

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИАЛОГ РАСТЕНИЙ С ПАТОГЕНАМИ: ЭВОЛЮЦИЯ, МЕХАНИЗМЫ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

© 2021 г. Э. Е. Хавкин^а, *

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки,
Институт сельскохозяйственной биотехнологии Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: emil.khavkin@gmail.com

Поступила в редакцию 23.06.2020 г.

После доработки 24.06.2020 г.

Принята к публикации 26.06.2020 г.

Болезни растений повсеместно угрожают устойчивости сельского хозяйства. С точки зрения экономики и экологии наиболее эффективным способом борьбы с болезнями является создание новых сортов растений с долговременной и стабильной устойчивостью. Успеху в решении этой задачи в последние годы немало способствовали поразительные достижения в изучении патогенов и растений-хозяев, которые во многом опираются на новейшие методы исследования строения и активности генов, в первую очередь, “омик” технологии. Эти достижения наглядно представлены в случае фитофтороза — экономически наиболее значимой болезни картофеля и томатов (*Solanum* L.). Фитофтороз часто служит моделью многомерных взаимодействий растений с микроорганизмами, и результаты новых исследований существенно меняют наши общие представления о молекулярном диалоге растения с патогеном и наши подходы к борьбе с болезнями. В этом обзоре основное внимание сосредоточено на геноме возбудителя болезни — оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и уже охарактеризованных генах вирулентности. Эволюция этого генома определяет исключительную генетическую и фенотипическую пластичность патогена. Особого внимания заслуживают сами орудия вирулентности — эффекторы, которые взаимодействуют с молекулами-мишенями картофеля, воздействуя на физиологию растения и способствуя его колонизации патогеном. Обращаясь к преградам, выстроенным растением для защиты от болезни, автор рассматривает полиморфизм и эволюцию генов *Solanum*, определяющих устойчивость картофеля к *P. infestans*. Репертуар генов вирулентности *P. infestans* в агроценозах и разнообразие генов устойчивости у дикорастущих сородичей картофеля анализируются в связи с практическим применением результатов новых молекулярных исследований фитофтороза. При многоплановом подходе к этой проблеме поиски новых генов устойчивости в генетических коллекциях, определение их функций и пирамидирование этих генов в сортах картофеля с целью создать новые доноры долговременной устойчивости сочетаются с оперативным анализом генов вирулентности патогена.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, виды *Solanum*, иммунитет растений, фитофтороз, картофель, долговременная устойчивость, взаимоотношения патогена с растением-хозяином, гены вирулентности, гены устойчивости, эволюция, секвенирование геномов и транскриптомов

DOI: 10.31857/S001533032102007X

ВВЕДЕНИЕ

Во всем мире болезни растений постоянно бросают вызов устойчивому земледелию. С точки

зрения экономики и экологии наиболее эффективным способом борьбы с болезнями является создание новых сортов растений с долговременной и стабильной устойчивостью. Устойчивость можно эмпирически определить как долговременную и стабильную (durable), если она сохраняется на высоком уровне при длительном возделывании культуры на значительной территории и в условиях, благоприятных для развития болезни. Различение “свой — чужой” — это ключ к реакции растений на вторжение патогена. В дарвиновской парадигме коэволюцию двух участников взаимодействия патогена с растением-хозяином при естественном отборе в ненарушенной природной среде можно сравнивать с процессами селекции растений в нарушенной среде агроценозов. В обоих случаях мы наблюдаем дорогостоящий

Сокращения: GM — генетическая модификация; AFLP — Amplified Fragment Length Polymorphism; Avr — Avirulence; CC-NB-LRR — Coiled Coil — Nucleotide Binding — Leucine Rich Repeat; dRenSeq — diagnostic Resistance gene enrichment Sequencing; ETI — Effector Triggered Immunity; HR — Hypersensitive Response; MAMP — Microbe Associated Molecular Pattern; NGS — next generation sequencing; PAMP — Pathogen Associated Molecular Pattern; PenSeq — Pathogen target enrichment Sequencing; PR proteins — pathogenesis-related proteins; PTI — PAMP-Triggered Immunity; QTL — Quantitative Trait Locus; RenSeq — Resistance gene enrichment Sequencing; RGA — Resistance Gene Analogue; RLK — Receptor-Like Kinase; Rpi — Resistance to *Phytophthora infestans*; RXLR — arginine-any amino acid-leucine-arginine motif; SNP — Single Nucleotide Polymorphism.

отбор (high fitness cost) — у патогена на вирулентность, а у растений на высокую устойчивость [1, 2]. Молекулярные исследования последних лет значительно углубили наше видение взаимодействия растений и патогенов, столь важного для эффективного контроля болезней. Поэтому выяснение генетических связей и молекулярных механизмов вирулентности и устойчивости необходимо для успешной селекции на долговременную устойчивость к болезням.

В последние годы успехам в создании долговременной устойчивости немало способствовали поразительные достижения в изучении патогенов и растений-хозяев, которые во многом опираются на новейшие методы исследования строения и активности генов, в первую очередь, “омик” технологии. Успехи этих исследований наглядно представлены в случае фитофтороза — экономически наиболее важной болезни картофеля и томатов (возбудитель — оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary). Фитофтороз часто служит моделью многоярусного взаимодействия растений с микроорганизмами, и результаты новых исследований существенно меняют как наши общие представления о молекулярном диалоге растения с патогеном, так и наши подходы к борьбе с фитофторозом.

Фитофтороз постоянно угрожает глобальной продовольственной безопасности, облагая картофелеводов налогом, достигающим 10 млрд. долларов в год, если учитывать прямые потери урожая и стоимость химической защиты растений [3–6]. Фунгициды (оомицетиды), которые применяют сегодня для борьбы с этим безжалостным патогеном, угрожают здоровью людей и биосферы в целом. По всей видимости, наиболее эффективным и экологически приемлемым путем сдерживания фитофтороза является создание новых сортов картофеля с долговременной устойчивостью к этой болезни [7–10]. Успешную селекцию на долговременную устойчивость к фитофторозу питает приток новых знаний о биологии патогена *P. infestans* и растения-хозяина *Solanum* L., в первую очередь, знаний о молекулах — инструментах вирулентности патогена и устойчивости растения [11–17].

Когда задачей селекции является долговременная и стабильная устойчивость к фитофторозу, пристальное внимание обращают на такие определяющие стороны *P. infestans*, как функциональное разнообразие факторов вирулентности патогена и невероятная пластичность его генома, которая обеспечивает быстрые изменения в составе факторов вирулентности и ярко проявляется в популяционном поведении патогена [5, 6, 18–20]. Молекулярные исследования играют все возрастающую роль в изучении многослойной защиты растений [1, 12, 21]. В результате мы во все большей степени можем оценить сложность молекулярного диалога между картофелем и *P. infestans*,

который так драматично проявляется в эпидемиях фитофтороза [5, 6, 22].

Наиболее наглядным проявлением устойчивости картофеля к *P. infestans* служит защитная реакция, связанная со смертью клеток в ходе реакции сверхчувствительности (hypersensitive response, HR) вслед за вторжением патогена в клетки растения и переносом в растение специфичных эффекторов, которые действуют как факторы (а)вирулентности (*Avr* факторы). Поэтому *Avr* генам и их продуктам — эффекторам, распознаваемым защитными системами растения, уделяется сегодня так много внимания в молекулярных исследованиях патогена [16, 23–26]. Не менее важны и механизмы, используемые растениями для распознавания и отпора патогенам. Лучше других изучены случаи, когда *Avr* гены распознаются соответствующими (matching) генами устойчивости к *P. infestans* (*Rpi* генами), кодирующими иммунные рецепторные белки. Все охарактеризованные к настоящему времени рецепторы эффекторов *P. infestans* у картофеля относятся к классу coiled coil — nucleotide binding — leucine rich repeat (CC-NB-LRR) внутриклеточных белков растений. Новые сведения об *Avr* и *Rpi* генах и их взаимодействиях быстро расширяют научную основу столь разных технологий селекции, как отдаленные скрещивания или транс- и цисгенез, используемые для переноса *Rpi* генов из дикорастущих видов *Solanum* в восприимчивые сорта картофеля [7–9, 27–29].

Тем не менее, вследствие быстрой эволюции генома и вторжения новых штаммов *P. infestans*, эпифитотии фитофтороза постоянно прорывают выстроенные селекционерами заграждения, обращая в ничто, иногда в течение нескольких дней, их многолетние усилия [5, 6, 19]. Поэтому неотложной задачей биологов растений является постоянный поиск новых источников устойчивости к фитофторозу, по преимуществу в генетическом материале дикорастущих видов *Solanum*, расширение круга *Rpi* генов, подробно исследованных и документированных молекулярными методами [17, 29–31], и выявление лучших сочетаний генов для включения их в перспективные сорта картофеля [32].

В случае картофеля молекулярные исследования с использованием новых методов анализа строения и активности *Avr* генов *P. infestans* и *Rpi* генов дикорастущих и культурных растений *Solanum* значительно способствуют борьбе с фитофторозом. Среди наиболее значимых методологических прорывов выделяются так называемые “омик” технологии (геномика, транскриптомика, протеомика, метаболомика и эффектормика), молекулярная цитогенетика, новые типы ДНК маркеров, поиск новых аллелей *Rpi* генов (allele mining) и, наконец, методы секвенирования нового поколения

(next generation sequencing, NGS) полноразмерных геномов и транскриптомов или избранных генов-мишеней (target genes) – в сочетании с биоинформационным анализом больших массивов данных о геномах и транскриптомах растения и патогена. Эти прорывные методологии позволили идентифицировать на молекулярном уровне многих участников взаимодействий ген-на-ген, описанных ранее классическими генетическими методами. Успехи этих исследований сделали фитотрофуз популярной моделью взаимодействия и коэволюции патогена и растения-хозяина [12, 15–17, 22, 28, 33–39]. В то же время новый контекст исследований геномов и новый молекулярный инструментарий этих исследований позволяют создавать более продуктивные сорта картофеля.

Во многих отношениях этот обзор следует за предыдущей публикацией автора [39]. Здесь в центре внимания оказались новейшие методологии исследования и недавние обзоры, объединившие инновационные идеи эволюции растений и микроорганизмов с новыми концепциями фитопатологии и селекции растений. Библиография доведена до июня 2020 г.

РАСПОЗНАВАНИЕ ПАТОГЕНА И ЗАЩИТНЫЕ БАРЬЕРЫ РАСТЕНИЯ-ХОЗЯИНА: ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Иммунитет, индуцированный молекулярными структурами (Pattern-triggered immunity). Чтобы распознавать многочисленных патогенов, сдерживать их вторжение и ограничивать повреждающее действие, растения создали сложную иммунную систему, которую часто описывают как два барьера или уровня защиты [1, 12, 40, 41]. Первый, все еще недостаточно исследованный барьер врожденного иммунитета (innate immunity) на поверхности клетки обычно обеспечивает широкий спектр устойчивости. Преграду для вторжения патогена на внеклеточном интерфейсе растение-микроорганизм (в апопласте клетки) описывают как иммунитет, запускаемый общими элиситорами, которые называют молекулярными структурами микроорганизма или патогена (microbe- and pathogen-associated molecular patterns, MAMPs and PAMPs); реакция на эти элиситоры получила общее название иммунитета, вызванного молекулярными структурами патогена (pattern-triggered immunity, PTI). Рецепторы на поверхности клетки, узнающие PAMPs или MAMPs, представлены преимущественно рецептор-подобными киназами (receptor-like kinases, RLKs) и рецептор-подобными белками (receptor-like proteins, RLPs). Далеко не все RLKs и RLPs служат рецепторами, некоторые являются ко-рецепторами, каркасными белками или другими участниками сигнальных путей [40, 42].

При вторжении патогена в апопласт в растениях накапливаются антимикробные соединения, при-

мером которых являются белки, связанные с патогенезом (pathogenesis-related, PR). Большинство PR генов индуцируются сигнальными соединениями: так, салициловая и жасмоновая кислоты или этилен экспрессируются волнами на протяжении процесса колонизации растения; помимо устойчивости к патогенам, PR белки служат специфичными маркерами системной приобретенной устойчивости, индуцированной патогеном [20, 43]. В свою очередь, *P. infestans* секретирует ферменты, которые могут подавлять такую защиту растений; к их числу относятся протеазы и ферменты, разрушающие клеточные стенки растения: пектацелилазы, полигалактуроназы, ксиланазы и т.д.

Полигенную и частичную устойчивость к фитотрофузу, возникающую вследствие РТИ, не адаптированного по отношению к определенному растению-хозяину, также называют полевой, количественной и расонеспецифичной устойчивостью. Она не является долговременной [9, 10, 14]. Более перспективными для создания долговременной устойчивости на основе РТИ представляются гены-кандидаты, выявляемые методами ассоциативных генетических исследований, полногеномных ассоциативных исследований и сравнительного анализа транскриптов (transcript profiling). Эти гены кодируют ключевые ферменты синтеза гормонов растений, которые участвуют в защитном сигналинге: аллен-оксид синтазу и липооксигеназы из жасмонатного сигнального пути, 3-окси-3-метил-глутарил-коэнзим А редуктазу из мевалонатного пути и цитохром P450, участвующий в биосинтезе терпенов, а также анионную пероксидазу, участвующую в процессе суберинизации клеточной стенки [44, 45].

Иммунитет, индуцированный эффекторами (Effector-triggered immunity). В отличие от неадаптированного апопластного иммунитета, адаптированные к определенному хозяину (host-adapted) патогены секретируют в клетки растений многочисленные эффекторы, которые кодируются генами вирулентности и доставляются в клетки растения-хозяина с помощью специфичных структур и механизмов [22, 24, 46, 47]. Патогенезу, в котором участвуют эффекторы, у растений противостоит вторая, цитоплазматический барьер, где эффекторы опознаются внутриклеточными RLKs. Этот процесс иммунитета, запускаемого эффекторами (effector-triggered immunity, ETI), специфично различает расы патогена. РТИ и ETI активируют сложную сеть передачи сигналов, которая включает каскады митоген-активируемых киназ и/или химический сигналинг при участии гормонов растений, а также регуляцию на уровне транскрипции: все эти сигналы приводят к таким физиологическим изменениям в растении, как HR, образование активных форм кислорода и упрочнение клеточной стенки [12, 21, 23, 40, 43, 48]. В обновленной модели взаимодействия растения

с патогеном интегрированы три уровня: распознавание, интеграция сигналов и реализация защитной реакции [22]. Сегодня этот континуум взаимодействия растения с патогеном стал горячей точкой молекулярной фитопатологии.

Когда-то новаторская парадигма “ген-на-ген” [49] предполагала, что устойчивость растения наблюдается, когда доминантный ген устойчивости растения встречается доминантный *Avr* ген патогена. Биохимической версией этой концепции является модель рецептор-лиганд, в соответствии с которой растения используют для защиты белки, распознающие продукты *Avr* генов патогена. Однако сегодня эту классическую модель считают сильно упрощенной, даже в случае моногенных взаимодействий ген-на-ген в цитоплазме растения. Во-первых, лишь в редких случаях засвидетельствованы прямые стерические взаимодействия белковых продуктов генов вирулентности и генов устойчивости, поэтому модель прямого взаимодействия по типу рецептор-лиганд дополнена моделями непрямого взаимодействия, например, “сторожа” (*guard*) и “ловушки” (*decoy*). Далее, наряду с моногенным взаимодействием, известно немало случаев, когда несколько генов или кластеры тесно сцепленных генов устойчивости распознают один единственный эффектор – и наоборот; кроме того, взаимодействия ген-на-ген для различных сочетаний патоген-растение в разной степени зависят от окружающей среды [23, 41, 48, 50]. Для описания эволюции и диверсификации генов устойчивости предложены две крайние концепции – “гонки вооружений” (*Arms Race*) и “окопной войны” (*Trench Warfare*), однако эволюция генов устойчивости, скорее всего, протекает в непрерывном пространстве взаимопользования (mutualistic) сожительства, которое часто использует механизмы и молекулярные компоненты защиты, описанные для обеих систем [12, 13, 46, 51, 52]. В наше время классические генетические исследования взаимодействия патогена с растением-хозяином дополняются молекулярными исследованиями участников этого взаимодействия и интегрируют существующие модели коэволюции и функции; такая интеграция поможет лучше понять быстрые изменения в агрессивности патогена и развитии болезни [5, 6, 20, 22, 24, 53, 54].

Среди многочисленных агентов ЕТI у *Phytophthora* лучше других исследованы RXLR эффекторы, продукты *Avr* генов этого патогена, и CC-NB-LRR рецепторы, продукты *Rpi* генов картофеля [11, 13, 16, 17, 25]; этим генам посвящены отдельные разделы обзора.

Phytophthora infestans: ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА И ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ

В основе нынешних представлений о геноме *P. infestans* лежат результаты секвенирования ге-

нома штамма T30-4 [55]. По своим размерам (240 млн п.н.) этот геном намного больше геномов других видов *Phytophthora*, прежде всего из-за избытия ДНК повторов, составляющих около 74% генома *P. infestans*. Самым удивительным свойством этого генома, определяющим этиологию фитотрофа картофеля, является неравномерная плотность распределения генов. Участки, богатые “генами домашнего хозяйства” (*housekeeping genes*), чередуются с протяженными районами генома, в которых мало таких генов, но зато много повторов; эти участки содержат быстро эволюционирующие гены вредоносных (*pathogenic*) эффекторов. Примечательно, как столь необычное строение генома связано с поведением патогена. Быстро эволюционирующие гены эффекторов заключены в обширные и чрезвычайно динамичные участки генома, и такая локализация резко увеличивает частоту замен нуклеотидов, инсерций/делений, перестроек и изменения копийности генов по сравнению с генами домашнего хозяйства. В результате эти участки хромосом оказываются уникальными нишами быстрой эволюционной диверсификации, которая определяет штамм-специфичный репертуар генов вирулентности [18, 53, 55, 56]. Naas и др. [55] постулировали, что такие динамические районы генома *P. infestans* определяют эволюционную пластичность генов эффекторов и создают столь характерную для эпидемии фитотрофа повышенную генетическую изменчивость, позволяющую патогену преодолеть устойчивость растения.

Эти представления получили дальнейшее развитие по мере того, как секвенирование других геномов *P. infestans* и особенно транскриптомов принесло многочисленные данные, согласующиеся с концепцией определяющего участка повторов в увеличении размеров генома *P. infestans* [57, 58]. Концепция двухчастного генома и двухскоростной (или даже многоскоростной) эволюции генома выявляет те особенности архитектуры генома, которые определяют быстрые динамические перестройки и генетическую диверсификацию участков, связанных с вирулентностью, и служат колыбелью адаптивной эволюции *P. infestans* [18, 59]. Такая ускоренная адаптация, обусловленная специфичной архитектурой генома, особенно важна в случае искусственного отбора патогенов в агроценозах [60].

В большинстве случаев адаптацию *Phytophthora* определяют дубликации генов, негомологичные рекомбинации и делеции в участках, богатых транспозонами и генами эффекторов. Однако существуют и другие механизмы регуляции: к их числу относятся значительные изменения копийности генов, избирательная потеря генов, а также точечные мутации, сдвиг рамки считывания, повреждения старт- и стоп-кодона и изменения в характере экспрессии генов [53, 61]. Сюда следует

прибавить и эпигенетическую регуляцию эволюции патогена [20, 62].

ОРУДИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ:

Avr ГЕНЫ И ЭФФЕКТОРЫ *P. infestans*

Новые физиологические и молекулярные методы позволили идентифицировать многочисленные цитоплазматические *Avr* гены и их продукты, эффекторы, которые патоген образует, чтобы модулировать многослойный иммунитет растения-хозяина, а также мишени этих эффекторов в растительных клетках [16, 24, 25, 46, 55, 63–68].

Гены эффекторов *P. infestans*. Среди многочисленных генов эффекторов в полностью секвенированных геномах *P. infestans* преобладают два типа структур. RXLR эффекторы – это модульные белки, на N-конце которых находится консервативный мотив R-x-L-R (аргинин – любая аминокислота – лейцин – аргинин), за которым обычно следует короткий EER (глутаминовая кислота – глутаминовая кислота – аргинин) домен, необходимый для переноса эффектора в растительную клетку. Изучение консервативных последовательностей в модельном геноме штамма T30-4 предсказало существование 563 RXLR генов. Примерно половина из них обнаруживает клональную (lineage) специфичность, которая, главным образом, и определяет разнообразие эффекторов, обусловленное эволюцией патогена. Куда меньше известно о генах CRN (crinkling- and necrosis-inducing proteins) эффекторов, обладающих неожиданным многообразием и сложным строением. Как и RXLR эффекторы, CRN эффекторы – это модульные белки, определяющей структурой которых служит чрезвычайно консервативный N-концевой LFLAK домен из 50 аминокислот; напротив, их C-концевые участки более разнообразны [26, 55].

Наряду с индукцией HR при специфичном взаимодействии генов эффекторов с соответствующими *Rpi* генами растений *Solanum*, можно привести несколько примеров других проявлений RXLR *Avr* генов. AVR1 влияет на накопление эффекторов вблизи гаусторий [67]. Другие эффекторы, включая хорошо известные AVR-BLB2, AVR2 и AVR3a, нарушают Ca²⁺-сигналинг, связанный с защитой растения, повышают восприимчивость растения и подавляют смерть клеток [69–71]. Различные эффекторы атакуют параллельные участки в цепях передачи сигналов, приводящих к HR [72]. RXLR эффекторы самым разным образом локализованы в растительных клетках, и ко-экспрессия нескольких RXLR эффекторов, поражающих различные иммунные системы, способствует колонизации по сравнению с одиночными эффекторами [67].

Когда эффекторы попадают в дикорастущие или культурные растения *Solanum*, они специфично узнают соответствующие им (matching) рецепторные белки, кодируемые *Rpi* генами. Основная на таком взаимодействии эффективная технология идентификации *Avr* и *Rpi* генов получила название эффекторомики. Для выявления соответствующих *Rpi* генов эффекторы транзитивно экспрессируются в листьях *Solanum*, и реакция клеточной смерти регистрируется невооруженным глазом. Чтобы убедиться в соответствии пар *Rpi*–*Avr* генов, гены-кандидаты ко-экспрессируют в листьях растений-тестеров, например, *Nicotiana benthamiana* Domin [15, 16, 65, 68].

Используемая ниже номенклатура *Avr* генов восходит к 11 *Rpi* генам, которые были обнаружены в генетическом материале *S. demissum* Lindl. и используются в стандартном Mastenbroek-Black наборе растений-дифференциаторов [73, 74] для различения штаммов (рас) *P. infestans*. Список эффекторов расширяется по мере обнаружения новых *Rpi* генов и их использования в опытах по эффекторомике [13, 16, 65]. Открытие, что многие AVR белки *P. infestans* принадлежат к классу RXLR эффекторов, позволило находить в генбанках новые гены эффекторов методами биоинформатики. К настоящему времени выявлены многочисленные мишени этих эффекторов, однако функции многих RXLR структур остаются неизвестными [13, 16, 22, 38, 47, 64, 67].

Генетический полиморфизм *Avr* генов. В полностью секвенированном геноме штамма T30-4 и других изолятов и штаммов *P. infestans* RXLR эффекторы были исследованы с помощью различных методов. Методы эффекторомики использовали, чтобы определить специфичную способность эффекторов вызывать клеточную смерть в листьях различных дикорастущих видов *Solanum* [65]. Эта работа существенно расширила круг известных *Rpi* генов и выявила значительное функциональное разнообразие уже известных RXLR *Avr* генов. Их структурное разнообразие возникает в результате дупликации *Avr* генов, их последующей рекомбинации и различной судьбы аллелей, отбираемых условиями окружающей среды, в первую очередь, самими инфицируемыми растениями [54].

Связь строения с функциональным полиморфизмом была впервые описана в случае гена *Avr3a*. Два аллеля этого гена кодируют белки AVR3aKI и AVR3aEM, которые различаются двумя аминокислотными остатками, непосредственно влияющими на реакцию растения-хозяина: первый из двух белков непосредственно активирует R3a киназу растения *Solanum* и вызывает иммунную реакцию, второй белок, вирулентный *Avr3a* обеспечивает вирулентность на протяжении биотрофной фазы патогенеза. Удаление C-концевого остатка тирозина у AVR3aKI не влияет на распознавание

R3a, но лишает AVR3aKI способности подавлять смерть клеток, продлевая биотрофную фазу [75].

Популяционные исследования существенно расширили наши знания о разнообразии RXLR *Avr* генов. Клонирование и секвенирование полигенного семейства *IpiO* из изолятов *P. infestans*, собранных в Гватемале, Таиланде и США, выявили широкий спектр аллелей, различающихся по строению и копияности. Разнообразие *IpiO* генов коррелировало с агрессивностью патогена. Ген *Rpi-blb1* картофеля опознавал эффектор IPI-O1, однако другой представитель того же семейства IPI-O4 избегал распознавания и угнетал HR, вызванную взаимодействием IPI-O1 с *Rpi-blb1*. Вызванное IPI-O4 подавление распознавания IPI-O1 определяет повышенную агрессивность патогена [76].

Другим примером значительного аллельного полиморфизма генов эффекторов служит семейство *Avr-blb2*. У штамма T30-4 *P. infestans* вариации отмечены у 24 из 279 исследованных нуклеотидных последовательностей, при этом из 14 полиморфных сайтов десять были локализованы в С-концевом домене эффектора. Аминокислотный остаток в положении 69 определял защитную реакцию, опосредованную геном *Rpi-blb2*: среди четырех вариантов белка AVR-BLB2, Phe-69 препятствует активации *Rpi-blb2*, и это говорит о том, что вирулентный аллель возник для того, чтобы избежать его узнавания геном устойчивости [64]. Изучение строения гена *Avr-blb2* в глобальной метапопуляции *P. infestans* (352 изолята, собранных с 13 различных растений-хозяев в 23 странах) позволяет предположить, что *Avr-blb2* появился вначале у вида-прародителя как единственная копия гена, а затем дивергировал по мере того, как клоны этой линии *Phytophthora* инфицировали растения *Solanum* во всем мире. Удивительно, что в популяциях *P. infestans* мы сегодня находим все варианты *Avr-blb2*: очевидно, патогену выгодно поддерживать дублированные и функционально различные версии гена *Avr-blb2* [77].

Куда большие структурные различия между авирулентными и вирулентными формами были найдены у двух других *Avr* генов. Изучение последовательностей авирулентного AVR2 и вирулентного AVR2-like в серии линий и изолятов *P. infestans* обнаружило, что они различались 13 аминокислотными остатками, притом что полиморфизм внутри каждого класса не был столь значительным; некоторые изоляты были гомозиготными, а другие — гетерозиготными по гену *Avr2* [78]. Еще сильнее — по 38 аминокислотным остаткам — различались авирулентный AVR1 и вирулентный AVR1-like эффекторы [79].

Анализ генома у изолятов *P. infestans*, собранных в 1100 случаях эпидемического проявления фитофтороза картофеля в Великобритании, выявил значительную гетерогенность репертуара

RXLR эффекторов. В частности, наиболее агрессивный изолят I3_A2 содержал шесть новых *Avr* аллелей, включая вирулентный гомолог *Avr2*, которые отсутствовали у модельного штамма T30-4 [5]. Заметный аллельный полиморфизм гена *Avr-vnt1* обнаружен в популяциях *P. infestans* в Европе и обеих Америках [80], а также в Европе при сравнении польских и норвежских популяций [81]. Среди 96 изолятов *P. infestans*, собранных в шести районах Китая, которые различались погодными условиями и агротехникой возделывания картофеля, значительный полиморфизм гена *Avr3a* позволил выделить 51 гаплотип, кодирующий 38 аминокислотных вариантов [82].

В последние годы для идентификации генов эффекторов начали использовать новую чрезвычайно эффективную технологию Pathogen target enrichment Sequencing (PenSeq); эта технология облегчает анализ аллельного разнообразия эффекторов, давая возможность провести эволюционный анализ генома и популяционные исследования патогена. PenSeq также позволяет выполнить широко-масштабные исследования изменчивости (присутствие/отсутствие гена) и полиморфизма последовательностей ключевых генов патогена, что является предварительным условием эффективного использования генов устойчивости растения-хозяина. Так, использование PenSeq для анализа нескольких линий *P. infestans*, включая I3_A2 и EC-1, позволило обнаружить 16 последовательностей RXLR эффекторов, отсутствовавших в геноме линии T30-4, который использовали при синтезе “наживок” (baits) для обогащения *Avr* генов при секвенировании. Сравнение шести различных изолятов выявило особенности профилей (присутствие/отсутствие генов) и аллельный полиморфизм ранее охарактеризованных *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-Smira2=Avr8*, *Avr-Smira1=Avr9*, *Avr10*; *Avr-vnt1*, *Avr-blb1* и *Avr-blb2* генов. Кроме того, это PenSeq исследование расширило список *Avr* генов-кандидатов за пределы модельных последовательностей, использованных в качестве “наживок” для обогащения генов-мишеней; такое расширение списка генов было особенно заметным в случае комплексов генов, для которых характерен значительный аллельный полиморфизм [38]. Другим примером аллельной диверсификации *Avr* генов стало недавнее исследование *S. americanum* Mill., вида, который не является типичным растением-хозяином (non-host) *P. infestans*. У четырех изолятов *P. infestans*, авирулентных по отношению к растениям картофеля, несущим ген *Rpi-amr1* (EU13_A2, EC1_A1, EU6_A1 и US23), исследовали 47 генов эффекторов с высокой скоростью экспрессии с помощью одномолекулярного секвенирования в реальном времени (single-molecule real-time sequencing, SMRT RenSeq) и PenSeq долговчитаемых (long-read) последовательностей и кДНК. Новый ген был идентифици-

рован как *Avr-amr1* по HR, которую наблюдали при транзитной ко-экспрессии с соответствующим геном *Rpi-amr1* в растениях *N. benthamiana*. В геноме T30-4 вновь охарактеризованный локус *Avr-amr1* расположен вблизи уже известных генов эффекторов *Avr8* и *Avr-Smira1* [83].

С точки зрения биологии популяций и эволюции *P. infestans*, PenSeq анализ *Avr* генов обладает важным преимуществом: в условиях положительного, или балансирующего отбора он позволяет напрямую исследовать генетическую изменчивость агентов вирулентности, выявляя причины генетических изменений и характер адаптивной эволюции лучше, чем при секвенировании всего генома. Транскриптомные профили генов RXLR эффекторов, исследованные в ходе развития болезни, показали, что экспрессия этих генов резко усиливается на раннем биотрофном этапе заражения картофеля. Эти профили легко соотнести с конкретными инструментами устойчивости растения, взаимодействующего с патогеном.

Если демографические исследования эффекторов позволяют судить о потенциальном арсенале *P. infestans*, то профиль экспрессии *Avr* генов, вероятно, говорит об их активном репертуаре. Уникальная способность линии I3_A2 поражать сорта картофеля оказалась результатом изменений в кодирующих последовательностях *Avr* генов и характере экспрессии этих генов. В опытах *in planta* для этой линии показаны характерные изменения индукции генов во времени. В отличие от штамма T30-4, у этого генотипа специфично экспрессировались 20 генов RXLR эффекторов, при этом наиболее активно экспрессируемые гены, в том числе *Avr-blb1*, *Avr-blb2* и *Avr-vnt1*, сохраняли заметный уровень экспрессии в течение 2–3 дней после заражения, в полном согласии с кривой развития фитофтороза, и, вероятно, вносили важный вклад в нарастающую агрессивность линии I3_A2 [5].

Стратегию глубокого NGS транскриптомов, основанную на консервативности последовательностей генов RXLR эффекторов, использовали для сравнения пяти штаммов *P. infestans* из северо-западного и южного Китая и Европы, представляющих разные типы скрещивания, гаплотипы и патотипы; это исследование идентифицировало консервативные основные (core) гены RXLR эффекторов, определяющие вирулентность. Гены *Avr2*, *Avr3a*, *Avr-blb1*, *Avr-vnt1* и *Avr-Smira1* экспрессировались у всех исследованных штаммов, каждый из генов *Avr3b*, *Avr4*, *Avr-blb2* и *Avr-Smira2* экспрессировался у двух-четырех штаммов, а ген *Avr1* — только у одного [58]. В доминирующем в Андах клоне EC-1 были найдены многочисленные вариации структуры и числа копий *Avr* генов. Некоторые из них были связаны с потерей гетерозиготности в митозе. Однако самыми примеча-

тельными оказались различия изолятов по скорости экспрессии многих *Avr* генов — при полном отсутствии различий в последовательности этих генов. В этом случае сайленсинг гена эффектора позволял избежать его распознавания *Rpi* генами [60].

Solanum: ГЕНЫ, РАСПОЗНАЮЩИЕ ПАТОГЕНЫ И ПРОТИВОСТОЯЩИЕ ИМ

Картирование признаков и предполагаемых генов устойчивости к фитофторозу. С начала 1990 гг. для картирования *Rpi* генов-кандидатов у культурных и дикорастущих видов *Solanum* методами неравновесного сцепления или ассоциативного анализа используется несколько видов ДНК маркеров: RFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Simple Sequence Repeats, — а позже Single Nucleotide Polymorphism (SNP) маркеры и diversity array technology. Наиболее надежны маркеры, последовательности которых расположены внутри последовательности гена или непосредственно примыкают к ее концам: в таких случаях рекомбинация между маркерным аллелем и признаком устойчивости встречается редко или вовсе не происходит даже после многочисленных скрещиваний. Такие основанные на ПЦР маркеры, как Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) или Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, позволили с высокой точностью картировать *Rpi* гены-кандидаты и локусы количественных признаков (Quantitative Trait Loci, QTLs) устойчивости к фитофторозу [17, 84–87]. Результаты полногеномного картирования и картирования высокого разрешения позволили создать различные наборы вырожденных праймеров, распознающих аналоги генов устойчивости (resistance gene analogues, RGAs) и их кластеры, и амплификация генома с этими праймерами в сочетании с AFLP анализом существенно расширила круг предполагаемых *Rpi* генов. Этот высокоразрешающий метод поиска и идентификации (tagging) новых аллелей, получивший название motif-directed profiling, был успешно использован для изучения новых геномов *Solanum* и полиморфизма индивидуальных геномов, а сочетание такого profiling с NGS обещает огромные преимущества в сравнении с технологией profiling, основанной на разделении фрагментов ДНК в геле [17, 30].

Чтобы синтезировать данные о картировании локусов полигенной устойчивости к фитофторозу, двадцать одна карта QTLs была совмещена с восемью опорными генетическими картами картофеля, полученными с помощью различных маркеров, в консенсусную карту, несущую 2141 маркер, и вся совокупность QTLs была представлена в виде мета-QTLs. Мета-QTLs устойчивости к фитофторозу были найдены на всех 12 хромосомах картофеля, и некоторые из этих локусов совпадали с положением уже известных *Rpi* генов [88]. Другие QTLs

устойчивости к фитофторозу не совпадали с такими *Rpi* генами и RGAs; в этих локусах можно искать новые *Rpi* гены. Области QTLs, картированные стандартными методами, покрывают на физической карте участки длиной несколько млн. п.н. и содержат множество генов с различными функциями. Чтобы преодолеть это затруднение, секвенируют большие фрагменты геномов или целые геномы. Скрининг коллекций картофеля методами эффекторномики также расширяет круг *Rpi* генов на основе их функциональной активности [16, 17, 65, 66], однако эти данные часто трудно согласовать с результатами QTL анализа.

Обнаружение *Rpi* генов. Идентификация всего набора генов, определяющих устойчивость к *P. infestans*, – обязательное условие для понимания молекулярной природы различного течения болезни. За два последних десятилетия были найдены и клонированы более 20 *Rpi* генов дикорастущих видов *Solanum*. Секвенирование уже охарактеризованных *Rpi* генов показало, что все они принадлежат к CC-NB-LRR классу. Лучше других охарактеризованы ген *R1* и его аналоги в кластере генов на хромосоме 5 *S. demissum*, ген *R2* из *S. demissum*, его ортолог *Rpi-blb3* из *S. bulbocastanum* Dun. и их ортологи из нескольких других видов в большом кластере на хромосоме 4, ген *Rpi-blb2* из *S. bulbocastanum* на хромосоме 6, гены *Rpi-blb1* и *Rpi-bt1* из того же вида и *Rpi-sto1=Rpi-plt1=Rpi-pta* из *S. stoloniferum* Schlecht. et Bché., *S. polytrichon* Rydb. и *S. papita* Rydb. на хромосоме 8, ген *Rpi-vnt1* из *S. venturii* Hawkes et Hjerting и его ортологи из многочисленных южноамериканских видов *Solanum* на хромосоме 9 и гены *R8* и *R9a* из *S. demissum* на той же хромосоме, ген *Rpi-chc1* из *S. chacoense* Bitt. на хромосоме 10 и гены *R3a* и *R3b* из *S. demissum* на хромосоме 11 [10, 13, 14, 16, 17, 29, 37]. Последовательности еще нескольких идентифицированных *Rpi* генов-кандидатов пока не опубликованы. Сравнительное секвенирование отдельных *Rpi* генов и целых геномов клубненосных видов *Solanum* и за их пределами обнаружило функционально сходные формы *Rpi* генов и выявило обширный аллельный полиморфизм, который еще предстоит оценить селекционерам. В целом, клубненосные и не клубненосные виды *Solanum*, особенно виды из Южной Америки, открывают широчайшие возможности для эволюционных исследований *Rpi* генов и их использования в селекции картофеля [28, 29, 31, 89].

Анализ генома удвоенного моноплоида *S. tuberosum* группа *Phureja* клон DM [90] предсказал присутствие 361 CC-NB-LRR гена, расположенного на всех 12 хромосомах. Большинство этих генов физические организованы в кластеры, в основном гомогенные, что позволяет предполагать, что они сравнительно недавно дивергировали от общего предка. Примечательно, что в отличие от RXLR эффекторов, сосредоточенных в бедных другими

генами участках генома *P. infestans*, CC-NB-LRR гены находятся в участках генома картофеля, ничем не выделяющихся по плотности генов или повторов [91]. К настоящему времени полные последовательности геномов получены и опубликованы еще для нескольких культурных видов картофеля: полиплоидных *S. ×chaucha* Juz. et Buk., *S. curtilobum* Juz. et Buk., *S. juzepczukii* Buk. и *S. tuberosum* subsp. *andigena* Hawkes и subsp. *tuberosum* L. [92], и двух дикорастущих видов: *S. commersonii* Dun. [93] и *S. chacoense* [94]. Эти последовательности помогают оценить разнообразие структур, соответствующих CC-NB-LRR *Rpi* генам и их гомологам, и изучить кластерную организацию *Rpi* генов.

Характерно сходство в организации уже известных кластеров *Rpi* генов в различных геномах *Solanum*. По всей видимости, некоторые линии *Rpi* генов появились еще до дивергенции клубнеобразующих видов *Solanum*; далее, вслед за эволюцией геномов, которая определила нынешний ландшафт этих видов в двух Америках, начался независимый процесс адаптации различных *Rpi* генов к местным популяциям патогена [95]. Поражает случай контрастного распределения генов у дикорастущих видов картофеля: гены *Rpi-blb1=Rpi-sto1* найдены только у мексиканских видов серий *Bulbocastana* и *Longipedicellata*, в то время как ген *Rpi-vnt1* характерен для южноамериканских видов *Tuberosa* [16]. Удвоение всего генома, избирательная тандемная дупликация и удержание (retention) генов, равно как внутригенная и межгенная рекомбинация и конверсия CC-NB-LRR генов, описанные моделью эволюции генов устойчивости под названием “рождение-и-смерть”, наполняют резервуар генов картофеля чрезвычайно разнообразными структурами, которые служат материалом естественного и искусственного диверсифицирующего отбора; дело селекционеров – выбрать из этого огромного резервуара линии независимых генов со специфичностью к различным патогенам [1, 50]. Кластеризация генов может расширять полиморфизм их последовательностей благодаря внутри- и межгенной мейотической рекомбинации, приводя к появлению структур с новой специфичностью [13]. В качестве примера можно указать на эволюцию почти полностью идентичных структур у картофеля, в результате которой возникли два CC-NB-LRR гена устойчивости к столь различным болезням, как поражение цистообразующей нематодой *Globodera pallida* и *Potato virus X* [96].

Такие новые технологии секвенирования, как NGS, генерируют данные со скоростью, на несколько порядков величины превосходящей ту, что достигали традиционные технологии предшествующего периода. Технология RenSeq (Resistance gene enrichment Sequencing) включает конструирование “наживок” на основе последова-

тельностью известных семейств NB-LRR генов и секвенирование обогащенных таким образом образцов NB-LRR RGAs [34]. Выделение интересующих исследователя семейств генов позволяет изучить специфические компоненты генома. Благодаря существенному уменьшению размеров и упрощению состава анализируемых фрагментов генома еще до сравнительного секвенирования, этот метод значительно облегчает обнаружение *Rpi* генов и их высококачественную аннотацию. В случае генома клона DM *S. tuberosum* метод RenSeq выявил почти вдвое больше NB-LRR генов, чем полное секвенирование генома [90]. Эта технология позволила также быстро отобрать SNP маркеры, косегрегирующие с локусами устойчивости к *P. infestans* у нескольких видов *Solanum*, и с помощью этих маркеров выявить *Rpi* гены-кандидаты в еще не охарактеризованных геномах *Solanum*. Важным подспорьем в применении новых методов стало развитие высокоразрешающих биоинформатических методов обнаружения и исследования полиморфизма генов.

Однако возникает вопрос, какая доля CC-NB-LRR *Rpi* генов-кандидатов, обнаруженных при полном секвенировании генома или RenSeq методом, участвует в устойчивости к фитофторозу. Стабильная трансформация восприимчивых к фитофторозу сортов картофеля в устойчивые с помощью предполагаемых *Rpi* генов является надежным, но чрезвычайно дорогим и трудоемким доказательством их функциональности. Более доступными методами валидации *Rpi* генов являются эффекторика, основанная на транзиентной трансформации растений [66], мета-QTL анализ [88], маркерный анализ и транскриптомный анализ растений картофеля, инфицированных *P. infestans*.

NGS технологии [15, 17, 34, 35, 37] резко ускорили картирование высокого разрешения и обнаружение новых генов и открыли новые возможности для сравнительных исследований геномов (генотипирование путем секвенирования, полногеномное секвенирование, баркодинг и т.д.) и транскриптомов (RenSeq, Candidate gene-Sequencing, Bulk segregant RNA-Seq, QTL-Seq, dRenSeq и др.). Дальнейшим развитием серийного анализа экспрессии генов (serial analysis of gene expression, SAGE) стал DeepSAGE метод транскриптомного анализа; при изучении взаимодействия растения-хозяина с патогеном этот метод обнаруживает новые гены-кандидаты. При изучении этим методом совместимых и несовместимых взаимодействий растения и патогена по ходу развития болезни транскрипция полигенных семейств, как правило, отвечающих за РТІ защитные реакции, сильнее изменялась у восприимчивых растений [97]. Использование другой разновидности SAGE технологии, SuperSage, дало много новой информации о специфичном усилении или ослаблении транскрипции отдельных генов, включая гены устойчи-

вости к фитофторозу, при вторжении патогена [33]. При сравнении транскриптомов устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля методом RNA-Seq, у устойчивого сорта Sarpo Mira экспресировалось приблизительно на четверть больше предполагаемых генов устойчивости, чем у восприимчивого сорта Désirée, однако ни один из обнаруженных генов не принадлежал к уже известным *Rpi* генам [98].

При дальнейшем совершенствовании RenSeq технологии специфичные “наживки”, сконструированные для захвата и секвенирования фрагментов ДНК, были укорочены до размеров, соответствующих средней длине *Rpi* гена-кандидата, и для клонирования индивидуальных *Rpi* генов использовали SMRT RenSeq метод. Это позволяет собрать *de novo* *Rpi* гены, их регуляторные элементы и сложные локусы, даже работая с недостаточно охарактеризованным генетическим материалом, и быстро клонировать многочисленные новые *Rpi* гены [15, 35].

Расширение круга “наживок” для захвата генов-кандидатов привело к созданию еще одного мощного и экономически эффективного приложения RenSeq технологии как диагностического инструмента (dRenSeq). Метод определяет уже известные *Rpi* гены, надежно их идентифицирует, а также позволяет валидировать полные последовательности уже известных функциональных *Rpi* генов в генетических коллекциях и селекционных программах. В зависимости от условий гибридизации (stringency conditions, mismatch rates) при захвате *Rpi* генов и RGAs, метод dRenSeq позволяет также выявить ранее неизвестные полиморфизмы, перспективные для поиска новых *Rpi* генов и новых аллелей уже охарактеризованных *Rpi* генов у таких недостаточно охарактеризованных видов, как *S. americanum*, *S. andigena*, *S. pinnatisectum* Dun. и *S. verrucosum* Schlecht. [37, 38, 57, 99, 100]. В случае *S. andigena* этот метод успешно различил усиление и ослабление транскрипции отдельных генов: при совместимом взаимодействии гены восприимчивости индуцировались сильнее, чем при несовместимом взаимодействии. Чтобы связать устойчивость образца *S. andigena* 03112-233 к *P. infestans* с известными или вновь обнаруженными генами устойчивости, для dRenSeq анализа использовали 21 известный функциональный *Rpi* ген. Ни один из них не удалось выявить при этом анализе, так что, по всей видимости, за устойчивостью этого образца к *P. infestans* стоит неизвестный ген [57].

ВМЕСТО ЗАКЛЮЧЕНИЯ: ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ НОВЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФИТОФТОРОЗА

Сегодня мы стали свидетелями успешного использования результатов генетических и геном-

ных исследований картофеля в селекции картофеля. Экспериментальные данные, полученные благодаря новейшим молекулярным технологиям, и возникшие на их основе новые представления о вредоносности патогена и устойчивости растения оказывают заметное воздействие на селекцию картофеля на долговременную устойчивость к фитофторозу и способствуют развитию интегрированных методов борьбы с этой болезнью.

ГМ растения-дифференциаторы. Вот уже почти сто лет для различения патотипов (рас) *P. infestans* широко используют HR реакцию Mastenbroeck-Black растений-дифференциаторов [73, 74]. Исходно предполагали, что эти сорта картофеля содержат по одному *Rpi* гену, перенесенному из *S. demissum* [9]; однако некоторые из этих “моноклассных” растений в действительности содержат более одного *Rpi*, что препятствует правильному диагнозу [101]. Кроме того, существующие наборы растений-дифференциаторов не содержат генов, которые в настоящее время наиболее успешно используются в селекции на долговременную устойчивость: *Rpi-blb1*, *Rpi-sto1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-vnt1* и др. [8]. Радикальным выходом из создавшегося положения стала трансформация растений картофеля сорта Désirée каждым из десяти *Rpi* генов [101]. Такие по-настоящему моноклассные растения-дифференциаторы обеспечивают более точное генотипирование изолятов *P. infestans*, однако их применение наталкивается на ограничения, вызванные их ГМ происхождением.

Эффектормика. Прямое изучение *Avr* генов, непосредственно определяющих вредоносность популяций *P. infestans*, открыло новые перспективы для мониторинга популяций патогена, отслеживания его перемещений в агроценозах и раннего предупреждения о появлении новых и, возможно, более агрессивных патотипов. Среди наиболее многообещающих диагностических приложений наших знаний об *Avr* генах следует назвать эффектормику – легкодоступный чувствительный и производительный метод анализа аллельного разнообразия *Avr* генов, поиска новых *Rpi* генов путем скрининга генетических коллекций и определения функций вновь обнаруженных генов в связи с селекцией на долговременную устойчивость к фитофторозу [66, 102]. Эффектормика дает уникальные сведения о составе *Avr* генов, которые могут стать частью интегрированной системы защиты картофеля, помогая, к примеру, планировать состав генов устойчивости путем сортосмены или схему применения фунгицидов [103].

Прямое определение репертуара *Avr* генов и использование арсенала эффекторов. Новые знания об эволюции и диверсификации *Avr* генов патогена позволяют разработать более сложные системы использования *Rpi* генов, которые сближают агроценозы с популяциями дикорастущих растений,

где лишь изредка наблюдаются эпидемии [32]. Если эффектормика различает гены авирулентных эффекторов по их функции, то все новые и новые успехи технологий секвенирования генома позволяют рано обнаружить новые структуры *Avr* генов и таким образом сигнализировать о появлении новых патотипов. Репертуар *Avr* генов, выявленный методами геномики, позволяет следить за распространением патогена в агроценозах и способствует селекции на устойчивость к фитофторозу, идентифицируя гены вирулентности в популяциях патогена и гены устойчивости и восприимчивости к этому патогену в инфицированных посадках картофеля [68]. Технология PenSeq призвана ответить на многие вопросы биологии патогена и преодолеть ограничения современных фитопатологических исследований благодаря широким параллельным исследованиям последовательностей генов, включая массовое определение аллельного полиморфизма ключевых *Avr* генов *P. infestans* и их положения на карте генома и на карте территории [38]. PenSeq выявляет *Avr* гены, определяющие потенциал долговременной устойчивости картофеля, достигнутой при интрогрессии *Rpi* генов. Более того, эта технология позволяет ре-аннотировать гены-кандидаты эффекторов в геноме *P. infestans*, тем самым расширяя поле будущего применения *Avr* генов как инструмента селекции.

Поиски новых *Rpi* генов. За два последних десятилетия значительно увеличилось число охарактеризованных последовательностей генома культурных и дикорастущих форм, принадлежащих к разным видам картофеля и регионам их произрастания. При всем недостатке знаний о генетическом разнообразии картофеля на уровне полных геномов, в предшествующий NGS период различные методы поиска новых аллелей смогли предложить селекционерам много перспективных *Rpi* генов [10, 13, 14, 17]. В эпоху NGS методы геномики позволяют по-новому и глубже взглянуть на разнообразие геномов в генетических коллекциях, выявить в истории культурного картофеля эволюционные процессы интрогрессии и гибридизации и идентифицировать гены, которые стали точкой приложения процессов одомашнивания, а затем и селекции [28, 31]. Новую dRenSeq технологию с успехом использовали для изучения аллельного полиморфизма *Rpi* генов и их аналогов, обнаружения *Rpi* генов в лучших сортах картофеля и идентификации новых аллелей этих генов у дикорастущих видов *Solanum* [37, 57, 99, 100, 104].

Использование *Rpi* генов для создания долговременной устойчивости к широкому спектру рас *P. infestans*. В полиплоидных геномах растений дикорастущих видов *Solanum* обычно поддерживается разнообразие многочисленных аллельных вариантов *Rpi* генов. Расширение наших знаний о поли-

морфизме и эволюции *Rpi* генов помогает выстроить стратегии пирамидирования *Rpi* генов, которые во многом сходны с процессами эволюции в популяциях дикорастущих форм, где редко происходят эпидемии. По мере увеличения разнообразия *Rpi* генов, сорта и гибриды картофеля постепенно достигают все более высокой устойчивости к болезням.

В природных экосистемах, примером которых служит долина Толука в Мексике [105], в результате совместной эволюции растений картофеля и *P. infestans* возникают популяции растений и микроорганизмов, в которых лишь изредка происходят эпифитотии. Напротив, в агроценозах, особенно при стремительном вторжении новых особо вирулентных штаммов патогена, эпидемии фитофтороза приводят к значительным потерям урожая [5, 6]. Одной из эффективных стратегий борьбы с фитофторозом является селекция на высокую и долговременную устойчивость, основанная на пирамидировании *Rpi* генов, распознающих различные *Avr* гены. Доступным источником такого генетического материала служат дикорастущие виды картофеля. Методами скрещивания или генетической инженерии многочисленные *Rpi* гены этих видов можно интрогрессировать в те сорта картофеля, которых требует рынок.

Подобная пирамида генов останется эффективной, пока растение содержит хотя бы один *Rpi* компонент, способный опознать соответствующий ему *Avr* ген патогена и запустить защитную реакцию. В основе пирамидирования (сборки) нескольких генов устойчивости в одном сорте с целью сделать его устойчивым долговременной лежит принцип, в соответствии с которым вероятность мутации сразу нескольких *Avr* генов из авирулентных в вирулентные низка и снижается с увеличением числа генов устойчивости в пирамиде. Теоретически, пирамида из четырех генов устойчивости устоит перед вторжением патогена — при условии, что эта пирамида и популяция патогена-колонизатора соответствуют нескольким критериям. Во-первых, собранные в пирамиду гены устойчивости должны проявляться полностью, чтобы исключить ситуацию, когда штамм патогена, несущий характерный *Avr* аллель, сможет инфицировать и колонизовать растение, несмотря на присутствие в нем соответствующего (matching) гена устойчивости. Во-вторых, не все гены устойчивости одинаково важны для устойчивости пирамиды; лучшие гены и их сочетания — это те, с которыми еще не сталкивалась инфицирующая популяция патогена. В-третьих, важна низкая частота рекомбинации генома патогена, поскольку при рекомбинации, когда, к примеру, в популяции *P. infestans* присутствуют два типа спаривания, частота независимых мутаций генов вирулентности окажется много выше, чем в исходно бесполой популяциях. В-четвертых, устойчивость будет долговременной при незначитель-

ной скорости распространения новых патотипов в полевых популяциях патогена [1, 32, 106].

В случае картофеля наиболее очевидным способом достигнуть долговременной устойчивости к *P. infestans* является вовлечение в селекцию новых *Rpi* генов и сосредоточение в одном сорте как можно большего числа этих генов. В два последних десятилетия такое пирамидирование опиралось на идентификацию и клонирование перспективных *Rpi* генов, в первую очередь, из разнообразных дикорастущих видов *Solanum*; особенный интерес представляют недостаточно изученные южноамериканские виды картофеля, которые ранее не вовлекались в практическую селекцию [28, 31, 36, 107, 108]. В создании селекционных источников долговременной устойчивости важную роль играют многие описанные выше “омик” технологии быстрой идентификации, клонирования и характеристики *Rpi* и *Avr* генов. При обогащении селекционных источников новым генетическим материалом путем идентификации и интрогрессии новых *Rpi* генов и новых аллелей уже охарактеризованных *Rpi* генов важно тщательно изучать уже существующие пулы *Rpi* генов, чтобы не включать в пирамиды те используемые селекционерами гены, которые уже преодолены местными штаммами патогена [9, 27–29, 31, 87, 108].

Внимание многих селекционеров сосредоточено на создании сортов картофеля с долговременной устойчивостью к фитофторозу методами генетической инженерии. Зарегистрированные в настоящее время сорта несут пирамиды, содержащие до трех *Rpi* генов широкой расовой специфичности, например, *Rpi-sto1:Rpi-vnt1.1:Rpi-blb3* или *Rpi-blb1:Rpi-blb2:Rpi-vnt1.1*. Хотя порознь эти гены иногда преодолеваются некоторыми изолятами *P. infestans*, вместе они обеспечивают долговременную устойчивость [109]. В сравнении с половой или соматической гибридизацией, важным преимуществом ГМ стратегий является то, что при этом не переносятся нежелательные сцепленные гены (linkage drag). Однако генетическая инженерия сельскохозяйственных растений — это дорогостоящий процесс; вдобавок, к ней отрицательно относятся многие потребители, и использование ГМ сортов ограничено законодательством многих стран, особенно в Европе [13, 110]. Чтобы преодолеть законодательные ограничения на использование трансгенных растений, голландские генетики и селекционеры предложили концепцию цисгенеза; в этом случае с помощью генно-инженерных методов *Rpi* гены переносятся только из тех дикорастущих видов *Solanum*, которые можно скрещивать с сортами картофеля [8, 27, 111, 112].

Традиционное пирамидирование *Rpi* генов, основанное на гибридизации, включает многочисленные этапы скрещивания и отбора потомства [9] и

поэтому оказывается чрезвычайно медленным и трудоемким процессом, даже при эффективном использовании молекулярных маркеров. Однако пока этим методом удается сосредоточить в одном растении больше *Rpi* генов, чем с помощью сегодняшних ГМ технологий. В качестве примера можно указать на многочисленные сложные (multiparental) гибриды, созданные отечественными генетиками и селекционерами путем отдаленного скрещивания с использованием десятка дикорастущих видов *Solanum*; эти гибриды несут SCAR маркеры до пяти *Rpi* генов на генотип. Клональные линии, полученные на основе этих гибридов, вот уже много лет отличает высокая устойчивость к фитофторозу, и они являются перспективными селекционными донорами таких генов широкого спектра устойчивости, как *Rpi-blb1=Rpi-sto1*, *Rpi-blb2*, *Rpi-vnt1*, *R2=Rpi-blb3* и др. [113]. Важным преимуществом таких линий является сохранение генетического окружения расспецифичных *Rpi* генов, интрогрессированных из родительских форм, включая гены раснеспецифичной устойчивости [84]. Вместо одиночных генов при отдаленных скрещиваниях переносятся целые кластеры генов, что повышает устойчивость растений сразу к нескольким болезням. Эти свойства сложных гибридов — залог стабильности будущих сортов картофеля, которые будут препятствовать распространению в посадках картофеля более адаптированных штаммов патогена [107, 113]. Однако при столкновении с большими популяциями *P. infestans* со смешанным A1 и A2 типом спаривания и заметным перемещением *Avr* генов вследствие миграции патогена одним только пирамидированием *Rpi* генов нельзя добиться долговременной устойчивости. Для ее поддержания важна такая организация защиты растений, которая снижает эффективный размер популяции патогена, например, севооборот и применение фунгицидов [106].

Автор признателен Вл.В. Кузнецову и Е.В. Рогозиной за конструктивные замечания и предложения.

Работа поддержана Государственным заданием 0574-2019-0001.

Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Michelmore R.W., Christopoulou M., Caldwell K.S.* Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2013. V. 51. P. 291. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102334>
2. *Brown J.K.M.* Durable resistance of crops to disease: A Darwinian perspective // *Annu. Rev. Phytopathol.*

2015. V. 53. P. 513. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045914>
3. *Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Visser R.G.F., van der Vossen E.A.G.* Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification // *Potato Res.* 2008. V. 51. P. 47. <https://doi.org/10.1007/s11540-008-9089-y>
4. *Haverkort A., Struik P., Visser R., Jacobsen E.* Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans* // *Potato Res.* 2009. V. 52. P. 249. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9136-3>
5. *Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S., Bain R.A., Cooke L.R., Etherington G.J., Deahl K.L., Farrer R.A., Gilroy E.M., Goss E.M., Grünwald N.J., Hein I., MacLean D., McNicol J.W., Randall E. et al.* Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen // *PloS Pathol.* 2012. V. 8: e1002940. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002940>
6. *Fry W.E.* *Phytophthora infestans*: new tools (and old ones) lead to new understanding and precision management // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2016. V. 54. P. 529. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-095951>
7. *Halterman D., Guenther J., Collinge S., Butler N., Douches D.* Biotech potatoes in the 21st century: 20 years since the first biotech potato // *Am. J. Potato Res.* 2016. V. 93. P. 1. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9485-1>
8. *Haverkort A.J., Boonekamp P.M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L.A.P., Kessel G.J.T., Vossen J.H., Visser R.G.F.* Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: scientific and societal advances in the DuRPh project // *Potato Res.* 2016. V. 59. P. 35. <https://doi.org/10.1007/s11540-015-9312-6>
9. *Bradshaw J.R.* Potato breeding at the Scottish Plant Breeding Station and the Scottish Crop Research Institute: 1920–2008 // *Potato Res.* 2009. V. 52. P. 141. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9126-5>
10. *Du J., Vleeshouwers V.G.A.A.* New strategies towards durable late blight resistance in potato // *The Potato Genome. Compendium of Plant Genomes* / Eds. Kumar C.S., Xie C., Kumar T.J. Cham: Springer, 2017. P. 161. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66135-3_10
11. *Hein I., Birch P.R., Danan S., Lefebvre V., Odeny D.A., Gebhardt C., Trognitz F., Bryan G.J.* Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives // *Potato Res.* 2009a. V. 52. P. 215. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9129-2>
12. *Hein I., Gilroy E.M., Armstrong M.R., Birch P.R.* The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions // *Mol Plant Pathol.* 2009b. V. 10. P. 547. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00547.x>
13. *Rodewald J., Trognitz B.* *Solanum* resistance genes against *Phytophthora infestans* and their corresponding avirulence genes // *Mol. Plant. Pathol.* 2013. V. 14. P. 740. <https://doi.org/10.1111/mpm.12036>

14. *Sliwka J., Zimnoch-Guzowska E.* Resistance to late blight in potato // *Translational Genomics for Crop Breeding*, Vol. 1: Biotic Stress / Eds. Varshney R.K., Tuberosa R. Wiley, 2013. P. 221.
<https://doi.org/10.1002/9781118728475.ch12>
15. *Van Weymers P.S., Baker K., Chen X., Harrower B., Cooke D.E., Gilroy E.M., Birch P.R., Thilliez G.J., Lees A.K., Lynott J.S., Armstrong M.R., McKenzie G., Bryan G.J., Hein I.* Utilizing “omic” technologies to identify and prioritize novel sources of resistance to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans* in potato germplasm collections // *Front. Plant Sci.* 2016. V. 7. P. 672.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00672>
16. *Vleeshouwers V.G.A.A., Raffaele S., Vossen J.H., Champouret N., Oliva R., Segretin M.E., Rietman H., Cano L.M., Lokossou A., Kessel G., Pel M.A., Kamoun S.* Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2011. V. 49. P. 507.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095326>
17. *Vossen J.H., Jo K.-R., Vosman B.* Mining the genus *Solanum* for increasing disease resistance. *Genomics of Plant Genetic Resources*, Vol. 2. Crop Productivity, Food Security and Nutritional Quality / Eds. Tuberosa R., Graner A., Frison E. Springer, 2014. P. 27.
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-7575-6>
18. *Dong S., Raffaele S., Kamoun S.* The two-speed genomes of filamentous pathogens: waltz with plants // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2015. V. 35. P. 57.
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2015.09.001>
19. *Fry W.E.* *Phytophthora infestans*: the itinerant invader; “late blight”: the persistent disease // *Phytoparasitica.* 2020. V. 48. P. 87.
<https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>
20. *Leesutthiphonchai W., Vu A.L., Ah-Fong A.M.V., Judelson H.S.* How does *Phytophthora infestans* evade control efforts? Modern insight into the late blight disease // *Phytopathol.* 2018. V. 108. P. 916.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0130-IA>
21. *Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J.* Pivoting the plant immune system from dissection to deployment // *Science.* 2013. V. 341. P. 746.
<https://doi.org/10.1126/science.1236011>
22. *Wang Y., Tyler B.M., Wang Y.* Defense and counterdefense during plant-pathogenic oomycete infection // *Annu. Rev. Microbiol.* 2019. V. 73. P. 667.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-120022>
23. *Cui H., Tsuda K., Parker J.E.* Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2015. V. 66. P. 487
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>
24. *Białas A., Zess E.K., De la Concepcion J.C., Franceschetti M., Pennington H.G., Yoshida K., Upson J.L., Chanclud E., Wu C.H., Langner T., Maqbool A., Varden F.A., Derevnina L., Belhaj K., Fujisaki K. et al.* Lessons in effector and NLR biology of plant-microbe systems // *Mol. Plant-Microbe Interact.* 2018. V. 31. P. 34.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-08-17-0196-FI>
25. *Wang W., Jiao F.* Effectors of *Phytophthora* pathogens are powerful weapons for manipulating host immunity // *Planta.* 2019. V. 250. P. 413.
<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03219-x>
26. *Boevink P.C., Birch P.R.J., Turnbull D., Whisson S.C.* Devastating intimacy: the cell biology of plant–*Phytophthora* interactions // *New Phytol.* 2020.
<https://doi.org/10.1111/NPH.16650>
27. *Bradshaw J.E.* Review and analysis of limitations in ways to improve conventional potato breeding introgression of R genes in potato genomes by remote crosses and trans/cis-genesis // *Potato Res.* 2017. V. 60. P. 171.
<https://doi.org/10.1007/s11540-017-9346-z>
28. *Hardigan M.A., Laimbeer F.P.E., Newton L., Crisovan E., Hamilton J.P., Vaillancourt B., Wiegert-Rininger K., Wood J.C., Douches D.S., Farré E.M., Veilleux R.E., Buell C.R.* Genome diversity of tuber-bearing *Solanum* uncovers complex evolutionary history and targets of domestication in the cultivated potato // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114: e9999.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1714380114>
29. *Ghislain M., Douches D.S.* The genes and genomes of the potato // *The Potato Crop* / Eds. Campos H., Ortiz O. Cham: Springer, 2020. P. 139.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-28683-5_5
30. *Vossen J.H., Dezhsetan S., Esselink D., Arens M., Sanz M.J., Verweij W., Verzauw E., van der Linden C.G.* Novel applications of motif-directed profiling to identify disease resistance genes in plants // *Plant Methods.* 2013. V. 9. P. 37. <https://www.plantmethods.com/content/9/1/37>
31. *Bethke P.C., Halterman D.H., Jansky S.H.* Potato germplasm enhancement enters the genomics era // *Agronomy.* 2019. V. 9. P. 575.
<https://doi.org/10.3390/agronomy9100575>
32. *Mundt C.C.* Pyramiding for resistance durability: Theory and practice // *Phytopathol.* 2018. V. 108. P. 792.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>
33. *Draffehn A.M., Li L., Krezdorn N., Ding J., Lübeck J., Strahwald J., Muktar M.S., Walkemeier B., Rotter B., Gebhardt C.* Comparative transcript profiling by SuperSAGE identifies novel candidate genes for controlling potato quantitative resistance to late blight not compromised by late maturity // *Front. Plant Sci.* 2013. V. 4. P. 423.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00423>
34. *Jupe F., Witek K., Verweij W., Sliwka J., Pritchard L., Etherington G.J., Maclean D., Cock P.J., Leggett R. M., Bryan G. J., Cardle L., Hein I., Jones J.D.G.* Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations // *Plant J.* 2013. V. 76. P. 530.
<https://doi.org/10.1111/tpj.12307>
35. *Witek K., Jupe F., Witek A.I., Baker D., Clark M.D., Jones J.D.G.* Accelerated cloning of a potato late blight–resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing // *Nature Biotechnol.* 2016. V. 34. P. 656.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3540>
36. *Gaiero P., Speranza P., de Jong H.* Introgressive hybridization in potato revealed by novel cytogenetic and genomic technologies // *Am. J. Potato Res.* 2018. V. 95. P. 607.
<https://doi.org/10.1007/s12230-018-9669-6>
37. *Armstrong M.R., Vossen J., Lim T.Y., Hutten R.C.B., Xu J., Strachan S.M., Harrower B., Champouret N., Gilroy E.M.,*

- Hein I. Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing // *Plant Biotech. J.* 2019. V. 17. P. 540.
<https://doi.org/10.1111/pbi.12997>
38. Thilliez G.J., Armstrong M.R., Lim T.Y., Baker K., Jouet A., Ward B., van Oosterhout C., Jones J.D.G. Huitema E., Birch P.R.J., Hein I. Pathogen enrichment sequencing (PenSeq) enables population genomic studies in oomycetes // *New Phytol.* 2019. V. 221. P. 1634.
<https://doi.org/10.1111/nph.15441>
 39. Khavkin E.E. Potato late blight as a model of pathogen-host plant coevolution // *Russ. J. Plant Physiol.* 2015. V. 62. P. 408.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715030103>
 40. Zipfel C. Plant pattern-recognition receptors // *Trends in Immunology.* 2014. V. 35. P. 345.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2014.05.004>
 41. Kourelis J., van der Hoorn R.A.L. Defended to the Nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function // *Plant Cell.* 2018. V. 30. P. 285.
<https://doi.org/10.1105/tpc.17.00579>
 42. Liang X., Zhou J. M. Receptor-like cytoplasmic kinases: central players in plant receptor kinase-mediated signaling // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2018. V. 69. P. 267.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040540>
 43. Yu X., Feng B., He P., Shan L. From chaos to harmony: responses and signaling upon microbial pattern recognition // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2017. V. 55. P. 109.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035649>
 44. Du J., Tian Z., Liu J., Vleeshouwers V.G., Shi X., Xie C. Functional analysis of potato genes involved in quantitative resistance to *Phytophthora infestans* // *Mol. Biol. Rep.* 2013. V. 40. P. 957.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2137-3>
 45. Mosquera T., Alvarez M.F., Jiménez-Gómez J.M., Mukhtar M.S., Paulo M.J., Steinemann S., Li J., Draffehn A., Hofmann A., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferber H.R., Walkemeier B., Gebhardt C. Targeted and untargeted approaches unravel novel candidate genes and diagnostic SNPs for quantitative resistance of the potato (*Solanum tuberosum* L.) to *Phytophthora infestans*, causing the late blight disease // *PLoS One.* 2016. V. 11: e0156254.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156254>
 46. Fawke S., Doumane M., Schornack S. Oomycete interactions with plants: infection strategies and resistance principles // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2015. V. 79. P. 263.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00010-15>
 47. Toruño T.Y., Stergiopoulos I., Coaker G. Plant-pathogen effectors: Cellular probes interfering with plant defenses in spatial and temporal manners // *Annu Rev Phytopathol.* 2016. V. 54. P. 419.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100204>
 48. Couto D., Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants // *Nat. Rev. Immunol.* 2016. V. 16. P. 537.
<https://doi.org/10.1038/nri.2016.77>
 49. Flor H.H. Current status of the gene-for-gene concept // *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971. V. 9. P. 275.
 50. van Wersch S., Li X. Stronger when together: Clustering of plant *NLR* disease resistance genes // *Trends Plant Sci.* 2019. V. 24. P. 688.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.005>
 51. Andrivon D. The hard life of *Phytophthora infestans*: when trade-offs shape evolution in a biotrophic plant pathogen // *Plant Pathol.* 2013. V. 62. P. 28.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12164>
 52. Pasco C., Montarry J., Marquer B., Andrivon D. And the nasty ones lose in the end: foliar pathogenicity trades off with asexual transmission in the Irish famine pathogen *Phytophthora infestans* // *New Phytol.* 2016. V. 209. P. 334.
<https://doi.org/10.1111/nph.13581>
 53. Upson J.L., Zess E.K., Białas A., Wu C.H., Kamoun S. The coming of age of EvoMPMI: evolutionary molecular plant-microbe interactions across multiple timescales // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2018. V. 44. P. 108.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.03.003>
 54. Young G.K., Cooke L.R., Watson S., Kirk W.W., Perez F.M., Deahl K.L. The role of aggressiveness and competition in the selection of *Phytophthora infestans* populations // *Plant Pathol.* 2018. V. 67. P. 1539.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12856>
 55. Haas B.J., Kamoun S., Zody M.C., Jiang R.H.Y., Handsaker R.E., Cano L.M., Grabherr M., Kodira C.D., Raffaele S., Torto-Alalibo T., Bozkurt T.O. Ah-Fong A.M., Alvarado L., Anderson V.L., Armstrong M.R. et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // *Nature.* 2009. V. 461. P. 393.
<https://doi.org/10.1038/nature08358>
 56. Fouche S., Plissonneau C., Croll D. The birth and death of effectors in rapidly evolving filamentous pathogen genomes // *Curr. Opin. Microbiol.* 2018. V. 46. P. 34.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.01.020>
 57. Duan Y., Duan S., Armstrong M.R., Xu J., Zheng J., Hu J., Chen X., Hein I., Li G., Jin L. Comparative transcriptome profiling reveals compatible and incompatible patterns of potato toward *Phytophthora infestans*. G3: Genes, Genomes // *Genetics.* 2020. V. 12. P. 1.
<https://doi.org/10.1534/g3.119.400818>
 58. Yin J., Gu B., Huang G., Tian Y., Quan J., Lindqvist-Kreuzer H., Shan W. Conserved RXLR effector genes of *Phytophthora infestans* expressed at the early stage of potato infection are suppressive to host defense // *Front. Plant Sci.* 2017. V. 8. P. 2155.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02155>
 59. Frantzeskakis L., Kusch S., Panstruga R. The need for speed: compartmentalized genome evolution in filamentous phytopathogens: Multiple “speeds” in phytopathogen genomes // *Mol. Plant Pathol.* 2019. V. 20. P. 3.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12738>
 60. Pais M., Yoshida K., Giannakopoulou A., Pel M.A., Cano L.M., Oliva R.F., Witek K., Lindqvist-Kreuzer H., Vleeshouwers V.G.A.A., Kamoun S. Gene expression polymorphism underpins evasion of host immunity in an asexual lineage of the Irish potato famine pathogen // *BMC Evol. Biol.* 2018. V. 18. P. 93.
<https://doi.org/10.1186/s12862-018-1201-6>

61. Knaus B., Tabima J., Shakya S., Judelson H., Grünwald N. Genome-wide increased copy number is associated with emergence of super-fit clones of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* // mBio. 2020. V. 11:e00326-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.00326-20>
62. Chen H., Chen H., Shu H., Wang L., Zhang F., Li X., Ochola S.O., Mao F., Ma H., Ye W., Gu T., Jiang T., Wu Y., Wang Y. et al. *Phytophthora* methylomes are modulated by 6mA methyltransferases and associated with adaptive genome regions // Genome Biol. 2018. V. 19. P. 181. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1564-4>
63. Birch P.R., Armstrong M., Bos J., Boevink P., Gilroy E.M., Taylor R.M., Wawra S., Pritchard L., Conti L., Ewan R., Whisson S.C., van West P., Sadanandom A., Kamoun S. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 1133. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern353>
64. Oh S.-K., Young C., Lee M., Oliva R., Bozkurt T.O., Cano L.M., Win J., Bos J.I.B., Liu H.-Y., van Damme M., Morgan W., Choi D., Van der Vossen E.A.G., Vleeshouwers V.G.A.A., Kamoun S. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein *Rpi-blb2* // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 2028. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068247>
65. Rietman H. Putting the *Phytophthora infestans* genome sequence at work; multiple novel avirulence and potato resistance gene candidates revealed. PhD thesis. Wageningen: Wageningen University, 2011. 169 p. <https://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/406778>
66. Vleeshouwers V.G., Oliver R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens // Mol. Plant-Microbe Interact. 2014. V. 27. P. 196. <https://doi.org/10.1094/MPMI-10-13-0313-IA>
67. Wang S., McLellan H., Bukharova T., He Q., Murphy F., Shi J., Sun S., van Weymers P., Ren Y., Thilliez G., Wang H., Chen X., Engelhardt S., Vleeshouwers V., Gilroy E.M. et al. *Phytophthora infestans* RXLR effectors act in concert at diverse subcellular locations to enhance host colonization // J. Exp. Bot. 2019. V. 70. P. 343. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery360>
68. Gibriel H.A.Y., Thomma B.P.H.J., Seidl M.F. The age of effectors: Genome-based discovery and applications // Phytopathol. 2016. V. 106. P. 1206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-16-0110-FI>
69. Boevink P.C., McLellan H., Gilroy E.M., Naqvi S., He Q., Yang L., Wang X., Turnbull D., Armstrong M.R., Tian Z., Birch P.R.J. Oomycetes seek help from the plant: *Phytophthora infestans* effectors target host susceptibility factors // Mol. Plant. 2016. V. 9. P. 636. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.04.005>
70. Naveed Z.A., Bibi S., Ali G.S. The *Phytophthora* RXLR effector Avrblb2 modulates plant immunity by interfering with Ca₂₊ signaling pathway // Front. Plant Sci. 2019. V. 10. P. 374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00374>
71. Turnbull D., Wang H., Breen S., Malec M., Naqvi S., Yang L., Welsh L., Hemsley P., Zhendong T., Brunner F., Gilroy E.M., Birch P.R.J. AVR2 targets BSL family members, which act as susceptibility factors to suppress host immunity // Plant Physiol. 2019. V. 180. P. 571. <https://doi.org/10.1104/pp.18.01143>
72. Ren Y., Armstrong M., Qi Y., McLellan H., Zhong C., Du B., Birch P.R.J., Tian Z. *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune signal transduction pathway // Plant Physiol. 2019. V. 180. P. 2227. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00625>
73. Black W., Mastenbroek C., Mills W.R., Peterson L.C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives // Euphytica. 1953. V. 2. P. 173.
74. Malcolmson J.F. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain // Trans. British Mycol. Soc. 1969. V. 53. P. 417. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(69\)80099-9](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(69)80099-9)
75. Bos J.I.B., Armstrong M.R., Gilroy E.M., Boevink P.C., Hein I., Taylor R.M., Tian Z., Engelhardt S., Vetukuri R.R., Harrower B., Dixelius C., Bryan G., Sadanandom A., Whisson S.C., Kamoun S. et al. *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107:9909–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914408107>
76. Halterman D.A., Chen Y., Sopee J., Berduo-Sandoval J., Sánchez-Pérez A. Competition between *Phytophthora infestans* effectors leads to increased aggressiveness on plants containing broad-spectrum late blight resistance // PLoS One. 2010. V. 5: e10536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010536>
77. Oliva R.F., Cano L.M., Raffaele S., Win J., Bozkurt T.O., Belhaj K., Oh S.-K., Thines M., Kamoun S. A recent expansion of the RXLR effector gene *Avrblb2* is maintained in global populations of *Phytophthora infestans* indicating different contributions to virulence // Mol. Plant-Microbe Interact. 2015. V. 28. P. 901. <https://doi.org/10.1094/MPMI-12-14-0393-R>
78. Gilroy E.M., Breen S., Whisson S.C., Squires J., Hein I., Kaczmarek M., Turnbull Boevink P.C., Lokossou A., Cano L.M., Morales J., Avrova A.O., Pritchard L., Randall E., Lees A. et al. Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between *PiAVR2* and *PiAVR2*-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants // New Phytol. 2011. V. 191. P. 763. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03736.x>
79. Du Y., Weide R., Zhao Z., Msimuko P., Govers F., Bouwmeester K. RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1 // Stud. Mycol. 2018. V. 89. P. 85. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.003>
80. Pel M.A. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato. PhD Thesis. Wageningen: Wageningen University,

2010. 209 p. <https://library.wur.nl/WebQuery/wur-pubs/392076>
81. *Stefańczyk E., Brylińska M., Brurberg M.B., Naerstad R., Elameen A., Sobkowiak S., Śliwka J.* Diversity of *Avr-vnt1* and *AvrSmira1* effector genes in Polish and Norwegian populations of *Phytophthora infestans* // *Plant Pathol.* 2018. V. 67. P. 1792. <https://doi.org/10.1111/ppa.12875>
 82. *Yang L., Ouyang H.B., Fang Z.G., Zhu W., Wu E.J., Luo G.H., Shang L.P., Zhan J.* Evidence for intragenic recombination and selective sweep in an effector gene of *Phytophthora infestans* // *Evol. Appl.* 2018. V. 11. P. 1342. <https://doi.org/10.1111/eva.12629>
 83. *Lin X., Song T., Fairhead S., Witek K., Jouet A., Jupe F., Witek A.I., Vleeshouwers V.G.A.A., Hein I., Jones J.D.G.* Identification of *Avramr1* from *Phytophthora infestans* using long read and cDNA pathogen-enrichment sequencing (PenSeq) // *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.14.095158>
 84. *Gebhardt C.* Bridging the gap between genome analysis and precision breeding in potato // *Trends Genet.* 2013. V. 29. P. 248. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.006>
 85. *Tiwari J.K., Siddappa S., Singh B.P., Kaushik S.K., Chakrabarti S.K., Bhardwaj V., Chandel P.* Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: An update // *Plant Breed.* 2013. V. 132. P. 237. <https://doi.org/10.1111/pbr.12053>
 86. *Ramakrishnan A.P., Ritland C.E., Sevillano R.H.B., Riseman A.* Review of potato molecular markers to enhance trait selection // *Am. J. Potato Res.* 2015. V. 92. P. 455. <https://doi.org/10.1007/s12230-015-9455-7>
 87. *Li Y., Colleoni C., Zhang J., Liang Q., Hu Y., Ruess H., Simon R., Liu Y., Liu H., Yu G., Schmitt E., Ponitzki C., Liu G., Huang H., Zhan F. et al.* Genomic analyses yield markers for identifying agronomically important genes in potato // *Mol. Plant.* 2018. V. 11. P. 473. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.01.009>
 88. *Danan S., Veyrieras J.-B., Lefebvre V.* Construction of a potato consensus map and QTL meta-analysis offer new insights into the genetic architecture of late blight resistance and plant maturity traits // *BMC Plant Biol.* 2011. V. 11. P. 16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-16>
 89. *Witek K., Lin X., Karki H.S., Jupe F., Steuernagel B., Stam R., van Oosterhout C., Fairhead S., Cocker J.M., Bhanvadia S., Barrett W., Song T., Vleeshouwers V.G.A.A., Tomlinson L., Wulff B.B.H. et al.* A complex non-host resistance locus in *Solanum americanum* recognizes a conserved *Phytophthora* effector // *bioRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.15.095497>
 90. *The Potato Genome Sequencing Consortium.* Genome sequence and analysis of the tuber crop potato // *Nature.* 2011. V. 475. P. 189. <https://doi.org/10.1038/nature10158>
 91. *Jupe F., Pritchard L., Etherington G.J., Mackenzie K., Cock P.J., Wright F., Sharma S.K., Bolser D., Bryan G.J., Jones J.D.G., Hein I.* Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome // *BMC Genomics.* 2012. V. 13. P. 75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-75>
 92. *Kyriakidou M., Achakkagari S.R., López G.J.H., Zhu X., Tang C.Y., Tai H.H., Anglin N.L., Ellis D., Strömvik M.V.* Structural genome analysis in cultivated potato taxa // *Theor. Appl. Genet.* 2020. V. 133. P. 951. <https://doi.org/10.1007/s00122-019-03519-6>
 93. *Aversano R., Contaldi F., Ercolano M.R., Grosso V., Iorizzo M., Tatino F., Delledonne M.* The *Solanum commersonii* genome sequence provides insights into adaptation to stress conditions and genome evolution of wild potato relatives // *Plant Cell.* 2015. V. 27. P. 954. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135954>
 94. *Leisner C.P., Hamilton J.P., Crisovan E., Manrique-Carpintero N.C., Marand A.P., Newton L., Pham G.M., Jiang J., Douches D.S., Jansky S.H., Buell C.R.* Genome sequence of M6, a diploid inbred clone of the high-glycoalkaloid-producing tuber-bearing potato species *Solanum chacoense*, reveals residual heterozygosity // *Plant J.* 2018. V. 94. P. 562. <https://doi.org/10.1111/tbj.13857>
 95. *Aguilera-Galvez C., Champouret N., Rietman H., Lin X., Wouters D., Chu Z., Jones J.D.G., Vossen J.H., Vissers R.G.F., Wolters P.J., Vleeshouwers V.G.A.A.* Two different *R* gene loci co-evolved with *Avr2* of *Phytophthora infestans* and confer distinct resistance specificities in potato // *Studies Mycol.* 2018. V. 89. P. 105. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.01.002>
 96. *Slootweg E., Koropacka K., Roosien J., Dees R., Overmars H., Lankhorst R.K., van Schaik C., Pomp R., Bouwman L., Helder J., Schots A., Bakke J., Smant G., Goverse A.* Sequence exchange between homologous NB-LRR genes converts virus resistance into nematode resistance, and vice versa // *Plant Physiol.* 2017. V. 175. P. 498. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00485>
 97. *Gyetvai G., Sønderkær M., Göbel U., Basekow R., Ballvora A., Imhoff M., Kersten B., Nielsen K.-L., Gebhardt C.* The transcriptome of compatible and incompatible interactions of potato (*Solanum tuberosum*) with *Phytophthora infestans* revealed by DeepSAGE analysis // *PLoS ONE.* 2012. V. 7: e31526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031526>
 98. *Frades I., Abreha K.B., Proux-Wéra E., Lankinen Å., Andreasson E., Alexandersson E.* A novel workflow correlating RNA-seq data to *Phytophthora infestans* resistance levels in wild *Solanum* species and potato clones // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 718. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00718>
 99. *Chen X., Lewandowska D., Armstrong M.R., Baker K., Lim T.-Y., Bayer M., Harrower B., McLean K., Jupe F., Witek K., Lees A.K., Jones J.D., Bryan G.J., Hein I.* Identification and rapid mapping of a gene conferring broad spectrum late blight resistance in the diploid potato species *Solanum verrucosum* through DNA capture technologies // *Theor. Appl. Genet.* 2018. V. 131. P. 1287. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3078-6>
 100. *Gu B., Cao X., Zhou X., Chen Z., Wang Q., Liu W., Chen Q., Zhao H.* The histological, effectoromic, and transcriptomic analyses of *Solanum pinnatisectum* reveal an upregulation of multiple *NBS-LRR* genes suppressing *Phytophthora infestans* infection // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 3211. <https://doi.org/10.3390/ijms21093211>

101. Zhu S., Vossen J.H., Bergervoet M., Nijenhuis M., Kodde L., Kessel G.J.T., Vleeshouwers V., Visser R.G.F., Jacobsen E. An updated conventional- and a novel GM potato late blight R gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans* // *Euphytica*. 2015. V. 202. P. 219.
<https://doi.org/10.1007/s10681-014-1276-0>
102. Birch P.R.J., Boevink P.C., Gilroy E.M., Hein I., Pritchard L., Whisson S.C. Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2008. V. 11. P. 373.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.04.005>
103. Van de Wouw A.P., Idnurm A. Biotechnological potential of engineering pathogen effector proteins for use in plant disease management // *Biotechnol. Adv.* 2019. V. 37: e10738.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.009>
104. Jiang R., Li J., Tian Z., Du J., Armstrong M., Baker K., Tze-Yin Lim J., Vossen J.H., He H., Portal L., Zhou J., Bonierbale M., Hein I., Lindqvist-Kreuze H., Xie C. Potato late blight field resistance from QTL dPI09c is conferred by the NB-LRR gene *R8* // *J. Exp. Bot.* 2018. V. 69. P. 1545.
<https://doi.org/10.1093/jxb/ery021>
105. Grünwald N.J., Flier W.G. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin // *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. V. 43. P. 171.
<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135906>
106. Stam R., McDonald B.A. When resistance gene pyramids are not durable — the role of pathogen diversity // *Mol. Plant Pathol.* 2018. V. 19. P. 521.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12636>
107. Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Межвидовые гибриды картофеля как доноры долговременной устойчивости к патогенам // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017. Т. 21. С. 30.
<https://doi.org/10.18699/VJ17.221>
108. Halterman D.A., Jansky S.H., Spooner D.M. Discovery of new sources of disease resistance using wild potato germplasm // *Am. J. Potato Res.* 2017. V. 94. P. 211.
<https://doi.org/10.1007/s12230-017-9581-5>
109. Ghislain M., Byarugaba A.A., Magembe E., Njoroge A., Rivera C., Román M.L., Tovar J.C., Gamboa S., Forbes G.A., Kreuze J.F., Barekye A., Kiggundu A. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races // *Plant Biotech. J.* 2019. V. 17. P. 1119.
<https://doi.org/10.1111/pbi.13042>
110. Halford N.G. Legislation governing genetically modified and genome-edited crops in Europe: the need for change // *J. Sci. Food Agricult.* 2019. V. 99. P. 8.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.9227>
111. Haesaert G., Vossen J. H., Custers R., De Loose M., Haverkort A., Heremans B., Hutten R., Kessel G., Landschoot S., Van Droogenbroeck B., Visser R.G.F., Gheysen G. Transformation of the potato variety Desiree with single or multiple resistance genes increases resistance to late blight under field conditions // *Crop Protect.* 2015. V. 77. P. 163.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.018>
112. Kessel G.J.T., Mullins E., Evenhuis A., Stellingwerf J., Cortes V.O., Phelan S., van den Bosch T., Förch M.G., Goedhart P., van der Voeta H., Lotz L.A.P. Development and validation of IPM strategies for the cultivation of cisgenically modified late blight resistant potato // *Eur. J. Agron.* 2018. V. 96. P. 146.
<https://doi.org/10.1016/j.eja.2018.01.012>
113. Fadina O.A., Beketova M.P., Sokolova E.A., Kuznetsova M.A., Smetanina T.I., Rogozina E.V., Khavkin E.E. Anticipatory breeding: molecular markers as a tool in developing donors of potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight resistance from complex interspecific hybrids // *Agr. Biol.* 2017. V. 52. P. 84.
<https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.1.84eng>