998), давали лишь небольшое число вариантов и не отражали всю сложность митохондриального генома, в тоже время метод, предложенный в работе Martin et al., 2019, напротив, оказался излишне трудоемким и требующим клонирования восьми маркеров, размером от 400 до 3200 п.н., что значительно затрудняет такой анализ.

3.1.1 Распределение SSCP паттернов в выборках P. infestans

Распределение SSCP паттернов в линиях *P. infestans* заметно различается (Рисунок 16).



Рисунок 16. 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

В частности, два паттерна гена Avr1 были обнаружены в пушкинских линиях в примерно одинаковых соотношениях, в то время как в раменских линиях был обнаружен только паттерн 1, а в референсных линиях преобладает паттерн 2. Во всех пушкинских и раменских линиях ген Avr2представлен только паттерном 2, в то время как в референсных линиях встречаются паттерны 2 и 3. Паттерн 1 гена Avr2 был обнаружен нами ранее в изолятах из Московской области (Chizhik and Martynov, 2017). Паттерны 1 и 2 гена Avr3a встречаются в примерно одинаковых соотношениях в пушкинских линиях, у референсных линий, напротив, паттерны 2 и 3 имеют примерно одинаковые соотношения. Раменские линии представлены

89

исключительно паттерном 2. Все три паттерна гена Avr9 обнаружены в пушкинских и раменских линиях, однако, их соотношение различается. В референсных линиях паттерн 2 отсутствует. В референсных линиях присутствовал только паттерн 1 гена Avr-vnt1, в то время как в раменских линиях были обнаружены и все остальные SSCP паттерны. В пушкинских линиях нам удалось также обнаружить паттерн 2 гена Avr-vnt1, а паттерн 3 оказался уникальным для раменских линий. Отдельные гены присутствуют во всех пушкинских, раменских и референсных линиях. Такие гены как Avr3a, Avr-blb1 Avr-blb2 и Avr-vnt1 присутствуют в большинстве образцов. Таким образом, эти три выборки значительно различаются как по составу паттернов, отражающих различные аллельные варианты генов вирулентности, так и по их распределению, что может быть связано с тем, что пушкинские и раменские линии представляют собой популяции, а референсные линии таковыми не являются. Кроме того, распределение паттернов может быть связано с тем, что на этих территориях выращивают разные сорта картофеля, которые отличаются по составу генов устойчивости. Также роль играет различие в климатических условиях и географическая изолированности удаленность, приводящая к частичной восточноевропейских популяций.

Согласно литературным данным, некоторые популяции *P. infestans* представляют собой клональные линии, разнообразие в которых невелико, это было показано для территории Северных Анд (Cárdenas et al., 2011), где популяции были проанализированы по нескольким молекулярным маркерам, нейтральным к отбору (ITS, Ras и β -тубулин). Также был изучен полиморфизм гена *Avr3a*. В основном он был представлен одним доминирующим гаплотипом. Схожие результаты были получены при изучении полиморфизма *Avr3a* на территории различных регионов Китая (Han et al., 2016; Yang et al., 2018), где было обнаружено три доминирующих гаплотипа, все относящиеся к вирулентному аллелю данного гена. В нашем

исследовании этого гена также преобладает вирулентный вариант, представленный паттернами 1 и 2, отличия в электрофоретической подвижности образующих эти паттерны зон обусловлены наличием нескольких синонимических замен.

Согласно SSR анализу по 12 локусам, большинство европейских популяций *P. infestans* представляют собой доминирующие клональные линии (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 монозооспоровые линии, выделенные из одного изолята, которые в основном не различаются между собой как по составу *Avr* генов, так и по SSR локусам. Небольшие различия можно объяснить наличием сомаклональной изменчивости. 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.

Условия ПЦР и SSCP-анализа для некоторых из генов вирулентности, в частности, для генов *Avr2* и *Avr2-like*, были оптимизированы в ходе исследования на материале, собранном летом 2015 года на территории пяти районов Московской области.

3.2 Исследование полиморфизма гена вирулентности Avr2 в популяциях Московской области

Был проанализирован полиморфизм первичной структуры гена Avr2, существующего в популяции P. infestans в Московской области. Ранее было показано, что в геноме P. infestans присутствуют два гомолога этого гена, получивших название Avr2 и Avr2-like, соответственно. Avr2 кодирует белок, распознаваемый продуктом соответствующего гена R2 устойчивости

картофеля, а *Avr2-like* кодирует белок, который не распознается этим Rбелком (Gilroy et al., 2011). Вирулентная форма отличается от авирулентной 13 аминокислотными заменами, из которых восемь находятся в С-концевом эффекторном домене, который распознается R-белком. Однако полиморфизм данного гена изучен недостаточно и был описан только для группы изолятов из зарубежных коллекций. Кроме того, в генетических базах данных отсутствуют нуклеотидные последовательности полиморфных вариантов. Между тем, полиморфизм гена вирулентности *Avr2* в популяциях *P. infestans* может иметь характер, отличный от описанного, поскольку *P. infestans* характеризуется высокой степенью разнообразия даже при бесполом размножении (Kamoun et al., 2003).

В результате ПЦР препаратов тотальной ДНК, выделенных из 38 образцов, с праймерами, специфичными по отношению к гомологам Avr2 и Avr2-like, оба гомолога гена Avr2 были обнаружены в 23 образцах, только Avr2 обнаружен в 14 образцах, и только Avr2-like был обнаружен в 1 образце. SSCP-анализ полученных фрагментов ДНК показал, что в исследуемой популяции полиморфизм гомолога Avr2 приводит к трем вариантами генотипа, а полиморфизм гомолога Avr2-like – к двум вариантами генотипа (Рисунок 17).



Рисунок 17. Варианты полиморфизма гена *Avr2*, выявляемые при помощи SSCP-анализа. Показаны аллельные варианты гомолога *Avr2* (а) и

92

гомолога Avr2-like (б), различающиеся своей электрофоретической подвижностью

Клонирование и секвенирование полиморфных зон Avr2 и Avr2-like, характеризующих эти варианты генотипов, показало, что они действительно принадлежат к ранее описанным гомологам гена Avr2. Таким образом, эти полиморфные зоны И соответствующие нуклеотидные ИМ последовательности были обозначены Avr2*1, Avr2*2, Avr2-like*1, Avr2*like*2*, *Avr2-like*3* и *Avr2-like*4*. Эти нуклеотидные последовательности были зарегистрированы в базе данных GeneBank NCBI под номерами КY354764, КҮ354765, КҮ354766, КҮ354767, КҮ354768 и КҮ354769, соответственно. Различия между последовательностями Avr2 и последовательностями Avr2like составили 21 нуклеотид. Avr2*1 и Avr2*2 различаются между собой однонуклеотидными Т/А заменами в положениях 57 и 93. ДВУМЯ Гипотетическая трансляция показала, что полиморфизм в положении 93 приводит к различию в аминокислотной последовательности между этими двумя аллельными вариантами. Так полипептид, кодируемый Avr2*1, имеет лизин в положении 31 (K31), а полипептид, кодируемый Avr2*2, имеет в этом же положении аспарагин (N31). Аллели Avr2-like (Avr2-like*1-Avr2-like*4) собой сайтам отличаются между по шести однонуклеотидного полиморфизма в положениях 51, 71, 162, 246, 290 и 316 (Таблица 11).

Таблица 11. Варианты аллельного полиморфизма Avr2-like и нуклеотиды, которыми они различаются

Аллель	Порядковые номера нуклеотидов									
Avr2-like	51	71	162	246	290	316				
Avr2-like*1	C	Т	C	Т	A	A				
Avr2-like*2	C	Т	Т	Т	G	А				
Avr2-like*3	C	C	C	Т	G	G				
Avr2-like*4	Т	Т	С	С	G	А				

Однако, согласно гипотетической трансляции, аллели Avr2-like*1, Avr2like*2 и Avr2-like*4 по производной аминокислотной последовательности аминокислотной идентичными И отличаются являются OT последовательности, кодируемой аллелем Avr2-like*3, аминокислотами в положениях 10 и 92. В случае аллеля Avr2-like*3 эти аминокислоты представляют собой треонин (T10) и валин (V92), а в случае аллелей Avr2like*1, Avr2-like*2 и Avr2-like*4 – метионин (М10) и изолейцин (I92). Таким образом, в соответствии с данными о нуклеотидных и аминокислотных последовательностях, выявленные при помощи SSCP-анализа три варианта генотипа Avr2 были обозначены как гомозиготы К и N и гетерозигота K/N, а два варианта генотипа Avr2-like были обозначены как гомозигота МІ и гетерозигота MI/TV. Распределение этих вариантов среди образцов исследованной популяции приведено в Таблице 12.

Таблица 12. Варианты генотипов Avr2 и Avr2-like и их встречаемость в образцах исследуемой популяции

	Avr2		Avr2-like			
Вариант	Κ	Ν	K/N	MI	MI/TV	
генотипа						
Кол-во	4	1	32	21	3	
образцов						
%	10,8	2,7	86,5	87,5	12,5	
образцов						

Суммируя данные о наличии/отсутствии и полиморфизме каждого из гомологов гена *Avr2* в проанализированных образцах, нами было выделено в общей сложности 7 генотипов, характеризующих полиморфизм этого гена, которые обладали неодинаковой встречаемостью в исследуемой популяции (Таблица 13).

Таблица 13. Генотипы, выявленные в исследуемой популяции в зависимости от полиморфизма гена *Avr2*, и их встречаемость в изученных образцах

	Ген	ЮТИ	Ген	ОТИ	Ген	ОТИ	Ген	ютип	Ген	ОТИ	Ген	ОТИ	Ген	оти	
	п 1		П	2	П	3		4	П	5	П	6	П	п7	
	Avr2	Avr2-	Avr2	Avr2-	Avr2	Avr2-	Avr2	Avr2- like	Avr2	Avr2-	Avr2	Avr2-	Avr2	Avr2-	
	K	н.д	Ν	н.д	K /	н.д	K /	MI/T	K /	MI	K	MI	н.д	MI	
		•		•	Ν	•	Ν	V	Ν				•		
Кол-	4	2	1		1	1	3		1	8	2	2]	[
во															
образц															
ОВ															
%	5	,2	2	,6	2	9		8	47	',4	5	,2	2,	,6	
образц															
ОВ															

Так наиболее часто встречающимся оказался Генотип 5 (47,4%), вторым по распространенности оказался Генотип 3 (29%). Остальные пять генотипов можно отнести к редко встречающимся (от 2,6 до 8%). Также было проанализировано распределение этих генотипов в каждой из точек сбора. Результаты этого анализа приведены на Рисунке 18.

Все образцы из Точки 1 (п. Коренево, поле ВНИИКХ) имели одинаковый генотип – Генотип 5. Образцы из Точек 2 и 3 (п. Коренево, частный сектор, д. Масловка) были представлены четырьмя генотипами – Генотипы 2, 5, 6 и 7 в случае Точки 2, и Генотипы 1, 3, 4 и 5 в случае Точки 3. Образцы из Точки 4 (п. Поляны) были представлены двумя генотипами – Генотипы 3 и 5, а образцы из Точки 5 (п. Лесное) были представлены тремя генотипами – Генотипы 1, 3 и 4. Кроме того, в образцах, собранных в точках, находящихся в поселке Коренево (Точки 1 и 2), отсутствовали Генотипы 1, 3



и 4, в то время как в образцах, собранных в Точках 3, 4 и 5, отсутствовали Генотипы 2, 6 и 7.

Рисунок 18. Доля образцов (%) с выявленными генотипами в каждой из точек сбора

В результате оба гомолога этого гена были обнаружены в большинстве образцов (23 образца, 60%), только Avr2 присутствовал в 14 образцах (37%), и только Avr2-like был обнаружен в 1 образце (3%). Таким образом, оба гомолога были обнаружены не во всех образцах. Это может быть связано с характерной для *P. infestans* и *P. sojae* многокопийностью структурных и функциональных гомологов, находящихся в локусе вирулентности, и полной элиминацией распознаваемых форм белка у некоторых вирулентных изолятов (Armstrong et al., 2005; Jiang et al., 2006; Qutob et al., 2009; Dong et al., 2009). В работе Gilroy et al., 2011 оба гомолога гена *Avr2* также были обнаружены не у всех проанализированных изолятов, однако, соотношение между количеством образцов, имеющих оба гомолога, и количеством образцов, имеющих какой-либо один из них, было другим. Так, из 29 проанализированных изолятов оба гомолога гена *Avr2* имели 12 изолятов (41%), только Avr2 имели 8 изолятов (28%), и только Avr2-like имели 9 изолятов (31%). Наблюдаемые различия можно объяснить тем, что в цитируемой выше работе исследовалась коллекция изолятов, различных по своему происхождению и не представляющих собой популяцию, а в настоящей работе проводилось исследование образцов, представляющих популяцию *P. infestans* в Московской области. Очевидное смещение в сторону преобладания образцов, имеющих Avr2 (в общей сложности 97%), в этой популяции может свидетельствовать об отсутствии соответствующего гена устойчивости R2 у сортов, возделываемых в агроценозах Московской области, но также и о регуляции вирулентности/авирулентности *P. infestans* на уровне экспрессии соответствующего гена, о чем также имеются данные в литературе (Gilroy et al., 2011).

Применение SSCP-анализа позволило дополнительно охарактеризовать полиморфизм первичной структуры вышеуказанных гомологов гена Avr2 и его распределение среди исследуемых образцов, a секвенирование полиморфных зон электрофоретической подвижности позволило выявить особенности нуклеотидной последовательности, обуславливающие этот полиморфизм. Так, было установлено, что среди проанализированных образцов гомолог Avr2 представлен двумя аллельными вариантами – Avr2*1 и Avr2*2, которые отличаются друг от друга двумя однонуклеотидными заменами, одна из которых приводит к возникновению полиморфизма аминокислотной последовательности в положении 31 (K31N). Этот полиморфизм ранее уже был обнаружен, однако распределение данного полиморфизма среди образцов исследуемой популяции отличается от ранее описанного. Так, из 50 проанализированных ранее изолятов, 23 были гомозиготами К (46%), а 27 являлись гетерозиготами К/N (54%), в то время как среди образцов P. infestans популяции Московской области подавляющее большинство было представлено гетерозиготами K/N (32 образца, 86,5%) и только 4 образца (10,8%) являлись гомозиготами К. Кроме того, был

обнаружен один образец, представляющий собой гомозиготу N, в то время как такой вариант ранее не был обнаружен, на что прямо указывается в цитируемой работе (Gilroy et al., 2011). Тем не менее, наблюдаемое преобладание аллеля Avr2*1, имеет сходство с преобладанием аллеля Avr3a^{EM}, описанным для другого гена вирулентности P. infestans Avr3a (Armstrong et al., 2005), хотя, в отличие от аллеля $Avr3a^{EM}$, продукт которого не распознается белком R3, продукты обоих аллелей Avr2*1 и Avr2*2 в равной степени распознаются белком R2, так как за распознавание белка Avr2 отвечает его С-концевой эффекторный домен, и поэтому полиморфизм К/N не связан с избеганием этого распознавания. В случае гомолога Avr2-like при помощи SSCP-анализа было выявлено четыре аллельных варианта (Avr2like*1- Avr2-like*4), которые на уровне нуклеотидной последовательности собой по сайтам однонуклеотидного различались между шести полиморфизма. Однако только две из этих замен были несинонимичными, что на уровне аминокислотной последовательности приводило к возникновению двух полиморфизмов M10T и I92V. Эти различия, повидимому, не являются функциональными (не влияют на распознавание белком R2), так как замена M10T находится в сигнальном пептиде, который отщепляется от зрелого белка, а валин в положении 92 также присутствует и у авирулентной формы белка. Среди исследованных образцов преобладали гомозиготы MI (87,5%), а гетерозиготами MI/TV были только три образца (12,5%). Гомозиготы TV среди исследованных образцов обнаружены не были. Как и в случае гомолога Avr2, такое распределение отличалось от ранее описанного, где гомозиготы МІ составляли 54% (7 образцов), гетерозиготы MI/TV – 38% (5 образцов), и гомозиготы TV – 8% (1 образец).

С учетом полученных данных о полиморфизме каждого из двух гомологов гена *Avr2* в популяции *P. infestans* в Московской области нами было выявлено в общей сложности семь генотипов, отражающих суммарный полиморфизм этого гена. Эти генотипы имели неодинаковую

распространенность в исследованной популяции. Кроме того, ни в одной из точек сбора не было обнаружено все семь генотипов, и генотипы были представлены в точках сбора в разных комбинациях и в различных процентных соотношениях. Такое разнообразие генотипов и картина их объясняться распределения могут тем. что основным источником генетического разнообразия популяций P. infestans служит распространение инфекции с клубнями. В Московской области возделывается картофель, привезенный из разных регионов России и Западной Европы. Таким образом, подмосковные популяции возбудителя фитофтороза представлены множеством клонов и отличаются очень высоким разнообразием (Еланский и др., 2017). Кроме того, в этих популяции встречаются оба типа спаривания, и поэтому разнообразие может быть обусловлено также рекомбинацией при половом процессе.

Таким образом, в ходе выполнения данной работы впервые было проведено популяционно-генетическое изучение гена Avr2 P. infestans на молекулярном уровне и было показано, что для популяции P. infestans в Московской области характерна высокая степень полиморфизма первичной структуры этого гена. Кроме того, были выявлены территориальные особенности распределения этого полиморфизма.

3.3 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, Avr9, 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.

99

3.3.1 Полиморфизм гена Avr1 P. infestans

В результате SSCP-анализа гена *Avr1* было получено 2 паттерна, 3 зоны. Все полученные нами в ходе данного исследования последовательности гена *Avr1* относились к вирулентному варианту и отличались друг от друга SNPs в положениях 309, 316, 338 и 382, что приводит к образованию трех зон электрофоретической подвижности (Рисунок 19). Также было обнаружено 2 горячие точки мутагенеза: C195T и T225A, обе замены синонимичны.



Рисунок 19. а) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr1*; b) Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr1* с указанием SNP по которым отличаются три зоны, формирующие паттерны этого гена

Ген Avrl был обнаружен во всех пушкинских линиях, у 80% референсных линий и присутствовал только у 25% раменских линий Р. infestans. Полученные нами последовательности занимают промежуточное положение между известными вирулентными и авирулентными аллелями: у гена Avr1 в пушкинских линиях найдена несинонимическая замена A5D, которая характерна для авирулентного аллеля этого гена, однако при этом в пушкинских последовательностях линий присутствует стоп-кодон, al., Данный вирулентный (Du et 2018). ген. отличающий аллель предположительно являющийся вирулентным на растениях *R1*, обнаружен во всех проанализированных пушкинских линиях. Отсутствие авирулентной формы гена в образцах может быть связано с тем, что соответствующий ген устойчивости *R1* был интрогрессирован одним из первых и широко распространен в сортах картофеля (Ballvora et al., 2002). Ни одна из форм гена не была обнаружена в высокоагрессивных линиях 13_A2 и 6_A1.

В зарубежных работах был проанализирован полиморфизм пяти линий, содержащих в своем геноме ген Avrl и его вирулентный гомолог, обозначаемый как A-L (Du et al., 2018). Обнаруженный в ходе нашего исследования полиморфизм гена Avrl не совпадает с тем, который был показан в работе Du et al., 2018. Нам не удалось амплифицировать авирулентный вариант этого гена. Также проанализированные линии оказались мономорфными по тем локусам гена A-L, которые указаны в исследовании Du et al., 2018 как полиморфные. С другой стороны, было обнаружено несинонимичных несколько замен R других частях последовательности, которые отличают ИХ OT полученных ранее вирулентных вариантов этого гена. Таким образом, нами были обнаружены новые аллельные варианты гена А-L. Всего было обнаружено 8 таких замен (Рисунок 20).



Рисунок 20. Выравнивание аминокислотных последовательностей Avr1 и A-L. Сигнальный пептид, RXLR область, консервативные С-концевые мотивы (W1, W2 и Y) и T-область обозначены прямоугольниками. Полиморфные а.о. обозначены серым цветом

Полиморфизм, представленный в работе Du et al., 2018 также не является популяционным, поскольку ими были проанализированы отдельные образцы, собранные в разное время на разных территориях ЕС. Исследования по распространению и представленности этого гена в популяциях до сих пор не было проведено. Полученный нами полиморфизм аминокислотных последовательностей А-L в пушкинских линиях, представляющих собой популяцию, показал, что соотношение несинонимичных и синонимичных замен составляет 1.05, что может указывать на отсутствие давления отбора, функционально следовательно, белок менее значим или мутации, изменяющие его структуру в основном нейтральны и не приводят к изменению функции. Этот факт может указывать на то, что для A-L осуществляется стратегия, схожая с Avr4, где вирулентный вариант также представлен укороченным белком, при этом укороченный белок не оказывает влияние на подавление иммунитета, поскольку не является функциональным, однако, в тоже время, в отличие от авирулентной формы, не распознается соответствующим геном устойчивости картофеля. При этом результаты проведенных нами тестов на нейтральность показали отрицательное значение в тесте Таджимы и Фу, которые свидетельствует о высоком числе редких замен по сравнению с ожидаемым в рамках нейтральной модели эволюции, что связано либо с увеличением размера популяции, либо с действием очищающего или стабилизирующего отбора (Таблица 14).

Таблица 14. Результаты тестов на нейтральность для гена Avr1.

Название модели	Tajima's D	Fu and Li's D	Fu and Li's F
Значение	-1,63*	-2.60**	-2.85**
* D <0.05 ** D < 0.02			

* P <0.05, ** P < 0.02

Отсутствие гена Avr1 во всех проанализированных линиях может быть связано с тем, что ген R1 был первым интрогрессирован из S. demissum в S. tuberosum и часто встречается в различных сортах картофеля. Соответственно, это может приводить к снижению частоты встречаемости

авирулентного варианта гена Avr1 в популяции патогена. В полевой коллекции ВИР около 25% растений по данным молекулярных исследований несут ген R1, а 44% растений содержат в материал *S. demissum* (Fadina et al., 2017). По-видимому, отсутствие Avr1 не влияет на жизнеспособность и вирулентность патогена, а его потеря может быть нейтрализована другими эффекторами.

3.3.2 Полиморфизм гена Avr2 P. infestans

При SSCP-анализе гена Avr2 было получено три паттерна, при этом, паттерн 3 образован в результате объединения паттерна 1 и 2 и представляет собой гетерозиготный вариант. Зона 2 из паттерна 1 и 3 по аминокислотной последовательности соответствует ранее известному аллельному варианту $Avr2^{N}$; зона 1 из паттерна 2 и 3 соответствует $Avr2^{K}$ (Рисунок 21А) (Rietman et al., 2012; Chizhik and Martynov, 2017).



Рисунок 21. SSCP паттерны двух форм гена А) *Avr2*; В) *Avr2-like*; и соответствующие им аминокислотные замены

Паттерн 2 гена Avr2, соответствующий аллелю Avr2^K, преобладал у пушкинских и раменских линий (80 и 87.5%), его доля сокращалась до 62.5% у референсных линий. Ранее было показано, что данный полиморфизм не связан с функцией и оба варианта распознаются соответствующим геном устойчивости R2 (Saunders et al., 2012). В связи с этим, можно было бы

ожидать, что растения с генотипом *R2* окажутся устойчивыми к большинству этих линий. Однако в ходе недавних исследований было показано, что экспрессия *Avr2* строго регулируется, в вирулентных изолятах она отсутствует при наличии интактного гена (Stefańczyk et al., 2017).

Вирулентный гомолог этого гена, обозначаемый как Avr2-like, оказался наиболее полиморфным геном по результатам SSCP-анализа (Рисунок 21В). Все зоны в паттернах по аминокислотной последовательности соответствует двум аллелям: Avr2-like^{TV} и Avr2-like^{MI}. Последовательность из зоны 1 отличается от последовательностей из остальных зон и соответствует варианту TV, а зоны 2-5, отличающиеся друг от друга SNPs в положениях: 51, 71, 162, 246, 290 и 316, имеют близкие значения электрофоретической подвижности и соответствуют варианту МІ. Хотя полиморфизм Avr2-like тоже не связан с функцией, наша выборка представлена в основном гомозиготами MI и гетерозиготами TV/MI. Ген обнаружен у 75% пушкинских и референсных линий, а также во всех раменских линиях, за исключением линии 194. Поскольку данный гомолог отсутствует в линии Р. infestans T30-4, то в качестве гена-прототипа указан ген Avr2. Таким образом, помощью метода электрофоретической выявляемые С ЭТОГО зоны подвижности являются надежными маркерами полиморфизма гена Avr2.

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.

3.3.3 Полиморфизм генов Avr3a и Avr3b P. infestans

Ген Avr3a является наиболее распространённым геном вирулентности *P. infestans* и поэтому широко используется в исследованиях в качестве положительного контроля (Armstrong et al., 2005; Cárdenas et al., 2011; Engelhardt et al., 2012). Каждая из проанализированных нами линий содержала, по крайней мере, один из аллельных вариантов этого гена. Во всех трех SSCP паттернах гена Avr3a присутствуют зоны 2 и 3, являющиеся гетеродуплексами аллеля $Avr3a^{EM}$ и вирулентного паралога PEX147-2. Зона 4 паттерна 1 также является гетеродуплексом. Зона 1 в паттерне 3 соответствует варианту $Avr3a^{KI}$ и, таким образом, паттерны 1 и 2 характеризуют гомозиготу $Avr3a^{EM}$, а паттерн 3 представляет собой гетерозиготный вариант (Рисунок 22а и b).

Во всех пушкинских и раменских линиях *P. infestans* обнаружены только вирулентные варианты гена Avr3a, а в референсных линиях присутствуют гетерозиготы $Avr3a^{KVEM}$. Гомолог РЕХ147-2 также был обнаружен во всех проанализированных вариантах, однако он не представляет особого интереса поскольку ранее было показано, что этот гомолог хоть и является вирулентным *in vitro*, за счет «вложенной» аминокислоты он неустойчив *in planta* (Seman, 2013).

В результате масштабного исследования гена Avr3a в популяциях P. infestans, собранных в шести областях Китая, был обнаружен 51 аллельный вариант (гаплотип) этого гена (Yang et al., 2018). Однако, более 90% изученных образцов соответствовали трем гаплотипам (они зарегистрированы в NCBI под №№: МН043150, МН043151 и МН043157, соответствует гомологу PEX147-2), последний остальные варианты оказались минорными. Все гаплотипы относятся к вирулентному варианту. Схожие данные были опубликованы ранее (Han et al., 2016) и они вполне согласуются с полученными нами (Рисунок 22с). Гомология между исследования полученными В ходе ЭТОГО последовательностями И последовательностями, опубликованными Yang et al., 2018, находится в Наибольшая 96.5-100%. гомология наблюдается диапазоне между последовательностями гена Avr3a, полученными из изолятов в 2010-2012 гг. в Китае и последовательностями, полученных ранее из изолятов коллекции ВНИИФ, которые были собраны в 1970-2010 гг. (Соколова и др., 2016; Pankin et al., 2012).



Рисунок 22. а) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr3a*; b) Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr3a* с указанием SNP по которым они отличаются; c) Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *Avr3a*, полученных при выполнении данного исследования, и его гомологов из базы данных NCBI. Построен методом максимального правдоподобия (maximum likelihood, модель Tamura-Nei), для каждой ветви указаны индексы бутстреп-поддержки

В популяциях Ленинградской и Московской области 2015 и 2018 г. отсутствуют наиболее распространенные гаплотипы, характерные для Китая. В базе данных NCBI также есть последовательности, полученные из изолятов *P. infestans*, собранных в Египте (MG976602-MG976604), которые имеют 100% гомологию с последовательностями, полученными в ходе нашего исследования. Возможно, это связано с завозом пораженного фитофторозом посадочного материала из Европы на территорию Египта.

Нами было обнаружено 8 гаплотипов этого гена, включая гомолог PEX147-2. Большинство последовательностей представляют собой вирулентный аллель $Avr3a^{EM}$, которые отличаются по одному или нескольким SNPs. Авирулентный аллель Avr3a^{KI} был обнаружен В нескольких референсных линиях и не встречался в популяциях 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. Это говорит о необходимости мониторинга популяций P. infestans для отбора сортов, которые были бы устойчивы в данных условиях. Нам не удалось обнаружить горячих точек мутагенеза, за исключением уже известных (Bos et al.,2006), замены происходили в случайных местах и синонимичными. Отсутствие несинонимичных являлись замен может указывать на то, что ген находится под давлением отбора и, по-видимому, играет значительную роль в патогенезе. Утрата данного гена или изменение его аминокислотной последовательности может быть критичной для выживания патогена. В тоже время, авирулентный гомолог практически отсутствует в популяциях патогена. Возможно, это связано с тем, что ген устойчивости R3a был интрогрессирован одним из первых и может часто встречаться сортах гибридах картофеля. Также В И выдвигается предположение о том, существует корреляция между распространением

отдельных аллелей генов устойчивости и температурой окружающей среды. Так в работе Yang et al., 2018 указано, что патоген, содержащий аллель $Avr3a^{EM}$, лучше адаптируется к низким температурным условиям. Некоторыми авторами было отмечено (Du et al., 2015b), что, поскольку все проанализированные на данный момент штаммы *P. infestans* содержат ген Avr3a, следовательно, его вклад в вирулентность является наиболее существенным. Соответственно, мы можем предположить, что сорта, содержащие только ген устойчивости R3a, в большинстве случаев будут поражаться фитофторозом.

Несмотря на высокую степень гомологии с геном *Avr3a*, ген *Avr3b*, судя по всему, не вносит существенного вклада в вирулентность. Данный ген практически не изучен. Неизвестными остаются его механизм действия и мишень в клетке-хозяине, также ничего неизвестно о том, существует ли вирулентная форма *Avr3b* (Rietman et al., 2012).

В ходе нашего анализа этот ген был обнаружен у небольшого числа образцов. Ампликоны гена *Avr3b*, полученные из пушкинских и раменских линий, образовывали SSCP паттерн 1. По результатам секвенирования они отличаются от обнаруженных ранее последовательностей по нескольким SNPs: G122T, G163A, G253C, C324T, T355C и G371A. Замены G122T, G253C и G371A присутствуют во всех образцах и являются несинонимичными.

Интересно отметить, что эти замены оказались характерны для линий, собранных на территории Московской и Ленинградской области, а у референсной линии они отсутствовали, что может быть связано с частичной географической изолированностью российских популяций и генотипом организма-хозяина, который может быть фактором отбора. Пушкинские и раменские линии, в которых встречается этот ген, были сняты с межвидовых гибридов, которые содержат соответствующий ген устойчивости *R3b*, согласно проведенному молекулярному скринингу. Маркер представляет собой ПЦР-продукт лишь небольшого участка гена *R3b*, в результате ПЦР
может проходить амплификация различных гомологов, также он не позволяет оценить целостность гена путем секвенирования, таким образом этот маркер может не иметь корреляции с устойчивостью. Полученные нами последовательности Avr3b отличаются несколькими несинонимичными заменами от тех, что были зарегистрированы в базе данных NCBI. Возможно, что указанные замены влияют на распознавание этого белка в клетке, либо приводят к тому, что транслируется нефункциональный белок. Маркер на ген Avr3b обнаружен лишь у 12-15% пушкинских и референсных линий. В раменских линиях этот маркер встречается значительно чаще (43.75%). Потеря гена является характерной чертой для областей, бедных генами (Knaus et al., 2019). Таким образом, все эти данные могут указывать на то, что, по крайней мере, авирулентная форма гена Avr3b постепенно вытесняется и ее вклад в патогенность является несущественным. Также нами были обнаружены аллельные варианты этого гена, значительно отличающиеся от охарактеризованных ранее. Поскольку в пределах двух выборок (пушкинские и раменские линии) этот ген мономорфен, то мы можем сделать вывод, что данные замены являются характерными для европейской части Российской Федерации.

3.3.4 Анализ гена Avr4 P. infestans

Известно, что вирулентный вариант гена Avr4 отличается ОТ авирулентного сдвигом рамки считывания и наличием стоп-кодонов. Таким транслируется образом, с нуклеотидной последовательности неполноразмерный белок. Учитывая небольшие размеры (17 п.н.), его функциональность ставится под сомнение (van Poppel et al., 2008). В работе Han et al., 2016 было проанализировано распределение данного гена в популяциях Китая. Во всех изолятах была обнаружена вирулентная форма и практически не встречалась авирулентная. Эти результаты совпадают с полученными нами. Нам не удалось обнаружить полиморфизма нуклеотидной последовательности по данным SSCP-анализа для гена Avr4,

возможно, это связано с небольшим размером ПЦР продукта относительно целого гена или неподходящими условиями SSCP. Все обнаруженные нами последовательности относятся к вирулентному варианту. Ранее было показано, что в популяциях Московской и Владимирской областей ген *Avr4* обладает значительным полиморфизмом нуклеотидной последовательности (Мартынов, 2015), где этот ген также был представлен исключительно нефункциональной вирулентной формой. По-видимому, учитывая, небольшие размеры вирулентной формы и практически полное отсутствие авирулентной формы в популяциях *P. infestans*, данный ген не вносит значительного вклада в патогенность.

3.3.5 Анализ гена Avr8 P. infestans

Ген Avr8 обнаружен у 65-95% проанализированных линий, по результатам SSCP-анализа ампликоны образовывали один паттерн. По данным секвенирования, все проанализированные нами линии содержат последовательность на 100% гомологичную прототипу, полученному в результате полногеномного секвенирования изолята Т30-4. Таким образом, данный ген является крайне консервативным, что не характерно для генов консервативность вирулентности. Высокая ЭТОГО гена была также установлена в работе Јо, 2013. Согласно литературным данным, в геноме Р. infestans присутствует только одна копия этого гена. Информация о полиморфизме этого гена, его локализации и мишени в клетке растения и механизмах действия отсутствуют. Некоторые данные о его способности вызывать HR и быть вирулентным на растениях, содержащих ген устойчивости *R8/Rpi-Smira2*, были исследованы с помощью эффекторомики (Stefańczyk et al., 2017). Соответствующий ген устойчивости и его гомологи были обнаружены во многих видах рода Solanum, что делает этот ген перспективным для селекции картофеля.

3.3.6 Полиморфизм гена Avr9 (Avr-Smira1) P. infestans

По результатам SSCP-анализа для гена *Avr9* было обнаружено 3 паттерна. Паттерн 1 и 2 представляли собой гомозиготы, а паттерн 3 образован в результате объединения паттерна 1 и 2 и представляет собой сумму двух аллельных профилей. Зона 2 из паттернов 1 и 3 соответствует авирулентному аллелю этого гена. Зона 1 из паттернов 2 и 3 гомологична вирулентному аллелю AvrSm1-s2, широко распространенному в европейских популяциях *P. infestans* (Stefańczyk et al., 2018) (Рисунок 23).



Рисунок 23. а) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr9*; b) Выравнивание нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr9* с указанием замен, обуславливающих изменение подвижности в ПААГ

В проанализированных образцах присутствует в основном вирулентный аллель гена *Avr9*. В пушкинской линии 87/2-2 и раменских линиях 194, 3 и 5 обнаружен авирулентный вариант этого гена. Ген *Avr9* обнаружен во всех пушкинских линиях, у 81% раменских и 75% референсных линий *P. infestans*.

Ген отличается высоким уровнем полиморфизма нуклеотидной и аминокислотной последовательностей, при этом аминокислоты в положениях 128, 130, 156 и 170 находятся под значительным дизруптивным отбором (Rietman et al., 2012). Эти полиморфизмы в основном приходятся на Стерминальную часть, которая, как известно, участвует в специфичности распознавания. Из этого можно сделать вывод, что такой полиморфизм связан с тем, что у этих белков разные мишени в клетке, либо, что более вероятно, с избеганием распознавания. В своей работе Rietman et. al. 2012 обнаружили два класса аллелей гена Avr9, которые отличаются по функции. Вирулентная форма отличается от авирулентной двумя аминокислотными заменами: метионином и аргинином в положениях 156 и 170 соответственно. Авирулентный аллель может содержать одну из этих замен. Авирулентные варианты распознаются соответствующим геном устойчивости *Rpi-Smira1*. В результате нашего исследования было обнаружено 25 SNPs. Синонимичные 81, 132, 135, 369, 486, 531, 612 замены В положениях: и 624. Несинонимичные замены в положениях: 92, 227, 296, 383, 389, 451, 466, 509, 533, 539, 544, 586, 596, 613, 626, 638 и 661. Последовательности соответствовали 7 гаплотипам. Аллельное разнообразие (Hd): 0.9. Соотношение несинонимичных и синонимичных замен (модель Tajima's) и индекс нейтральности составили 1.23 и 0.76, соответственно. Такое отклонение указывает на давление отбора.

Эти результаты показывают, что Avr9 является высокополиморфным геном, который находится под положительным отбором. Такой полиморфизм аминокислотной последовательности может привести к снижению устойчивости у сортов, содержащих ген *Rpi-Smira1*. Ген *Rpi-Smira1* является одним из перспективных как потенциально обеспечивающий высокий уровень устойчивости к фитофторозу.

3.3.7 Полиморфизм гена Avr-vnt1 P. infestans

Ранее для гена Avr-vnt1 было идентифицировано четыре аллельных варианта: V1, V2, V3 и V4, соответственно (Pel, 2010). По данным SSCPанализа было обнаружено три паттерна, образуемых комбинациями трех зон электрофоретической подвижности. В нашей выборке В основном преобладает паттерн 1, который соответствует гетерозиготному варианту V1/V3, паттерн 2, характерный для линий 87/2-2 и 163, соответствует гомозиготе V2. Паттерн 3 соответствует гетерозиготе, которая включает в себя все три аллельных варианта этого гена. Паттерн 3 обнаружен только в раменских линиях, где он встречается с паттерном 1 в примерно одинаковых соотношениях (Рисунок 24). Вариант V4 имеет стоп-кодон в положении 112, таким образом, он кодирует укороченный белок, который, скорее всего, не является функциональным. В ходе нашего исследования такой вариант не был обнаружен. Ген Avr-vnt1 обнаружен во всех пушкинских и референсных линиях и у большинства раменских линий.



Рисунок 24. a) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr-vnt1*; b) Выравнивание нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr-vnt1* с указанием замен, обуславливающих изменение подвижности в ПААГ

Согласно литературным данным, обнаруженные нами аллельные варианты являются авирулентными и распознаются соответствующим геном устойчивости *Rpi-vnt1.1/Rpi-phu1* (Pel, 2010; Stefańczyk et al., 2017; Stefańczyk et al., 2018). В некоторых из проанализированных образцов у аллеля V2 была обнаружена несинонимичная замена A131G, а у аллеля V3 была обнаружена несинонимичная замена С307А. Меньший полиморфизм этого гена, по сравнению с другими генами вирулентности, может быть связан с тем, что материал S. venturii и S. phureja еще не получил широкое распространение в селекционных программах. Рядом авторов было показано (Pel, 2010; Stefańczyk et al., 2017), что экспрессия гена Avr-vnt1 может изменяться во время заражения. Так, белок Avr-vnt1 не экспрессировался в вирулентных изолятах и экспрессировался в авирулентных изолятах *P. infestans*. В работе Stefańczyk et al., 2017 было показано, что в одном и том же изоляте Р. infestans наблюдается постоянная экспрессия Avr-vnt1 при заражении растений, не содержащих соответствующего гена устойчивости *Rpi-phu1/Rpi*прекращается *vnt1.1*. Однако экспрессия при заражении растений, содержащих соответствующий ген устойчивости, и возобновляется на третий день после инокуляции. Это указывает на то, что патоген способен реагировать на присутствие в клетке соответствующих белков устойчивости и блокировать экспрессию эффекторов. Механизм данного процесса пока не изучен. Тем не менее, отсутствие вирулентного варианта гена Avr-vnt1 делает генетический материал S. venturii и S. phureja перспективным для селекционных программ на долговременную устойчивость к фитофторозу картофеля.

3.3.8 Полиморфизм семейств генов Avr-blb1 (IpiO)и Avr-blb2 P. infestans

Поскольку семейство генов *Avr-blb1* очень полиморфно, а различия по функциям наблюдаются только между отдельными классами, нами были подобраны праймеры на консервативные участки генов отдельных классов. В результате, в паттернах 1 и 2 обнаружены последовательности, относящиеся к I классу семейства *Avr-blb1* (зона 2). Для паттернов 2 и 3 характерна зона 1, которая по нуклеотидной последовательности соответствует II классу генов *Avr-blb1*. Таким образом, паттерн 2 представлен двумя классами этих генов. Вариант, содержащий только II класс генов *ipiO* (он обозначен как паттерн 3), был обнаружен в линии 5 A1 (Рисунок 25).



Рисунок 25. а) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr-blb1*; b) Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr-blb1* с указанием замен, обуславливающих изменение подвижности в ПААГ

Поскольку аллели I класса Avr-blb1 распознаются геном Rpi-blb1 и, следовательно, являются авирулентными, а гены, относящиеся ко II классу, выполняют вирулентную функцию, но только в отсутствие генов I класса (Champouret et al., 2009), то 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* = *Rpi-sto1* (Chen et al., 2012; Haverkort et al., 2016). Некоторыми авторами было отмечено (Du et al., 2015b), что все проанализированные на данный момент штаммы *P. infestans* содержат гены Avr3a и Avr-blb1, следовательно, их вклад наиболее существенным. вирулентность является Bo всех В проанализированных нами образцах также присутствуют различные варианты этих генов, что подтверждает их весомый вклад.

Семейство Avr-blb2 включает в себя более 30 генов. В каждом образце может присутствовать несколько вариантов этого гена. В пушкинских и референсных линиях, для которых характерен SSCP паттерн 1, были обнаружены последовательности, на 98-100% гомологичные генам-PITG 04090. PITG_04085, PITG_20300 **PEXRD39/40** прототипам И соответствующие, таким образом, авирулентным вариантам генов. Во всех линиях были обнаружены последовательности, образующие при SSCPпаттерн 2, 98-100% анализе на гомологичные генам-прототипам: PITG_20301, PITG_20303, PITG_04090 и PEXRD39/40, и соответствующие авирулентным и вирулентным вариантам генов (Таблица 15 и Рисунок 26) (Oh et al., 2009). Таким образом, паттерн 2 представляет собой гетерозиготу, а зона 1 соответствует вирулентным вариантам гена. В зонах 2 и 3 содержатся все остальные варианты последовательностей, которые, согласно данным, являются авирулентными. Полученные литературным нами последовательности также оказались полиморфными.

Таблица 15. Последовательности гена *Avr-blb2*, обнаруженные в паттернах

Паттерн	Обнаруженные последовательности, (%) гомология
гена	
Avr-blb2	
1	<i>PEXRD39/40</i> – GQ869454 (100), GQ869450 (98), GQ869458 (99).
	<i>Avr-blb2</i> – XM_002905755 (PITG_04090) (99), XM_002905749
	(PITG_04085) (98).
2	<i>PEXRD39/40</i> – GQ869454 (98-100), GQ869450 (100), GQ869453
	(99), GQ869455 (99).
	<i>Avr-blb2</i> – XM_002905755 (PITG_04090) (99-100), XM_002895872
	(PITG_20300) (98-100), XM_002895873 (PITG_20301) (99-100),
	XM_002895876 (PITG_20303) (99).



Рисунок 26. а) SSCP-анализ гена вирулентности *Avr-blb2*; b) Фрагмент выравнивания нуклеотидных последовательностей зон гена *Avr-blb2* с указанием замен, обуславливающих изменение подвижности в ПААГ

У большинства пушкинских линий присутствует паттерн 1, а у большинства референсных линий обнаружен паттерн 2, раменские линии были представлены только паттерном 2. Данный ген был обнаружен во всех пушкинских и референсных линиях *P. infestans*. Среди раменских линий, только 25% содержат *Avr-blb2*. Высокоагрессивные линии $13A_2$ и $6A_1$ имеют паттерн 1, таким образом, они могут быть авирулентными на растениях, содержащих *Rpi-blb2*, что делает данный ген перспективным для селекции устойчивых сортов.

3.4 Филогенетический анализ *Avr* генов, основанный на разнообразии SSCP паттернов

Филогенетический анализ *Avr* генов, основанный на разнообразии SSCP паттернов, разделил исследованные линии *P. infestans* на пять кластеров (Рисунок 27А). Дендрограмма, построенная на основе SSCP паттернов, неплохо согласуется с результатами проведенного ранее (Рисунок 27В) генотипирования по 12 SSR локусам (Sokolova et al., 2017).



Рисунок 27. Филогенетический анализ линий *P. infestans*, (A) основанный на SSCP паттернах 11 *Avr* генов (35 зон электрофоретической подвижности) и (B) 41 полиморфном SSR локусе. Дендрограммы построены

методом UPGMA с помощью программы SplitsTree 4.14.8, указаны значения бутстрепа для 1000 повторов

Разнообразие SSCP паттернов в раменских линиях невелико, однако, согласно микросателлитному анализу, некоторые из них обладают индивидуальным профилем. Пушкинские линии отличаются большим разнообразием как по SSCP паттернам, так и по SSR локусам.

По результатам генотипирования по 12 SSR локусам нам удалось обнаружить шесть кластеров, остальные линии имеют индивидуальный профиль. Корреляция между геном вирулентности Avr3a и SSR была также ранее обнаружена другими авторами (Yang et al., 2018). По данным SSCPанализа, пушкинские линии разделяются на три кластера: I, II и IV. Все раменские линии, включая изолят 161, образуют общий с пушкинскими линиями кластер I. Высокоагрессивные линии 6_A1 и 13_A2 выделяются в отдельный кластер V. 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. Пушкинские полученные линии, ИЗ одного изолята, В основном кластеризуются вместе.

Высокоагрессивные линии 6_A1 и 13_A2, распространение которых по Европе в настоящее время тщательно отслеживается, образуют отдельный кластер. Клональная линия 13_A2 стала доминирующей в Европе в конце 2000-х годов, вытеснив 6_A1 и другие существующие ранее клональные линии (Cooke et al., 2012). Тот факт, что эти две линии образуют кластер, объясняем это тем, что в геноме этих линий отсутствуют некоторые из генов вирулентности, в частности *Avr1*, *Avr4*, *Avr8* и *Avr9*, в 13_A2 также не удалось амплифицировать *Avr2*. В тоже время, в этих двух линиях *P. infestans* были обнаружены такие гены, как *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, распознающие гены устойчивости которых практически отсутствуют в сортах картофеля. Эти данные могут объяснить, почему 13_А2 и 6_А1 поражают многие сорта картофеля и стали причиной серьезных эпидемий фитофтороза в Северо-Западной Европе, Китае и Индии (Cooke et al., 2012; Li et al., 2013; Dey et al., 2018).

Также по составу генов вирулентности отличается линия 87/2-2, кластеризующаяся отдельно. Она была снята с наименее устойчивого сорта картофеля, в котором по данным молекулярного анализа присутствует только один из маркеров гена устойчивости *R2*. В линии 87/2-2 обнаружены преимущественно авирулентные варианты *Avr* генов.

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 растениях, выращиваемых на территории ВИР (г. Пушкин) и высоким инфекционным фоном в почве.

Технология выявления полиморфизма при помощи SSCP метода позволяет типировать линии *P. infestans* с предсказанием их вирулентности. Такого рода предсказание имеет биологическую обоснованность, поскольку данная технология основана на анализе тех участков генома, которые непосредственно связаны с вирулентностью.

3.5 Сравнение профиля Avr генов P. infestans с факторами вирулентности и профилем генов устойчивости растений картофеля

Для большей части гибридов картофеля, заселенных описанными в настоящем исследовании линиями *P. infestans*, ранее был определен состав *R* генов (Fadina et al., 2017). Профили *Avr* и *R* генов в большинстве случаев согласуются между собой. Исключение составляет ген *Avr3b*, который обнаружен в пушкинских линиях 11/2 и раменских линиях 155, 156, 157 и 196, колонизирующих гибриды картофеля, содержащие ген *R3b*. Однако в

исследованных нами последовательностях Avr3b было обнаружено несколько несинонимичных замен, что могло повлиять на его распознавание соответствующим геном устойчивости. В гибридах 14/8-09, 120 (118/6-2011) и сорте Robijn обнаружен маркер R2-1137, однако другой маркер того же гена R2-686 отсутствует, в связи с этим, такие маркеры не были учтены в данной работе. В линиях, которые были сняты с гибридов, содержащих *Rpiblb2*, присутствуют вирулентные варианты *Avr-blb2* (Oh et al., 2009). Полученные профили генов устойчивости (Fadina et al., 2017) и генов вирулентности, а также результатами тестов на растениях-дифференциаторах (Sokolova et al., 2017) представлены в Таблице 16.

Таблица 16. Сравнение состава генов вирулентности *P. infestans* с профилем генов устойчивости картофеля и факторами вирулентности, полученными на растениях-дифференциаторах

Клон гибрида	Линии	Avr гены	Факторы
картофеля;	<i>P</i> .		вирулент
<i>R</i> гены	infestans		ности
	Пуш	кинские линии P. infestans	
14/8-09;	117/2-1,	avr1, Avr2 ^K , avr3a ^{EM} , avr4, Avr9 (I,	12345791
R3a, R3b, Rpi-	117/2-2	II), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-	011
vnt1.3		<i>vnt1</i> (V1,V3)	
139 (4/1-2012);	120-1	avr1, Avr2 ^K , avr3a ^{EM} , avr4, Avr8,	12347891
R1, Rpi-blb1/Rpi-		Avr9 (I), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2,	011
sto1, Rpi-blb2		Avr-vnt1 (V1,V3)	
106 (171-3);	11/2-1	avr1, Avr2-like ^{TV/MI} , avr3a ^{EM} , Avr3b,	13478101
R3b		Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I, II),	1
		Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
106 (171-3);	11/2-2	avr1, Avr2-like ^{TV/MI} , avr3a ^{EM} , Avr3b,	12347810
R3b		avr4, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I,	11
		II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
106 (171-3);	11/2-4	avr1, Avr2-like ^{TV/MI} , avr3a ^{EM} , Avr3b,	н.д.
R3b		avr4, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I,	
		II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
120 (118/6-	109/1-2	avr1, Avr2-like ^{MI} , avr3a ^{EM} , avr4, Avr9	12345791
2011);		(I, II), Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-	011
<i>R3a, R3b</i>		<i>vnt1</i> (V1,V3)	
160-17;	43/1-1	avr1, Avr2 ^K , Avr2-like ^{MI} , avr3a ^{EM} ,	12347891

Rpi-blb2		avr4, Avr8, Avr9 (I), Avr-blb1 (I, II),	011
		Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
160-17;	43/1-2	$avr1$, $Avr2^{K}$, $Avr2$ -lik e^{MI} , $avr3a^{EM}$,	12347891
Rpi-blb2		avr4, Avr8, Avr9 (I), Avr-blb1 (I, II),	011
		Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
160-17;	43/1-3	$avr1$, $Avr2^{K}$, $Avr2$ -lik e^{MI} , $avr3a^{EM}$,	12347891
Rpi-blb2		avr4, Avr8, Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2,	011
		Avr-vnt1 (V1,V3)	
18/40-2000;	18/1-1	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	12345678
R1, Rpi-vnt1.3		avr4, Avr8, Avr9 (I), Avr-blb1 (I, II),	91011
		Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
18/40-2000;	18/1-4	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	12345678
R1, Rpi-vnt1.3		avr4, Avr8, Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2,	91011
		Avr-vnt1 (V1,V3)	
113(50-1KWA);	103-1,	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	12346789
R1, Rpi-blb2	103-2,	avr4, Avr8, Avr9 (I), Avr-blb1 (I, II),	1011
	103-3,	Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
	103-5		
113(50-1KWA);	103-4	$avr1, Avr2^{\kappa}, Avr2$ -like ^{<math>M1, $avr3a^{EM}$,</math>}	12346789
R1, Rpi-blb2		avr4, Avr9 (I), Avr-blb1 (I), Avr-blb2,	1011
		Avr-vnt1 (V1,V3)	
27;	107-1	$avr1, Avr2^{\kappa}, avr3a^{EM}, avr4, Avr9$ (I),	12347891
R1, Rpi-blb1,		Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1	0
Rpi-blb2		(V1,V3)	
27;	107-2	avr1, Avr2 ^k , avr3a ^{EM} , avr4, Avr9 (I),	12347891
R1, Rpi-blb1,		Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr-vnt1	011
Rpi-blb2		(V1,V3)	
Robijn	87/2-2	avr1, Avr2 ^k , Avr2-like ¹ ^{v/MI} , avr3a ^{LM} ,	12378
		avr4, Avr8, Avr9 (11), Avr-blb1 (1),	
		Avr-blb2, Avr-vnt1 (V2)	
2272 - 52	Рам	енские линии <i>P. infestans</i>	
2372-60;	96	Avr2 ^k , Avr2-like ^m , avr3a ^{LM} , Avr8,	н.д.
<i>K1</i> , <i>K</i> 2, <i>K</i> 3 <i>a</i> , <i>R</i> 3 <i>b</i>	1.5.5	Avr-blb1 (1), Avr-vnt1 (V1, V3)	
13/11-09;	155	Avr2", Avr2-like", avr3a ^{Lin} , Avr3b,	н.д.
K3b, Rpi-blbI,		Avr-blb1 (1), Avr-vnt1 (V1, V3)	
<i>Kpi-vnt1.3</i>	150		
14/8-09;	156	Avr2 , Avr2-like , avr3a ² , Avr3b,	н.д.
<i>K3a, K3b, Rpi-</i>		$Avr\delta, Avr9 (1, 11), Avr-blb1 (1)$	
vnt1.3	157		
15/13-09;	15/	Avr2 ⁻ , Avr2-like , avr3a , Avr3b,	н.д.
KZ, KSD, KDI-		Avrð, Avr- $blb1$ (1), Avr- $vnt1$ (V1,V3)	
<i>blb1</i> , <i>Kpi-blb2</i>	150		
10/2/-09;	138	avr1, Avr2 , Avr2-like , avr3a ,	Н.Д.

R1, Rpi-blb1,		Avr3b, avr4, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-	
Rpi-blb2		blb1 (I), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1,V3)	
18/40-2000;	163	$Avr2^{K}$. $Avr2$ -like ^{MI} . $avr3a^{EM}$. $avr4$.	н.д.
R1, Rpi-vnt1.3		Avr8, Avr9 (I), Avr-blb1 (I), Avr-blb2,	
		Avr-vnt1 (V2)	
25-1-2007;	165	$Avr2^{K}$, $Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$, $Avr8$,	н.д.
R1, R3b, Rpi-		Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I), Avr-blb2	
blb2			
24-1;	191	$Avr2^{K}$, $Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$, $Avr8$,	н.д.
Rpi-blb2		Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I), Avr-blb2,	
1		Avr-vnt1 (V1, V2, V3)	
24-2;	192	Avr2-like ^{MI} , avr3a ^{EM} , avr4, Avr8,	н.д.
R1, Rpi-blb2		Avr9 (I), Avr-blb1 (I), Avr-vnt1 (V1,	
		V2, V3)	
134-6-2006;	194	$avr1, Avr2^{K}, avr3a^{EM}, avr4, Avr8,$	н.д.
R3b, Rpi-vnt1.3		Avr9 (II), Avr-blb1 (I)	
134-2-2006;	195	$Avr2^{K}$, $Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$, $avr4$,	н.д.
R1, Rpi-vnt1.3		Avr3b, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I),	
		Avr-vntl (V1, V3)	
135-1-2006;	196	$Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{$MI, avr3a^{EM}, Avr3b$,}	н.д.
R2, R3a, R3b,		Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I), Avr-	
Rpi-vnt1.3		<i>vnt1</i> (V1, V3)	
Atzimba;	198	$Avr2^{K}$, $Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$, $avr4$,	н.д.
Rpi-blb2		Avr3b, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I),	
1		Avr-vnt1 (V1, V3)	
Eesterling	3	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	н.д.
		avr4, Avr8, Avr9 (II), Avr-blb1 (I, II),	
		Avr-vnt1 (V1, V2, V3)	
Robijn	5	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	н.д.
5		avr4, Avr8, Avr9 (II), Avr-blb1 (I, II),	
		Avr-vnt1 (V1, V2, V3)	
Gloria;	6	Avr2-like ^{MI} , avr3a ^{EM} , Avr8, Avr9 (I,	н.д.
R3a, R3b		II), Avr-blb1 (I)	
	Рефе	ренсные линии P. infestans	
н.д.	161	$avr1, Avr2^{K}, Avr2-like^{MI}, avr3a^{EM},$	12345678
		avr4, Avr8, Avr9 (I, II), Avr-blb1 (I,	91011
		II), Avr-blb2, Avr-vnt1 (V1, V3)	
н.д.	4 A1	$avr1, Avr2^{K}, avr3a^{EM}, Avr3b, avr4,$	н.д.
	$(\overline{C1})$	Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr8, Avr9 (I),	
		Avr-vnt1 (V1, V3)	
н.д.	8_A1	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{KI/EM}$,	н.д.
	(C2)	avr4, Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr8,	
		Avr9 (I), Avr-vnt1 (V1, V3)	

н.д.	5_A1	avr1, Avr2-like ^{MI} , avr3a ^{KI/EM} , avr4,	н.д.
	(C4)	Avr-blb1 (II), Avr-blb2, Avr8, Avr9	
		(I), <i>Avr-vnt1</i> (V1, V3)	
н.д.	US-8	avr1, Avr2-like ^{TV/MI} , avr3a ^{EM} , avr4,	н.д.
	(C6)	Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr8, Avr9 (I),	
		Avr-vnt1 (V1, V3)	
н.д.	EC-1	$avr1, Avr2^{K}, Avr2$ -like ^{MI} , $avr3a^{EM}$,	н.д.
	(C7)	avr4, Avr-blb1 (I, II), Avr-blb2, Avr8,	
		Avr9 (I), Avr-vnt1 (V1, V3)	
н.д.	13_A2	avr3a ^{EM} , Avr-blb1 (I), Avr-blb2, Avr-	н.д.
	(3928a)	<i>vnt1</i> (V1, V3)	
н.д.	6_A1	Avr2 ^{K/N} , avr3a ^{EM} , Avr-blb1 (I), Avr-	н.д.
	(4100a)	blb2, Avr-vnt1 (V1, V3)	

Avr9 (I) – вирулентный класс генов, *Avr9* (II) – авирулентный класс генов; *Avr-blb1* (I) – авирулентный класс генов, *Avr-blb1* (II) – вирулентный класс генов; н.д. – нет данных

В четырех случаях пушкинские линии, выделенные из одного изолята, различались одним *Avr* геном – это линии 11/2-2 и 11/2-4, 43/1-1 и 43/1-2, 18/1-1 и 18/1-4, линии 103. По нашему мнению, это свидетельствует о том, что эти линии могли возникнуть в результате сомаклональной изменчивости, но также они могут являться независимыми линиями, имеющими разное происхождение, заселяющими одно растение. Однако, второе маловероятно, поскольку отличия между линиями невелики.

Далее, мы сравнили состав генов вирулентности в пушкинских линиях *P. infestans* с составом факторов вирулентности, идентифицированных с помощью растений-дифференциаторов Мастенброка-Блэка (Malcolmson and Black, 1966). Более современные и надежные трансгенные растениядифференциаторы, созданные на основе сорта Desiree' и достоверно несущие в своем составе только один из генов устойчивости, были разработаны в Нидерландах и остаются недоступными для России (Zhu et al., 2015). При определении состава генов вирулентности на растениях-дифференциаторах, номер расы означает отсутствие авирулентной формы гена. Вирулентная форма не определяется с помощью этих дифференциаторов. Состав Avr генов, выявленных молекулярными методами, и факторов вирулентности, определенных фитопатологическим методом, в большинстве случаев не совпадают. Наибольшее согласие обнаруживается для генов Avr1, Avr3a и Avr4, однако этот результат можно объяснить тем, что наша выборка представлена исключительно вирулентными вариантами этих генов. Для остальных генов, для которых можно сопоставить данные, полученные двумя независимыми методами, согласие наблюдается лишь в 10-30% случаев. Такой результат 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 растениях-дифференциаторах Мастенброка-Блэка присутствуют 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.

Некоторые линии были сняты с одних и тех же гибридов и сортов в разные годы в Ленинградской и Московской областях. Эти линии различаются по аллельному составу Avr генов. Линии 18/1-1, 18/1-4 и 163 были получены с гибрида 18/40-2000, однако они отличаются по составу генов вирулентности, в частности, в линиях 18/1-1 и 18/1-4 присутствуют оба класса гена Avr-blb1. Исходя из состава R генов, определенных с помощью молекулярных маркеров, наблюдаемые различия в генах вирулентности не должны оказывать влияние на способность патогена инфицировать данный гибрид картофеля. Линии 87/2-2 и 5 инфицировали сорт Robijn, однако они значительно отличаются по составу Avr генов, что может быть 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.

Результаты ПО генам устойчивости вирулентности, И генам полученными молекулярными методами, большинстве случаев В коррелируют между собой. Несогласованность результатов может быть связана с тем, что только с помощью молекулярных маркеров невозможно определить, является ли ген функциональным, а также отследить его экспрессию, для чего необходимо проводить дополнительные исследования, в частности, методом эффекторомики. Метод SSCP, используемый для скрининга линий, позволяет обнаружить первичного полиморфизм нуклеотидной последовательности и отбирать полиморфные варианты для дальнейшего анализа. Он также может быть применен для изучения полиморфизма устойчивости определения полиморфизма генов для нуклеотидной последовательности, поскольку такие изменения могут приводить к снижению или утрате устойчивости растения к патогену.

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 SSCPанализ 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*, *Avr9*, *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-Генбанка NCBI. прототипами Подавляющее большинство ИЗ последовательностей генов Avr1, Avr2-like, Avr3a, Avr4, Avr-vnt1 и Avr9 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 растенийдифференциаторов 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 растений-дифференциаторов, методом, ПО реакции 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 эффекторомики соответствующих генов устойчивости, на которых строится современная селекция картофеля.

выводы

 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*.
 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, Avr9, 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 колонизуют 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.

He менее важным является использование Avr генов как высокоспецифичного инструмента для поиска И различения генов устойчивости к фитофторозу методом эффекторомики на всех этапах селекции картофеля. работы генетическими ОТ с коллекциями ДО определения подлинности сортов семенного картофеля.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Вахрушева, О.А. Система врожденного иммунитета у растений / О.А. Вахрушева, С.А. Недоспасов // Молекулярная биология. – 2011. – №45(1). – С. 20-29.
- Дьяков, Ю.Т. Грибные элиситоры / Юрий Таричанович // Мат. VII Всерос. микологич. школы-конф. с междунар. Участием «Биотические связи грибов: мосты между царствами». Изд-во МГУ. – 2015. – С. 18-38.
- Еланский, С.Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернириоза картофеля и томата: дис. д-ра биол. наук: 03.02.12 / Сергей Николаевич Еланский. – Москва., 2012. – 325 С.
- Еланский, С.Н. Структура и динамика популяций *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза картофеля и томата / С.Н. Еланский, Л.Ю. Кокаева, Н.В. Стацюк, Ю.Т. Дьяков //Защита картофеля. – 2017. – №.3. – С. 3-44.
- Кузнецова, М.А. Мониторинг изолятов *Phytophthora infestans*, выделенных с картофеля и томатов в Московской области (2009-2017 гг) / М.А. Кузнецова, Н.В. Стацюк, А.Н. Рогожин, Т.И. Уланова, Е.В. Морозова, В.Н. Демидова //Достижения науки и техники АПК. 2018. №32(3). С. 28–33.
- Мартынов, В.В. Характеристика полиморфизма первичной структуры гена *Avr4* оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary / В.В. Мартынов //Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2015. – №4. – С. 29-36.
- Рогозина, Е.В. Молекулярно-генетические взаимодействия в системе «патоген-хозяин» при фитофторозе картофеля и современные стратегии селекции (обзор) / Е.В. Рогозина //Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №5. – С. 17–30.
- 8. Соколова, Е.А. Молекулярный анализ полиморфизма расдифференциаторов *Phytophthora infestans* / Е.А. Соколова, Е.В. Морозова,

Т.И. Уланова, О.П. Малюченко, Я.И. Алексеев, М.А. Кузнецова, Э.Е. Хавкин // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – №51(3). – С. 376–384.

- Шафикова, Т.Н. Молекулярно-генетические аспекты иммунитета растений к фитопатогенным бактериям и грибам / Т.Н. Шафикова, Ю.В. Омеличкина // Физиология растений. – 2015. – № 62(5). – С. 611-611.
- 10.Adachi, H. A resistosome-activated 'death switch' / H. Adachi, S. Kamoun, A. Maqbool // Nature plants. 2019. P. 457–458.
- 11.Amaro, T.M. A perspective on CRN proteins in the genomics age: evolution, classification, delivery and function revisited / T.M. Amaro, G.J. Thilliez, G.B. Motion, E. Huitema //Frontiers in plant science. 2017. №8. P. 1–12.
- 12.Anderson, R.G. Recent progress in RXLR effector research / R.G. Anderson, D. Deb, K. Fedkenheuer, J.M. McDowell // MPMI. 2015. №28(10). P. 1063-1072.
- 13.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, J.I.B. Bos, E. Venter, A.O. Avrova, A.P. Rehmany, U. Böhme, K. Brooks, I. Cherevach, N. Hamlin, B. White, A. Fraser, A. Lord, M.A. Quail, C. Churcher, N. Hall, M. Berriman, S. Huang, S. Kamoun, J.L. Beynon, P.R.J. Birch // PNAS. 2005. №102(21). P. 7766-7771.
- 14.Ballvora, A. The *R1* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes / A. Ballvora, M.R. Ercolano, J. Weiß, K. Meksem, C.A. Bormann, P. Oberhagemann, F. Salamini, C. Gebhardt // The Plant Journal. 2002. №30(3). P. 361-371.
- 15.Bent, A.F. Elicitors, effectors, and *R* genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions / A.F. Bent, D. Mackey //Annu. Rev. Phytopathol. 2007.
 №45. P. 399-436.

- 16.Bergelson, J. Evolutionary dynamics of plant *R*-genes / J. Bergelson, M. Kreitman, E.A. Stahl, D. Tian// Science. 2001. №292(5525). P. 2281-2285.
- 17.Birch, P.R.J. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* / P.R.J. Birch, M. Armstrong, J. Bos, P. Boevink, E.M. Gilroy, R.M. Taylor, S. Wawra, L. Pritchard, L. Conti, R. Ewan, S.C. Whisson, P. van West, A. Sadanandom, S. Kamoun // Journal of Experimental Botany. 2009. №60(4). P. 1133-1140.
- 18.Boevink, P.C. Oomycetes seek help from the plant: *Phytophthora infestans* effectors target host susceptibility factors / P.C. Boevink, H. McLellan, E.M. Gilroy, S. Naqvi, Q. He, L. Yang, X. Wang, D. Turnbull, M.R. Armstrong, Z. Tian, P.R.J. Birch // Molecular plant. 2016. №9(5). P. 636-638.
- 19.Bos, J.I.B. Distinct amino acids of the *Phytophthora infestans* effector AVR3a condition activation of R3a hypersensitivity and suppression of cell death / J.I.B. Bos, A. Chaparro-Garcia, L.M. Quesada-Ocampo, B.B.M. Gardener, S. Kamoun // MPMI. 2009. №22(3). P. 269-281.
- 20.Bouwmeester, K. At the frontier; RXLR effectors crossing the *Phytophthora* host interface / K. Bouwmeester, H.J.G. Meijer, F. Govers // Frontiers in plant science. – 2011. – №2. – P. 1–.8
- 21.Bouwmeester, K. Genome biology cracks enigmas of oomycete plant pathogens
 / K. Bouwmeester, P. Van Poppel, F. Govers // Molecular aspects of plant disease resistance. Oxford, UK: Wiley-Blackwell. 2009. P. 102-134.
- 22.Bozkurt, T.O. *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface / T.O. Bozkurt, S. Schornack, J. Win, T. Shindo, M. Ilyas, R. Oliva, L.M. Cano, A.M.E. Jones, E. Huitema, R.A.L. van der Hoorn, S. Kamoun, H.J.G. Meijer, F. Govers // PNAS. 2011. №108(51). P. 20832-20837.

- 23.Bradshaw, J.E. Improving the yield, processing quality and disease and pest resistance of potatoes by genotypic recurrent selection / J.E. Bradshaw, M.F.B. Dale, G.R. Mackay // Euphytica. – 2009. – №170(1-2). – P. 170–215.
- 24.Cárdenas, M. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* in the Northern Andean region / M. Cárdenas, A. Grajales, R. Sierra, A. Rojas, A. González-Almario, A. Vargas, M. Marín, G. Fermín, L.E. Lagos, N.J. Grünwald, A. Bernal, C. Salazar, S. Restrepo // BMC genetics. – 2011. – №12(1). – P. 12–23.
- 25.Champouret, N. *Phytophthora infestans* isolates lacking class I *ipiO* variants are virulent on *Rpi-blb1* potato / N. Champouret, K. Bouwmeester, H. Rietman, T. van der Lee, C. Maliepaard, A. Heupink, P.J.I. van de Vondervoort, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, E.A.G. van der Vossen, F. Govers, V.G.A.A. Vleeshouwers // MPMI. 2009. №22(12). P. 1535-1545.
- 26.Chaparro-Garcia, A. *Phytophthora infestans* RXLR-WY effector AVR3a associates with dynamin-related protein 2 required for endocytosis of the plant pattern recognition receptor FLS2 / A. Chaparro-Garcia, S. Schwizer, J. Sklenar, K. Yoshida, B. Petre, J.I.B. Bos, S. Schornack, A.M.E. Jones, T.O. Bozkurt, S. Kamoun // PLoS One. 2015. №10(9). P. e0137071.
- 27.Chatziavgerinos, F. Studying the *Phytophthora infestans* effector recognition in potato / Fokion Chatziavgerinos // Wageningen University. 2015. P. 44.
- 28.Chen, Y. Determination of virulence contribution from *Phytophthora infestans* effector IPI-O4 in a resistant potato host containing the *RB* gene / Y. Chen, D.A. Halterman // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2017. №100. P. 30-34.
- 29.Chen, Y. *Phytophthora infestans* effectors IPI-O1 and IPI-O4 each contribute to pathogen virulence / Y. Chen, D.A. Halterman // Phytopathology. 2017. №107(5). P. 600-606.
- 30.Chen, Y. Molecular determinants of resistance activation and suppression by *Phytophthora infestans* effector IPI-O / Y. Chen, Z. Liu, D.A. Halterman // PLoS pathogens. – 2012. – №8(3). – P. e1002595.

- 31.Chizhik, V.K. Polymorphism of the Avr2 gene of oomycete Phytophthora infestans (Mont.) de Bary in the population of Moscow region / V.K. Chizhik, V.V. Martynov // Russ. J. Genet. – 2017. – №53(12). – P. 1328-1334.
- 32.Cooke, D.E.L. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen / D.E.L. Cooke, L.M. Cano, S. Raffaele, R.A. Bain, L.R. Cooke, G.J. Etherington, K.L. Deahl, R.A. Farrer, E.M. Gilroy, E.M. Goss, N.J. Grünwald, I. Hein, D. MacLean, J.W. McNicol, E. Randall, R.F. Oliva, M.A. Pel, D.S. Shaw, J.N. Squires, M.C. Taylor // PLoS pathogens. 2012. №8(10). P. e1002940.
- 33.Cooke, D.E.L. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity / D.E.I. Cooke, A.K. Lees // Plant pathology. – 2004. – №53(6). – P. 692-704.
- 34.Curt-Varesano, A. The aspartyl protease TgASP5 mediates the export of the *Toxoplasma* GRA16 and GRA24 effectors into host cells / A. Curt- Varesano, L. Braun, C. Ranquet, M.A. Hakimi, A. Bougdour // Cellular microbiology. 2016. №18(2). P. 151-167.
- 35.Dalio, R.J.D. *Phytophthora parasitica* effector PpRxLR2 suppresses *Nicotiana benthamiana* immunity / R.J.D. Dalio, H.J. Maximo, T.S. Oliveira, R.O. Dias, M.C. Breton, H. Felizatti, M. Machado // MPMI. 2018. №31(4). P. 481-493.
- 36.Dangl, J.L. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment / J.L. Dangl, D.M. Horvath, B.J. Staskawicz // Science. 2013. №341(6147). P. 746-751.
- 37.Danies, G. An ephemeral sexual population of *Phytophthora infestans* in the northeastern United States and Canada / G. Danies, K. Myers, M.F. Mideros, S. Restrepo, F.N. Martin, D.E.L. Cooke, C.D. Smart, J.B. Ristaino, A.J. Seaman, B.K. Gugino, N.J. Grünwald, W.E. Fry // PloS One. 2014. №9(12). P. e116354.

- 38.de Carvalho, M.C.C.G. Prediction of the in planta *Phakopsora pachyrhizi* secretome and potential effector families / M.C.C.G. de Carvalho, L.C. Nascimento, L.M. Darben, A.M. Polizel- Podanosqui, V.S. Lopes- Caitar, M. Qi, C.S. Rocha, M.F. Carazzolle, M.K. Kuwahara, G.A.G. Pereira, R.V. Abdelnoor, S.A. Whitham, F.C. Marcelino- Guimarães // Molecular plant pathology. 2017. №18(3). P. 363-377.
- 39.de Jonge, R. Extensive chromosomal reshuffling drives evolution of virulence in an asexual pathogen / R. de Jonge, M.D. Bolton, A. Kombrink, G.C. van den Berg, K.A. Yadeta, B.P. Thomma // Genome research. – 2013. – №23. – P. 1271-1282.
- 40.Dey, T. Large sub-clonal variation in *Phytophthora infestans* from recent severe late blight epidemics in India / T. Dey, A. Saville, K. Myers, S. Tewari, D.E.L. Cooke, S. Tripathy, W.E. Fry, J.B. Ristaino, S.G. Roy // Scientific reports. 2018. №8(1). P. 4429.
- 41.Dong, S. Effector specialization in a lineage of the Irish potato famine pathogen
 / S. Dong, R. Stam, L.M. Cano, J. Song, J. Sklenar, K. Yoshida, T.O. Bozkurt,
 R. Oliva, Z. Liu, M. Tian, J. Win, M.J. Banfield, A.M.E. Jones, R.A.L. van der
 Hoorn, S. Kamoun // Science. 2014. №343(6170). P. 552-555.
- 42.Dong, S. The *Phytophthora sojae* avirulence locus Avr3c encodes a multi-copy RXLR effector with sequence polymorphisms among pathogen strains / S. Dong, D. Qutob, J. Tedman-Jones, K. Kuflu, Y. Wang, B.M. Tyler, M. Gijzen // PLoS One. 2009. №4(5). P. e5556.
- 43.Du, Y. Immune activation mediated by the late blight resistance protein R1 requires nuclear localization of R1 and the effector AVR1 / Y. Du, J. Berg, F. Govers, K. Bouwmeester // New Phytologist. 2015. №207(3). P. 735-747.
- 44.Du, Y. *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR1 interacts with exocyst component Sec5 to manipulate plant immunity / Y. Du, M.H. Mpina, P.R. Birch, K. Bouwmeester, F. Govers // Plant Physiology. 2015. №169(3). P. 1975-1990.

- 45.Du, Y. RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1 / Y. Du, R. Weide, Z. Zhao, P. Msimuko, F. Govers, K. Bouwmeester// Studies in mycology. 2018. №89. P. 85-93.
- 46.Elansky, S.N. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance / S.N. Elansky, M.A. Pobedinskaya, L.Y. Kokaeva, N.V. Statsyuk, Y.T. Dyakov // Journal of Plant Pathology. 2015. №97(3). P. 449-456.
- 47.Elshire, R.J. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species / R.J. Elshire, J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, S.E. Mitchell // PloS One. 2011. №6(5). P. e19379.
- 48.Engelhardt, S. Relocalization of late blight resistance protein R3a to endosomal compartments is associated with effector recognition and required for the immune response / S. Engelhardt, P.C. Boevink, M.R. Armstrong, M.B. Ramos, I. Hein, P.R. Birch // The Plant Cell. 2012. P. 5142-5158.
- 49.Fadina, O.A. Revisiting late blight resistance genes in complex interspecific potato hybrids / O.A. Fadina, M.P. Beketova, M.A. Kuznetsova, E.V. Rogozina, E.E. Khavkin // PAGV-Special Report. 2017. №. 18. P. 245-256.
- 50.Fawke, S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles / S. Fawke, M. Doumane, S. Schornack // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2015. – №79(3). – P. 263-280.
- 51.Flor, H.H. Current status of the gene-for-gene concept / H.H. Flor // Annu. Rev. Phytopathol. – 1971. – №9(1). – P. 275-296.
- 52.Forbes, G.A. A global marker database for *Phytophthora infestans* / G.A. Forbes, S.B. Goodwin, A. Drenth, P. Oyarzun, M.E. Ordoñez, W.E. Fry // Plant Disease. 1998. №82(7). P. 811-818.

- 53.Forbes, G.A. Identification of an A2 population of *Phythophthora andina* attacking tree tomato in Peru indicates a risk of sexual reproduction in this pathosystem / G.A. Forbes, S. Gamboa, H. Lindqvist- Kreuze, F.R. Oliva, W. Perez // Plant Pathology. 2016. №65(7). P. 1109-1117.
- 54.Foster, S.J. *Rpi-vnt1. 1*, a *Tm-22* homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight / S.J. Foster, T.-H. Park, M. Pel, G. Brigneti, J. Śliwka, L. Jagger, E. van der Vossen, J.D.G. Jones // MPMI. 2009. №22(5). P. 589-600.
- 55.Fouché, S. The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes / S. Fouché, C. Plissonneau, D. Croll // Current opinion in microbiology. 2018. №46. P. 34-42.
- 56.Fry, WE. *Phytophthora infestans*: the plant (and *R* gene) destroyer / W.E. Fry // Molecular plant pathology. 2008. 9(3). 385-402.
- 57.Fry, W.E. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen / W.E. Fry, P.R.J. Birch, H.S. Judelson, N.J. Grünwald, G. Danies, K.L. Everts, A.J. Gevens, B.K. Gugino, D.A. Johnson, S.B. Johnson, M.T. McGrath, K.L. Myers, J.B. Ristaino, P.D. Roberts, G.Secor, and C.D. Smart // Phytopathology. 2015. №105(7). P. 966-981.
- 58.Fry, W.E. *Phytophthora infestans*: New tools (and old ones) lead to new understanding and precision management / W.E. Fry // Annu. Rev. Phytopathol. 2016. №54. P. 529-547.
- 59.Gaulin, E. Effector-mediated communication of filamentous plant pathogens with their hosts / E. Gaulin // Advances in Botanical Research. – Academic Press, 2017. – №82. – P. 161-185.
- 60.Gebhardt, C. The historical role of species from the *Solanaceae* plant family in genetic research / C. Gebhardt // Theor. Appl. Genet. 2016. №129(12). P. 2281-2294.
- 61.Gilroy, E.M. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between *PiAVR2* and *PiAVR2* -*like* in *Phytophthora infestans*

determine virulence on *R2* plants / E.M. Gilroy, S. Breen, S.C. Whisson, J. Squires, I. Hein, M. Kaczmarek, D. Turnbull, P.C. Boevink, A. Lokossou L.M. Cano, J. Morales, A.O. Avrova, L. Pritchard, E. Randall, A. Lees, F. Govers P. van West, S. Kamoun, V.G.A.A. Vleeshouwers, D.E.L. Cooke, P.R.J. Birch // New Phytologist. – 2011. – N 191(3). – P. 763-776.

- 62.Gladieux, P. Fungal evolutionary genomics provides insight into the mechanisms of adaptive divergence in eukaryotes / P. Gladieux, J. Ropars H. Badouin, A. Branca, G. Aguileta, D.M. de Vienne, R.C. Rodríguez, S. Branco T. Giraud // Molecular ecology. 2014. №23(4). P. 753-773.
- 63.Goodwin, S.B. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* / S.B. Goodwin, A. Drenth, W.E. Fry // Current genetics. – 1992. – №22(2). – P. 107-115.
- 64.Goss, E.M. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes / E.M. Goss, J.F. Tabima, D.E.L. Cooke, S. Restrepo, W.E. Fry, G.A. Forbes, V.J. Fieland, M. Cardenas, N.J. Grünwald // PNAS. – 2014. – P. 201401884.
- 65.Goss, E.M. The plant pathogen *Phytophthora andina* emerged via hybridization of an unknown *Phytophthora* species and the Irish potato famine pathogen, *P. infestans* / E.M. Goss, M.E. Cardenas, K. Myers, G.A. Forbes, W.E. Fry, S. Restrepo, N.J. Grünwald // PloS One. 2011. №6(9). P. e24543.
- 66.Griffith, G.W. Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions / G.W. Griffith, D.S Shaw // Appl. Environ. Microbiol. 1998. №64(10). P. 4007-4014.
- 67.Guo, J. *Phytophthora infestans* isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity / J. Guo, T. Van Der Lee, D.Y. Qu, Y.Q. Yao, X.F. Gong, D.L. Liang, K.Y. Xie, X.W. Wang, F. Govers // Plant Biology. 2009. №11(1). P. 57-67.

- 68. Haas, B.J. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen Phytophthora infestans / B.J. Haas, S. Kamoun, M.C. Zody, R.H.Y. Jiang, R.E. Handsaker, L.M. Cano, M. Grabherr, C.D. Kodira, S. Raffaele, T. Torto-Alalibo, T.O. Bozkurt, A.M.V. Ah-Fong, L. Alvarado, V.L. Anderson, M.R. Armstrong, A. Avrova, L. Baxter, J. Beynon, P.C. Boevink, S.R. Bollmann, J.I.B. Bos, V. Bulone, G. Cai, C. Cakir, J.C. Carrington, M. Chawner, L. Conti, S. Costanzo, R. Ewan, N. Fahlgren, M.A. Fischbach, J. Fugelstad, E.M. Gilroy, S. Gnerre, P.J. Green, L.J. Grenville-Briggs, J. Griffith, N.J. Grünwald, Karolyn Horn, N.R. Horner, C.-H. Hu, E. Huitema, D.-H. Jeong, A.M.E. Jones, J.D.G. Jones, R.W. Jones, E.K. Karlsson, S.G. Kunjeti, K. Lamour, Z. Liu, L. Ma, D. MacLean, M.C. Chibucos, H. McDonald, J. McWalters, H.J.G. Meijer, W. Morgan, P.F. Morris, C.A. Munro, K. O'Neill, M. Ospina-Giraldo, A. Pinzón, L. Pritchard, B. Ramsahoye, Q. Ren, S. Restrepo, S. Roy, A. Sadanandom, A. Savidor, S. Schornack, D.C. Schwartz, U.D. Schumann, B. Schwessinger, L. Seyer, T. Sharpe, C. Silvar, J. Song, D.J. Studholme, S. Sykes, M. Thines, P.J.I. van de Vondervoort, V. Phuntumart, S. Wawra, R. Weide, J. Win, C. Young, S. Zhou, W. Fry, B.C. Meyers, P. van West, J. Ristaino, F. Govers, P.R.J. Birch, S.C. Whisson, H.S. Judelson, C. Nusbaum - // Nature. – 2009. – №461(7262). – P. 393.
- 69.Halterman, D.A. Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance / D.A. Halterman, Y. Chen, J. Sopee, J. Berduo-Sandoval, A. Sánchez-Pérez // PLoS One. – 2010. – №5(5). – P. e10536.
- 70.Han, M. Distribution of RXLR effectors Avr3a, Avr4 and IPI-O in *Phytophthora infestans* isolates in China / M. Han // Acta Phytopathologica Sinica. – 2016. – №46(3). – P. 347-356.
- 71.Hansen, E. Using single strand conformational polymorphisms (SSCP) to identify *Phytophthora species* in Oregon forests affected by sudden oak death / E. Hansen, C. Hesse, P. Reeser, W. Sutton, L. Winton // In: Frankel, Susan J.;

Shea, Patrick J.; and Haverty, Michael I., tech. coords. Proceedings of the sudden oak death second science symposium: the state of our knowledge. Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-196. Albany, CA: Pacific Southwest Research Station, Forest Service, US Department of Agriculture: 141-142. – 2006. – №196.

- 72.Haverkort, A.J. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project / A.J. Haverkort, P.M. Boonekamp, R. Hutten, E. Jacobsen, L.A.P. Lotz, G.J.T. Kessel, J.H. Vossen, R.G.F. Visser // Potato Research. 2016. №59(1). P. 35-66.
- 73.Haverkort, A.J. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification / A.J. Haverkort, P.M. Boonekamp, R. Hutten, E. Jacobsen, L.A.P. Lotz, G.J.T. Kessel, R.G.F. Visser, E.A.G. van der Vossen // Potato research. – 2008. – №51(1). – P. 47-57.
- 74.Hijmans, R.J. Geographic distribution of wild potato species / R.J. Hijmans,
 D.M. Spooner // American Journal of Botany. 2001. №88(11). P. 2101-2112.
- 75.Hong, C. *Phytophthora pini* Leonian resurrected to distinct species status / C. Hong, M.E. Gallegly, P.A. Richardson, P. Kong // Mycologia. 2011. №103(2). P. 351-360.
- 76.Hörger, A.C. The structural basis of specific protease–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface / A.C. Hörger, R.A.L. Van der Hoorn // Current opinion in structural biology. – 2013. – №23(6). – P. 842-850.
- 77.Huang, S. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato / S. Huang, E.A.G. Van Der Vossen, H. Kuang, V.G.A.A. Vleeshouwers, N. Zhang, T.J.A. Borm, H.J. Van Eck, B. Baker, E. Jacobsen, R.G.F. Visser // The Plant Journal. 2005. №42(2). P. 251-261.
- 78.Jiang, R.H.Y. Amplification generates modular diversity at an avirulence locus in the pathogen *Phytophthora* / R.H. Jiang, R. Weide, P.J. van de Vondervoort, F. Govers // Genome research. 2006. №16(7). P. 827-840.

- 79.Jiang, R.H.Y. RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members / R.H.Y. Jiang, S. Tripathy, F. Govers, B.M. Tyler // PNAS. – 2008. – №105(12). – P. 4874-4879.
- 80.Jo, K.R. Unveiling and deploying durability of late blight resistance in potato: from natural stacking to cisgenic stacking / Kwang Ryong Jo // Wageningen University. – 2013. – P. 168.
- 81.Jones, J.D.G. The plant immune system / J.D.G. Jones, J. L. Dangl // Nature. 2006. – №444(7117). – P. 323.
- 82.Jupe, F. Identification and localisation of the *NB-LRR* gene family within the potato genome / F. Jupe, L. Pritchard, G.J. Etherington, K. MacKenzie, P.J.A. Cock, F. Wright, S.K. Sharma, D. Bolser, G.J. Bryan, J.D.G. Jones, I. Hein // BMC genomics. 2012. №13(1). P. 75.
- 83.Kakavas, K.V. PCR–SSCP: A method for the molecular analysis of genetic diseases / V.K. Kakavas, P. Plageras, T.A. Vlachos // Molecular biotechnology. - 2008. – №38(2). – P. 155-163.
- 84.Kamoun, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes /S. Kamoun // Eukaryotic cell. – 2003. – №2(2). – P. 191-199.
- 85.Karasov, T.L. Genomic variability as a driver of plant–pathogen coevolution? / T.L. Karasov, M.W. Horton, J. Bergelson // Current opinion in plant biology. 2014. №18. P. 24-30.
- 86.Kiiker, R. Outcome of sexual reproduction in the *Phytophthora infestans* population in Estonian potato fields / R. Kiiker, M. Hansen, I.H. Williams, D.E.L. Cooke, E. Runno-Paurson // European Journal of Plant Pathology. 2018. P. 1-13.
- 87.Kim, H.J. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes / H.-J. Kim, H.-R. Lee, K.-R. Jo, S.M. Mahdi, M. Dirk, J. Huigen, B. Evenhuis, G. Kessel, R.

Visser, E. Jacobsen, J.H. Vossen // Theor. Appl. Genet. – 2012. – №124(5). – P. 923-935.

- 88.Knaus, B. Genome-wide increased copy number is associated with emergence of super-fit clones of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* / B. Knaus, J. Tabima, S. Shakya, H. Judelson, N. Grunwald // bioRxiv. 2019. P. 633701.
- 89.Kong, P. Rapid identification of *Phytophthora ramorum* using PCR-SSCP analysis of ribosomal DNA ITS-1 / P. Kong, C.X. Hong, P.W. Tooley, K. Ivors, M. Garbelotto, P.A. Richardson // Letters in Applied Microbiology. 2004. №38(5). P. 433-439.
- 90.Kong, P. Single-strand-conformation polymorphism of ribosomal DNA for rapid species differentiation in genus *Phytophthora* / P. Kong, C. Hong, P.A. Richardson, M.E. Gallegly // Fungal Genetics and Biology. – 2003. – №39(3). – P. 238-249.
- 91.Kröner, A. The level of specialization of *Phytophthora infestans* to potato and tomato is a biotrophy-related, stable trait / A. Kröner, R. Mabon, R. Corbière, J. Montarry, D. Andrivon // bioRxiv. – 2019. – P. 571596.
- 92.Lamour, K.H. Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici* / K.H. Lamour, J. Mudge, D. Gobena, O.P. Hurtado-Gonzales, J. Schmutz, A. Kuo, N.A. Miller, B.J. Rice, S. Raffaele, L.M. Cano, A.K. Bharti, R.S. Donahoo, S. Finley, E. Huitema, J. Hulvey, D. Platt, A. Salamov, A. Savidor, R. Sharma, R. Stam, D. Storey, M. Thines, J. Win, B.J. Haas, D.L. Dinwiddie, J. Jenkins, J.R. Knight, J.P. Affourtit, C.S. Han, O. Chertkov, E.A. Lindquist, C. Detter, I.V. Grigoriev, S. Kamoun, S.F. Kingsmore // MPMI. 2012. №25(10). P. 1350-1360.
- 93.Lamour, K.H. Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions and research tools / K.H. Lamour, S. Kamoun // John Wiley & Sons. 2009.
- 94.Lee, H.A. Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner / H.A. Lee, S.I. Yeom // Briefings in functional genomics. – 2015. – №14(4). – P. 233-242.
- 95.Li G. Cloning and characterization of *R3b*; members of the *R3* superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence / // MPMI. 2011. №24. №. 10. P. 1132-1142.
- 96.Li, Q. A *Phytophthora sojae* effector PsCRN63 forms homo-/hetero-dimers to suppress plant immunity via an inverted association manner / Q. Li, M. Zhang, D. Shen, T. Liu, Y. Chen, J.M. Zhou, D. Dou // Scientific reports. 2016. Nº6. P. 26951.
- 97.Li, Y. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* / Y. Li, D.E.L. Cooke, E. Jacobsen,T. van der Lee. // Journal of microbiological methods. – 2013. – №92(3). – P. 316-322
- 98.Li, Y. Population structure of *Phytophthora infestans* in China–geographic clusters and presence of the EU genotype Blue_13 / Y. Li, T. van der Lee, J.H. Zhu, G.H. Jin, C.Z. Lan, S.X. Zhu, R.F. Zhang, B.W. Liu, Z.J. Zhao, G. Kessel, S.W. Huang, E. Jacobsen // Plant Pathology. 2013. №62(4). P. 932-942.
- 99.Lin, K. Single nucleus genome sequencing reveals high similarity among nuclei of an endomycorrhizal fungus / K. Lin, E. Limpens, Z. Zhang, S. Ivanov, D.G. O. Saunders, D. Mu, E. Pang, H. Cao, H. Cha, T. Lin, Q. Zhou, Y. Shang, Y. Li, T. Sharma, R. van Velzen, N. de Ruijter, D.K. Aanen, J. Win, S. Kamoun, T. Bisseling, R. Geurts, S. Huang // PLoS genetics. 2014. №10(1). P. e1004078.
- Liu, L. Arms race: diverse effector proteins with conserved motifs / L. Liu,
 L. Xu, Q. Jia, R. Pan, R. Oelmüller, W. Zhang, C. Wu // Plant signaling & behavior. 2019. P. 1-18.
- 101. Lo Presti, L. Fungal effectors and plant susceptibility / L. Lo Presti, D. Lanver, G. Schweizer, S. Tanaka, L. Liang, M. Tollot, A. Zuccaro, S.

Reissmann, R. Kahmann // Annual review of plant biology. – 2015. – №66. – P. 513-545.

- 102. Lokossou, A.A. Exploiting knowledge of *R*/*Avr* genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV / A.A. Lokossou, T.-H. Park, G. van Arkel, M. Arens, C. Ruyter-Spira, J. Morales, S.C. Whisson, P.R.J. Birch, R.G.F. Visser, E. Jacobsen, E.A.G. van der Vossen // MPMI. 2009. №22(6). P. 630-641.
- 103. Lu, S. Intracellular and extracellular phosphatidylinositol 3-phosphate produced by *Phytophthora* species is important for infection / S. Lu, L. Chen, K. Tao, N. Sun, Y. Wu, X. Lu, Y. Wang, D. Dou // Molecular plant. 2013. №6(5). P. 1592-1604.
- 104. Malcolmson, J.F. New *R* genes in *Solanum demissum* Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary / J.F. Malcolmson, W. Black // Euphytica. 1966. №15(2). P. 199-203.
- 105. Martin, F.N. Evaluation of molecular markers for *Phytophthora ramorum* detection and identification: testing for specificity using a standardized library of isolates / F.N. Martin, M.D. Coffey, K. Zeller, R.C. Hamelin, P. Tooley, M. Garbelotto, K.J.D. Hughes, T. Kubisiak, G.J. Bilodeau, L. Levy, C. Blomquist, P.H. Berger // Phytopathology. 2009. №99(4). P. 390-403.
- 106. Martin, F.N. Insights into evolving global populations of *Phytophthora infestans* via new complementary mtDNA haplotype markers and nuclear SSRs / F.N. Martin, Y. Zhang, D.E.L. Cooke, M.D. Coffey, N.J. Grünwald, W.E. Fry // PloS One. – 2019. – №14(1). – P. e0208606.
- 107. Martin, F.N. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora* / F.N. Martin, J.E. Blair, M.D. Coffey // Fungal Genetics and Biology. – 2014. – №66. – P. 19-32.
- 108. Mazakova, J. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Czech Republic / J. Mazáková,

V. Taborsky, M. Zouhar, P. Rysanek, E. Hausvater, P. Dolezal // Plant Protection Science-UZPI (Czech Republic). – 2006. – №42(2). – P. 41-48.

- 109. McDonald, M.C. The discovery of the virulence gene *ToxA* in the wheat and barley pathogen *Bipolaris sorokiniana* / M.C. McDonald, D. Ahren, S. Simpfendorfer, A. Milgate, P.S. Solomon // Molecular plant pathology. – 2018. – №19(2). – P. 432-439.
- Meng, S. Common processes in pathogenesis by fungal and oomycete plant pathogens, described with Gene Ontology terms / S. Meng, T. Torto-Alalibo, M.C. Chibucos, B.M. Tyler, R.A. Dean // BMC microbiology. 2009. №9(1). P. S7.
- 111. Menounos, P.G. Mutation detection by Single Strand Conformation Polymorphism and Heteroduplex analysis / P.G. Menounos, G.P. Patrinos // Molecular Diagnostics. – Academic Press, 2010. – P. 45-58.
- 112. Mideros, M.F. *Phytophthora betacei*, a new species within *Phytophthora* clade 1c causing late blight on *Solanum betaceum* in Colombia / M.F. Mideros, D.A. Turissini, N. Guayazán, H. Ibarra-Avila, G. Danies, M. Cárdenas, K. Myers, J. Tabima, E.M. Goss, L.E. Lagos, A. Grajales, L.N. Gonzalez, D.E.L. Cooke, W.E. Fry, N. Grünwald, D.R. Matute, S. Restrepo // Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi. 2018. №41. P. 39.
- Möller, M. Evolution and genome architecture in fungal plant pathogens /
 M. Möller, E.H. Stukenbrock // Nature Reviews Microbiology. 2017. –
 №15(12). P. 756.
- 114. Musić, M.Š. Single-Strand Conformation Polymorphism analysis for differentiating *Phytoplasma* strains / M.Š. Musić, D. Škorić // Phytoplasma. – Humana Press, Totowa, NJ. – 2013. – P. 217-222.
- 115. Nahiyan, A.S.M. PCR-SSCP analysis of *Fusarium* diversity in asparagus decline in Japan / A.S.M. Nahiyan, L.R. Boyer, P. Jeffries, Y.I. Matsubara // European journal of plant pathology. 2011. №130(2). P. 197-203.

- 116. Nielsen, M.E. Arabidopsis ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1 / M.E. Nielsen, A. Feechan, H. Böhlenius, T. Ueda, H. Thordal-Christensen // PNAS. – 2012. – №109(28). – P. 11443-11448.
- 117. Oh, S.K. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2 / S.-K. Oh, C. Young, M. Lee, R. Oliva, T.O. Bozkurt, L.M. Cano, J. Win, J.I.B. Bos, H.-Y. Liu, M. van Damme, W. Morgan, D. Choi, E.A.G. Van der Vossen, V.G.A.A. Vleeshouwers, S. Kamoun // The Plant Cell. 2009. №21(9). P. 2928-2947.
- 118. Oh, S.K. Oomycetes RXLR effectors function as both activator and suppressor of plant immunity / S.K Oh, S. Kamoun, D. Choi // The Plant Pathology Journal. – 2010. – №26(3). – P. 209-215.
- 119. Oliva, R.F. A recent expansion of the RXLR effector gene Avrblb2 is maintained in global populations of *Phytophthora infestans* indicating different contributions to virulence / R.F. Oliva, L.M. Cano, S. Raffaele, J. Win, T.O. Bozkurt, K. Belhaj, S.-K. Oh, M. Thines, S. Kamoun // MPMI. 2015. №28(8). P. 901-912.
- 120. Oliva, R.F. *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands / R.F. Oliva, L. Kroon, G. Chacón, W.G. Flier, J.B. Ristaino, G.A. Forbes // Plant Pathology. 2010. №59(4). P. 613-625.
- 121. Pankin, A.A. Are simple *Phytophthora infestans* races really that simple? / A.A. Pankin, E.A. Kinash, I.N. Kozlovskaya, M.A. Kuznetsova, E.E. Khavkin // Special Report No. 15. 2012. P. 205.
- 122. Paquin, B. The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression / B. Paquin, M.J. Laforest, L. Forget, I. Roewer, Z. Wang, J. Longcore, B.F. Lang // Current genetics. 1997. №31(5). P. 380-395.

- 123. Pel, M.A. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato / Mathieu A. Pel // Wageningen University. – 2010. – 210 c.
- 124. Peterson, I. Genotypic and phenotypic variation of *Phytopthora infestans* on potato in the two Swedish regions Bjäre and Östergötland in 2015 / Ida Peterson // Swedish University of Agricultural Sciences. – 2016. – P. 55.
- 125. Pieterse, C.M.J. Structure and genomic organization of the *ipiB* and *ipiO* gene clusters of *Phytophthora infestans* / C.M.J. Pieterse, P. van West, H.M. Verbakel, P.W. Brassé, G.C. van den Berg-Velthuis, F. Govers // Gene. 1994. №138(1). P. 67-77.
- 126. Plissonneau, C. Using population and comparative genomics to understand the genetic basis of effector-driven fungal pathogen evolution / C. Plissonneau, J. Benevenuto, N. Mohd-Assaad, S. Fouché, F.E. Hartmann, D. Croll // Frontiers in plant science. 2017. №8. P. 119.
- 127. Pritchard. L. The zigzag model of plant-microbe interactions: is it time to move on? / L. Pritchard, P.R.J. Birch // Molecular plant pathology. 2014. №15(9). P. 865-870.
- 128. Qiao, Y. Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors / Y. Qiao,
 L. Liu, Q. Xiong, C. Flores, J. Wong, J. Shi, X. Wang, X. Liu, Q. Xiang, S. Jiang, F. Zhang, Y. Wang, H.S Judelson, X. Chen, W. Ma // Nature genetics. 2013. №45(3). P. 330.
- 129. Qutob, D. Copy number variation and transcriptional polymorphisms of *Phytophthora sojae* RXLR effector genes *Avr1a* and *Avr3a* / D. Qutob, J. Tedman-Jones, S. Dong, K. Kuflu, H. Pham, Y. Wang, D. Dou, S.D. Kale, F.D. Arredondo, B.M. Tyler, M. Gijzen // PloS One. 2009. №4(4). P. e5066.
- Raffaele, S. Genome evolution following host jumps in the Irish potato famine pathogen lineage / S. Raffaele1, R.A. Farrer, L.M. Cano, D.J. Studholme, D. MacLean, M. Thines, R.H.Y. Jiang, M.C. Zody, S.G. Kunjeti,

N.M. Donofrio, B.C. Meyers, C. Nusbaum, S. Kamoun // Science. – 2010. – №330(6010). – P. 1540-1543.

- 131. Raffaele, S. Genome evolution in filamentous plant pathogens: why bigger can be better / S. Raffaele, S. Kamoun // Nature Reviews Microbiology. 2012.
 №10(6). P. 417.
- 132. Rajatileka, S. Detection of three closely located single nucleotide polymorphisms in the EAAT2 promoter: comparison of single-strand conformational polymorphism (SSCP), pyrosequencing and Sanger sequencing / S. Rajatileka, K. Luyt, M. Williams, D. Harding, D. Odd, E. Molnár, A. Varadi // BMC genetics. 2014. №15(1). P. 80.
- 133. Ramirez-Garcés, D. CRN 13 candidate effectors from plant and animal eukaryotic pathogens are DNA-binding proteins which trigger host DNA damage response / D. Ramirez- Garcés, L. Camborde, M.J.C. Pel, A. Jauneau, Y. Martinez, I. Néant, C. Leclerc, M. Moreau, B. Dumas, E. Gaulin // New Phytologist. 2016. №210(2). P. 602-617.
- 134. Rietman, H. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors / H. Rietman, G. Bijsterbosch, L.M. Cano, H.-R. Lee, J.H. Vossen, E. Jacobsen, R.G.F. Visser, S. Kamoun, V.G.A.A. Vleeshouwers // MPMI. 2012. №25. №. 7. P. 910-919.
- 135. Rietman, H. Putting the *Phytophthora infestans* genome sequence at work: Multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed / Hendrik Rietman // Wageningen University. – 2011. – P. 169.
- 136. Rodewald, J. Solanum resistance genes against Phytophthora infestans and their corresponding avirulence genes / J. Rodewald, B. Trognitz // Molecular plant pathology. – 2013. – №14(7). – P. 740-757.
- 137. Rodríguez, F. Asymmetric single -strand conformation polymorphism: An accurate and cost effective method to amplify and sequence allelic variants / F.

Rodríguez, D. Cai, Y. Teng, D. Spooner // American journal of botany. – 2011. – №98(7). – P. 1061-1067.

- 138. Rouxel, T. Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations / T. Rouxel, J. Grandaubert, J.K. Hane, C. Hoede, A.P. van de Wouw, A. Couloux, V. Dominguez, V. Anthouard, P. Bally, S. Bourras, A.J. Cozijnsen, L.M. Ciuffetti, A. Degrave, A. Dilmaghani, L. Duret, I. Fudal, S.B. Goodwin, L. Gout, N. Glaser, J. Linglin, G.H.J. Kema, N. Lapalu, C.B. Lawrence, K. May, M. Meyer, B. Ollivier, J. Poulain, C.L. Schoch, A. Simon, J.W. Spatafora, A. Stachowiak, B.G. Turgeon, B.M. Tyler, D. Vincent, J. Weissenbach, J. Amselem, H. Quesneville, R.P. Oliver, P. Wincker, M.-H. Balesdent, B.J. Howlett // Nature communications. 2011. №2. P. 202.
- 139. Sánchez-Vallet, A. The battle for chitin recognition in plant-microbe interactions / A. Sánchez-Vallet, J.R. Mesters, B.P.H.J. Thomma // FEMS microbiology reviews. – 2015. – №39(2). – P. 171-183.
- 140. Saunders, D.G.O. Host protein BSL1 associates with *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR2 and the *Solanum demissum* immune receptor R2 to mediate disease resistance / D.G.O. Saunders, S. Breen, J. Win, S. Schornack, I. Hein, T.O. Bozkurt, N. Champouret, V.G.A.A. Vleeshouwers, P.R.J. Birch, E.M. Gilroy, S. Kamoun // The Plant Cell. – 2012. – P. 3420-3434.
- 141. Savory, F. The role of horizontal gene transfer in the evolution of the oomycetes / F. Savory, G. Leonard, T.A. Richards // PLoS pathogens. 2015. №11(5). P. e1004805.
- Schmoll, M. The genomes of three uneven siblings: footprints of the lifestyles of three *Trichoderma species* / M. Schmoll, C. Dattenböck, N. Carreras-Villaseñor, A. Mendoza-Mendoza, D. Tisch, M.I. Alemán, S.E. Baker, C. Brown, M.G. Cervantes-Badillo, J. Cetz-Chel, G.R. Cristobal-Mondragon, L. Delaye, E.U. Esquivel-Naranjo, A. Frischmann, J. de J. Gallardo-Negrete, M. García-Esquivel, E.Y. Gomez-Rodriguez, D.R. Greenwood, M. Hernández-

Oñate, J.S. Kruszewska, R. Lawry, H.M. Mora-Montes, T. Muñoz-Centeno, M.F. Nieto-Jacobo, G.N. Lopez, V. Olmedo-Monfil, M. Osorio-Concepcion, S. Piłsyk, K.R. Pomraning, A. Rodriguez-Iglesias, M.T. Rosales-Saavedra, J.A. Sánchez-Arreguín, V. Seidl-Seiboth, A. Stewart, E.E. Uresti-Rivera, C.-L. Wang, T.-F. Wang, S. Zeilinger, S. Casas-Flores, A. Herrera-Estrella // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2016. – №80(1). – P. 205-327.

- 143. Scoggan, K.A. Single-strand conformational polymorphism analysis (SSCP) and sequencing for ion channel gene mutations / K.A Scoggan, D.E. Bulman // Neurogenetics. – Springer, Totowa, NJ, 2003. – P. 143-151.
- 144. Selin, C. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges / C. Selin, T.R. de Kievit, M.F. Belmonte, W.G. Fernando // Frontiers in microbiology. – 2016. – №7. – P. 600.
- 145. Seman, Z.A. A functional study of the *Phytophthora infestans Avr3a* alleles and paralogs/ Zulkifli Ahmad Seman // University of Dundee. 2013. P. 149.
- 146. Shen, C. Uncovering SNP and indel variations of tetraploid cottons by SLAF-seq / C. Shen, X. Jin, D. Zhu, Z. Lin // BMC genomics. 2017. №18(1). P. 247.
- 147. Śliwka, J. The novel, major locus *Rpi-phu1* for late blight resistance maps to potato chromosome IX and is not correlated with long vegetation period / J. Śliwka, H. Jakuczun, R. Lebecka, W. Marczewski, C. Gebhardt, E. Zimnoch-Guzowska // Theor. Appl. Genet. 2006. №113(4). P. 685-695.
- 148. Sokolova, E.A. Pathogenecity of East European strains of *Phytophthora infestans* vs. resistance of colonized potato plants: the profiles of *AVR* genes vs. *R* gene pyramids/ E.A. Sokolova, M.A. Kuznetsova, T.I. Ulanova, A.N. Rogozhin, T.I. Smetanina, V.N. Demidova, M.P. Beketova, O.P. Malyuchenko, Ya. I. Alekseev, E.V. Rogozina, E.E. Khavkin // In: Schepers HTAM, (ed.) PAGV Special Report no. 18. Wageningen. 2017. P. 259-267.

- 149. Spooner, D.M. A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping / D.M. Spooner, K. McLean, G. Ramsay, R. Waugh, G.J. Bryan // PNAS. – 2005. – №102(41). – P. 14694-14699.
- 150. Stahl, E.A. Dynamics of disease resistance polymorphism at the *Rpm1* locus of *Arabidopsis* / E.A. Stahl, G. Dwyer, R. Mauricio, M. Kreitman, J. Bergelson // Nature. 1999. №400(6745). P. 667.
- 151. Statsyuk, N.V. Characterization of Russian *Phytophthora infestans* populations: DNA fingerprinting and SSR analysis / N.V. Statsyuk, Yu.V. Semina, F.G.M. Perez, M. Larsen, M.A. Kuznetsova, I.N. Kozlovskaya, E.V. Morozova, K.L. Deahl, N.J. Grunwald // PPO-Special Report. 2014. №. 16. P. 255-266.
- 152. Stefańczyk, E. Diversity of Avr-vnt1 and AvrSmira1 effector genes in Polish and Norwegian populations of Phytophthora infestans / E. Stefańczyk, M. Brylińska, M.B. Brurberg, R. Naerstad, A. Elameen, S. Sobkowiak, J. Śliwka // Plant Pathology. – 2018. – №67(8). – P. 1792-1802.
- 153. Stefańczyk, E. Expression of the potato late blight resistance gene *Rpi-phu1* and *Phytophthora infestans* effectors in the compatible and incompatible interactions in potato / E. Stefańczyk, M. Brylińska, S. Sobkowiak, J. Śliwka // Phytopathology. – 2017. – №107(6). – P. 740-748.
- 154. Stiller, J.W. Are algal genes in nonphotosynthetic protists evidence of historical plastid endosymbioses? / J.W. Stiller, J. Huang, Q. Ding, J. Tian, C. Goodwillie // BMC genomics. – 2009. – №10(1). – P. 484.
- 155. Stukenbrock, E.H. Hybridization speeds up the emergence and evolution of a new pathogen species / E.H. Stukenbrock // Nature genetics. 2016. №48(2). P. 113.
- 156. Sun, F. Structural basis for interactions of the *Phytophthora sojae* RxLR effector Avh5 with phosphatidylinositol 3-phosphate and for host cell entry / F.

Sun, S.D. Kale, H.F. Azurmendi, D. Li, B.M. Tyler, D.G.S. Capelluto // MPMI. – 2013. – №26(3). – P. 330-344.

- 157. Sunnucks, P. SSCP is not so difficult: the application and utility of singlestranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology / P. Sunnucks, A.C.C. Wilson, L.B. Beheregaray, K. Zenger, J. French, A.C. Taylor // Molecular ecology. – 2000. – №9(11). – P. 1699-1710.
- 158. Takken, F.L.W. How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function / F.L.W. Takken, A. Goverse // Current opinion in plant biology. - 2012. – №15(4). – P. 375-384.
- 159. Tameling, W.I.L. Resistance proteins: scouts of the plant innate immune system / W.I.L. Tameling, F.L.W. Takken // Sustainable disease management in a European context. – Springer, Dordrecht. – 2007. – P. 243-255.
- 160. Thines, M. Oomycete–plant coevolution: recent advances and future prospects / M. Thines, S. Kamoun // Current opinion in plant biology. – 2010. – №13(4). – P. 427-433.
- 161. Torto, T.A. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora* / T.A. Torto, S. Li, A. Styer, E. Huitema, A. Testa, N.A.R. Gow, P. van West, S. Kamoun // Genome research. – 2003. – №13(7). – P. 1675-1685.
- 162. Toruño, T.Y. Plant-pathogen effectors: cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners / T.Y. Toruño, I. Stergiopoulos, G. Coaker // Annu. Rev. Phytopathol. – 2016. – №54. – P. 419-441.
- 163. Turnbull, D. RXLR effector AVR2 up-regulates a brassinosteroid responsive bHLH transcription factor to suppress immunity / D. Turnbull, L. Yang, S. Naqvi, S. Breen, L. Welsh, J. Stephens, J. Morris, P.C. Boevink, P.E. Hedley, J. Zhan, P.R.J. Birch, E.M. Gilroy // Plant physiology. – 2017. – P. 01804.2016.
- 164. Tyler, B.M. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis / B.M. Tyler, S. Tripathy, X. Zhang, P. Dehal, R.H.Y. Jiang, A. Aerts, F.D. Arredondo, L. Baxter, D. Bensasson, J.L. Beynon,

J. Chapman, C.M.B. Damasceno, A.E. Dorrance, D. Dou, A.W. Dickerman, I.L. Dubchak, M. Garbelotto, M. Gijzen, S.G. Gordon, F. Govers, N.J. Grunwald, W. Huang, K.L. Ivors, R.W. Jones, S. Kamoun, K. Krampis, K.H. Lamour, M.-K. Lee, W.H. McDonald, M. Medina, H.J.G. Meijer, E.K. Nordberg, D.J. Maclean, M.D. Ospina-Giraldo, P.F. Morris, V. Phuntumart, N.H. Putnam, S. Rash, J.K.C. Rose, Y. Sakihama, A.A. Salamov, A. Savidor, C.F. Scheuring, B.M. Smith, B.W.S. Sobral, A. Terry, T.A. Torto-Alalibo, J. Win, Z. Xu, H. Zhang, I.V. Grigoriev, D.S. Rokhsar, J.L. Boore // Science. – 2006. – №313(5791). – P. 1261-1266.

- 165. van Damme, M. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* translocates the CRN8 kinase into host plant cells / M. van Damme, T.O. Bozkurt, C. Cakir, S. Schornack, J. Sklenar, A.M.E. Jones, S. Kamoun // PLoS pathogens. 2012. №8(8). P. e1002875.
- 166. van de Wouw, A.P. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management / A.P. Van de Wouw, A. Idnurm // Biotechnology advances. – 2019.
- 167. van der Lee, T. High-density genetic linkage maps of *Phytophthora infestans* reveal trisomic progeny and chromosomal rearrangements / T. van der Lee, A. Testa, A. Robold, J. van't Klooster, F. Govers // Genetics. – 2004. – №167(4). – P. 1643-1661.
- 168. van der Lee, T. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis / T. van der Lee, A. Testa, A. Robold, J. van't Klooster, F. Govers // Genetics. – 2001. – №157(3). – P. 949-956.
- 169. van der Vossen, E. An ancient *R* gene from the wild potato species *Solanum* bulbocastanum confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato / E. Van Der Vossen, A. Sikkema, B. te L. Hekkert, J. Gros, P. Stevens, M. Muskens, D. Wouters, A. Pereira, W. Stiekema, S. Allefs // The Plant Journal. 2003. №36(6). P. 867-882.

- 170. van Ooijen, G. Structure and function of resistance proteins in solanaceous plants / G. van Ooijen, H.A. van den Burg, B.J.C. Cornelissen, F.L.W. Takken // Annu. Rev. Phytopathol. 2007. №45. P. 43-72.
- 171. van Poppel, P.M.J.A. Recognition of *Phytophthora infestans* Avr4 by potato R4 is triggered by C-terminal domains comprising W motifs / P.M.J.A. van Poppel, R.H.Y. Jiang, J. Śliwka, F. Govers // Molecular plant pathology. 2009. №10(5). P. 611-620.
- 172. van Poppel, P.M.J.A. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector / P.M.J.A. van Poppel, J. Guo, P.J.I. van de Vondervoort, M.W.M. Jung, P.R.J. Birch, S.C. Whisson, F. Govers // MPMI. 2008. №21(11). P. 1460-1470.
- 173. Vleeshouwers, V.G.A.A. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes / V.G.A.A. Vleeshouwers, H. Rietman, P. Krenek, N. Champouret, C. Young, S.K. Oh, M. Wang, K. Bouwmeester, B. Vosman, R.G.F. Visser, E. Jacobsen, F. Govers, S. Kamoun, E.A.G. van der Vossen // PLoS One. 2008. №3(8). P. e2875.
- 174. Vleeshouwers, V.G.A.A. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens / V.G.A.A. Vleeshouwers, R.P. Oliver // MPMI. – 2014. – №27(3). – P. 196-206.
- 175. Wang, H. The cell death triggered by the nuclear localized RxLR effector PITG_22798 from *Phytophthora infestans* is suppressed by the effector AVR3b / H. Wang, Y. Ren, J. Zhou, J. Du, J. Hou, R. Jiang, H. Wang, Z. Tian, C. Xie // International journal of molecular sciences. 2017. №18(2). P. 409.
- 176. Wang, S. *Phytophthora infestans* RXLR effectors act in concert at diverse subcellular locations to enhance host colonization / S. Wang, H. McLellan, T. Bukharova, Q. He, F. Murphy, J. Shi, S. Sun, P. van Weymers, Y. Ren, G. Thilliez, H. Wang, X. Chen, S. Engelhardt, V. Vleeshouwers, E.M. Gilroy, S.C.

Whisson, I. Hein, X. Wang, Z. Tian, P.R.J. Birch, P.C. Boevink // Journal of experimental botany. -2018. $-N_{2}70(1)$. -P. 343-356.

- 177. Wang, J. Reconstitution and structure of a plant NLR resistosome conferring immunity / J. Wang, M. Hu, J. Wang, J. Qi, Z. Han, G. Wang, Y. Qi, H.-W. Wang, J.-M. Zhou, J. Chai // Science. 2019. №364(6435). P. eaav5870.
- 178. Wawra, S. Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins /
 S. Wawra, R. Belmonte, L. Löbach, M. Saraiva, A. Willems, P. van West //
 Current opinion in microbiology. 2012. №15(6). P. 685-691.
- 179. Wawra, S. The RxLR motif of the host targeting effector AVR3a of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion / S. Wawra, F. Trusch, A. Matena, K. Apostolakis, U. Linne, I. Zhukov, J. Stanek, W. Koźmiński, I. Davidson, C.J. Secombes, P. Bayer, P. van West // The Plant Cell. 2017. №29(6). P. 1184-1195.
- 180. Weiberg, A. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways / A. Weiberg, M. Wang, F.M. Lin, H. Zhao, Z. Zhang, I. Kaloshian, H.D. Huang, H. Jin // Science. – 2013. – №342(6154). – P. 118-123.
- 181. Whisson, S.C. The cell biology of late blight disease / S.CWhisson, P.C. Boevink, S. Wang, P.R.J. Birch // Current Opinion in Microbiology. 2016. №34. P. 127-135.
- 182. Win, J. Adaptive evolution has targeted the C-terminal domain of the RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes / J. Win, W. Morgan, J. Bos, K.V. Krasileva, L.M. Cano, A. Chaparro-Garcia, R. Ammar, B.J. Staskawicz, S. Kamoun // The Plant Cell. 2007. №19(8). P. 2349-2369.
- 183. Witek, K. Accelerated cloning of a potato late blight–resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing / K. Witek, F. Jupe, A.I Witek, D. Baker, M.D Clark, J.D.G. Jones // Nature Biotechnology. – 2016. – №34(6). – P. 656.

- 184. Wong, J.Y.P. Diversity of pathogenic *Fusarium* populations associated with asparagus roots in decline soils in Spain and the UK / J.Y. Wong, P. Jeffries // Plant pathology. 2006. №55(3). P. 331-342.
- 185. Yang, D.H. The multifaceted function of BAK1/SERK3: plant immunity to pathogens and responses 1 to insect herbivores / D.H. Yang, C. Hettenhausen, I.T. Baldwin, J. Wu // Plant Signaling & Behavior. – 2011. – №6(9). – P. 1322-1324.
- 186. Yang, L. Evidence for intragenic recombination and selective sweep in an effector gene of *Phytophthora infestans* / L. Yang, H.- B. Ouyang, Z.- G. Fang, W. Zhu, E- J. Wu, G.- H. Luo, L.- P. Shang, J. Zhan // Evolutionary applications. 2018. №11(8). P. 1342-1353.
- 187. Ye, M.H. Sensitivity and specificity of high-resolution melting analysis in screening unknown SNPs and genotyping a known mutation / M.H. Ye, J.L. Chen, G.P. Zhao, M.Q. Zheng, J. Wen // Animal Science Papers and Reports. 2010. №28(2). P. 161-170.
- 188. Yin, J. Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense / J. Yin, B. Gu, G. Huang, Y. Tian, J. Quan, H. Lindqvist-Kreuze, W. Shan // Frontiers in plant science. – 2017. – №8. – P. 2155.
- 189. Zhang, D. Transposons to toxins: the provenance, architecture and diversification of a widespread class of eukaryotic effectors / D. Zhang, A.M. Burroughs, N.D. Vidal, L.M. Iyer, L. Aravind // Nucleic acids research. 2016. №44(8). P. 3513-3533.
- 190. Zhu, S. An updated conventional-and a novel GM potato late blight *R* gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans* / S. Zhu, J.H. Vossen, M. Bergervoet M. Nijenhuis, L. Kodde, G.J.T. Kessel, V. Vleeshouwers, R.G.F. Visser, E. Jacobsen // Euphytica. 2015. №202(2). P. 219-234.