

632.4:634.8:577.21

СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ УСТОЙЧИВОСТИ РАСТЕНИЙ К ГРИБКОВЫМ ПАТОГЕНАМ НА ПРИМЕРЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА VITIS

Н.А. Рябушкина

РГП «Институт биологии и биотехнологии растений», г. Алматы
natrya7@yahoo.com

В обзоре приведено современное представление основ иммунитета растений, основывающееся на двух составляющих: базовой устойчивости, основанной на реакциях растения на общие для многих микроорганизмов вещества-элиситоры, и устойчивости, выработанной на эфффекторы патогенов. Большинство культивируемых сортов винограда наиболее чувствительны к патогенам оомицету *Plasmopara viticola*, аскомицету *Erysiphe necator*, аскомицету *Botrytis cinerea*, наносящим серьезный экономический ущерб. С использованием молекулярно-генетических подходов выявлен ряд генов устойчивости к данным патогенам у североамериканских и азиатских представителей рода *Vitis*. Созданы генетические карты и молекулярные маркеры, позволяющие локализовать гены устойчивости в группах сцепления. На ряде примеров описана последовательность иммунных реакций, передачи сигналов, экспрессии ряда факторов транскрипции, синтеза гормонов, ферментов и фитоалексинов винограда на инокуляцию соответствующих патогенов. Эти подходы являются основой для выявления новых кандидатов генов с целью их пирамидирования для пролонгирования устойчивости *V. vinifera* к патогенам. Исследователи разрабатывают также альтернативную стратегию устойчивости к патогенам посредством восстановления базовой устойчивости.

Ключевые слова: иммунная система растений, *Vitis*, ложная мучнистая роса, мучнистая роса, серая плесень, гены устойчивости.

Иммунная система растений

В среде, окружающей растения, обитает множество бактерий, грибов, вирусов и др. При этом растения, зачастую, благополучно процветают. Следовательно, большинство растений устойчивы к большинству потенциально патогенных микроорганизмов. Тем не менее, одной из серьезных проблем сельского хозяйства является экономический ущерб, наносимый культурным растениям патогенами. С одной стороны это определяется потенциальной способностью микроорганизмов преодолевать иммунную защиту растений и адаптивностью к химическим средствам защиты. С другой – традиционным селекционным отбором культурных растений, который ведется в первую очередь по показателям стабильной урожайности и качества. Иммунитет растений проявляется как «нечувствительность к инфекции». Согласно современным представлениям, иммунная система растений представлена двумя формами [1], [2], либо состоит из двух ветвей [3], или же представляет собой единую сеть, «секторы» которой взаимодействуют в зависимости от необходимости защиты от непатогенных или патогенных микроорганизмов [4].

По мере преодоления микроорганизмами внешних барьеров растения: кутикулярного, суберинового слоя, клеточной стенки – клетка должна «почувствовать» опасность и включить систему реагирования. Растение распознает определенные молекулы (элиситоры), присущие микроорганизмам (MAMPs, *microbe-associated molecular patterns*), как сигнал, запускающий иммунную защиту. К настоящему времени уже выявлен ряд соединений: флагелин, фактор элонгации бактерий, хитин, глюкан, ксиланаза, некоторые липофильные соединения, такие как арахидоновая кислота и эргостерол [2]. Отдельные из этих элиситоров присущи многим микробам и могут быть консервативны для непатогенных и патогенных микробов. Сигнал может порождаться и веществами, появляющимися в результате повреждений, вызываемых микробами, в частности, фрагментами кутикулы и клеточной стенки (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*). Сигналы, поступающие от MAMPs/DAMPs, воспринимаются клеткой посредством рецепторов (PRRs, *pattern recognition receptors*), киназ, богатых повторностями лейцина (LRR-RK, *leucine-rich repeat-receptor kinase*), запускающих систему иммунной защиты [6]. Этот тип базовой или горизонтальной устойчивости (PTI, *pattern-triggered immunity*) инициируется непатогенами и потенциальными патогенами. До определенного времени значимость восприятия растениями микробов с помощью рецепторов оценивалась скептически, однако в экспериментах было показано, что отсутствие этого восприятия приводило к повышенной чувствительности к болезни [7]. Более того, в некоторых случаях PTI, запускаемая как с помощью элиситора - бактериального

флагелина, так и эффектора авирулентности *Pseudomonas syringae* зависела от общих элементов сигнальной структуры [8].

Boller, Felix [2] описали следующую последовательность событий при действии элиситоров. В ответ на узнавание рецепторами элиситоров в течение нескольких минут изменяются потоки ионов через клеточную мембрану. Повышается концентрация Ca^{2+} в цитоплазме, который является вторичным мессенджером [9] и активирует кальций-зависимые протеин киназы (MAPKs, *mitogen-associated protein kinases*) [10], передающие сигналы в процессе фосфорилирования/дефосфорилирования. Повышается уровень реактивных форм кислорода и происходит так называемый окислительный выброс. Активные формы кислорода действуют как антибиотические агенты и могут служить также вторичными стресс-сигналами, индуцируя защитные реакции растения. В течение первых 10 минут активируется синтез стрессовых гормонов. Примечательно, что обработка различными элиситорами: флагелином, бактериальным фактором элонгации – через полчаса вызвала практически идентичную индукцию почти 1000 и подавление примерно 200 генов. Проявлением позднего ответа (часы-дни) может быть активация синтеза и накопление каллозы. Итог – переключение программы роста на систему иммунной защиты [2].

Согласно Dodds, Rathjen [3], узнавание рецепторами микробных элиситоров – это запуск базовой защиты против микроорганизмов. Однако в ходе взаимоотношений растение – микроорганизм определенные микробы приобретают способность распознавать соответствующие рецепторы растительной клетки и подавлять базовый иммунный ответ с помощью белков-эффекторов. В свою очередь в растениях в ходе коэволюции могут «появиться» гены устойчивости (PRs, *pathogenesis related*), белки которых распознают эффекторы патогена и индуцируют новый тип иммунной защиты (ETI, *effector-triggered immunity*) – против адаптированных патогенов. Конкретная инфекция определяет взаимоотношение этих двух стратегий. Так, в экспериментах на мутантах арабидопсиса было показано, что четыре сигнальных сектора, отсутствующие в мутанте, а именно гены DDE2, EIN2, SID2, PAD4, значимые для биосинтеза жасмоната, этилена и салицилата взаимодействуют синергетически в случае РТИ и компенсаторно при ETI [4],[8]. Переключение секторов может зависеть как от природы эффекторов, так и от уровня гормонов, вовлеченных в сигнальную сеть. Различия в транскрипционной активации генов – скорее количественные и временные: сигналы, зависящие от генов устойчивости более быстрые, усиленные и скоротечные по сравнению с более постоянными, но замедленными при базовой защите [11].

Большинство растительных защитных белков содержат серию LRRs, нуклеотид-связывающий сайт (NBS, *nucleotide-binding site*) и терминальный сигнальный домен [12], [13]. Если у растения в наличии только один высокозначимый PR-ген, патогену легче преодолеть такую устойчивость. Так, новый изолят *P. viticola* преодолел устойчивость сорта винограда 'Bianca', обусловленную главным (мажорным) геном Rpv3 [14]. Поэтому пирамидирование генов устойчивости в растениях предполагает более продолжительную наследуемую защиту [15]. Генетический анализ предоставляет информацию об относительном вкладе каждого количественного признака в общую устойчивость генотипа и выявляет аддитивное, эпистатическое и др. взаимодействия локусов количественных признаков (ЛКП), реализуемых в различных местообитаниях. Пирамидирование генов, основанное на понимании и использовании различных обуславливаемых ими механизмов устойчивости, по мнению исследователей, будет приобретать все большее значение для эффективной селекции, препятствующей преодолению патогенами барьеров устойчивости.

Распознавание сигнала опасности осуществляется клеткой растения в местах контакта с микроорганизмом. Определенные носители сигнала из инфицированных клеток могут запускать системный приобретенный защитный ответ (SAR, *systemic acquired response*) в здоровых неинфицированных тканях растения, что позволяет всему растению подготовиться к отражению атаки [16]. SAR проявляется через изменение потока ионов, в том числе кальция через мембрану, окислительный выброс, фосфорилирование белков, гиперчувствительный ответ (HR, *hypersensitive response*), сопровождающийся некрозом в месте инфекции, предотвращающим распространение патогена, изменение гормонального статуса, накопление белков, имеющих отношение к патогенезу, и накопление антимикробных соединений – фитоалексинов. Показано, что белки-продукты PRs генов могут обладать гидролитической активностью, представляя семейство хитиназ, глюканаз, рибонуклеаз и др., а также ингибиторов протеиназ. Характерно, что индуцибельные, связанные с патогенезом кислые белки, зачастую секретируются в межклеточное пространство листа. Системная устойчивость при взаимодействии с патогенами предполагает локальный некроз клеток растения. Взаимоотношения с непатогенной микрофлорой, например, микроорганизмами ризосферы, приводят к индуцируемому системному ответу (ISR, *induced systemic response*) и не сопровождаются гибелью клеток хозяина. Сигнальные молекулы этих микроорганизмов распознаются рецепторами, что в итоге может приводить к развитию устойчивости против многих патогенов [17]. Изучая молекулярную картину ISR на арабидопсисе,

исследователи показали существенное подобие между ISR и SAR, в том числе в накоплении продуктов фенилпропаноидного пути, сесквитерпеноидов и др. [18].

Предобработка (прайминг) растений элиситорами, эффекторами патогенов, авирулентными штаммами, инокуляцией микробами-симбионтами, определенными природными и синтетическими соединениями, поранение тканей индуцирует быструю иммунную реакцию растения на последующую атаку патогенов на низкий уровень сигнала патогена [19]. Прайминг проявляется в накоплении активных форм кислорода, в синтезе *de novo* защитных гормонов салицилата и жасмоната, повышении экспрессии передающих сигналы белков MAPKs и факторов транскрипции, образования каллозы [20]. Исследования говорят в пользу эпигенетического наследования состояния ISR, возможно, выражающегося в снижении метилирования определенных регуляторных генов. Эпигенетический контроль может быть использован для отбора индуцированных праймингом эпи-аллелей. Для винограда показано, что обработка листьев сульфатом β -1,3-глюкана, экстрактами мицелиума, эргостеролом и др., запускает активацию сигнальных путей Ca^{2+} , накопление активных форм кислорода, жасмоната и салицилата, MAPKs-активность, индукцию класса 3 хитиназ, класса 2 глюконаз, белков, переносящих липиды и синтез фитоалексинов [21]. Липидный элиситор эргостерол индуцирует в винограде синтез ферментов, имеющих отношение к накоплению стилбенов. Стилбены, основные фитоалексины винограда, накапливающиеся при действии патогенов, могут служить биохимическими маркерами устойчивости [22].

Молекулярные подходы в выявлении носителей устойчивости к грибковым патогенам у представителей рода *Vitis*

Виноград – наиболее экономически значимая плодово-ягодная культура в мире. Самыми вредоносными для культуры *V. vinifera* (2n=38) являются биотрофные паразиты: возбудитель ложной мучнистой росы оомицет *Plasmopara viticola*, мучнистой росы аскомицет *Erysiphe necator* (syn. *Uncinula necator*, анаморф *Oidium tuckeri*) и возбудитель серой плесени аскомицет *Botrytis cinerea* [21]. Завезенные на посадочном материале в 19-ом веке в Европу из Северной Америки, эти патогены распространились во все регионы возделывания винограда. В Евросоюзе более 85% используемых в виноградарстве пестицидов приходится на фунгициды [23]. Стратегия создания новых устойчивых сортов базируется на поиске генов устойчивости, выяснении механизмов устойчивости и длительности сохранения признака в полевых условиях. Источники признаков устойчивости – североамериканские виды, приобретшие в результате ко-эволюции с возбудителями определенные гены устойчивости: *V. cinerea* и *V. rupestris*, а также сложные гибриды видов *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. labrusca*, *V. lincecumii*, *V. riparia* и *V. rupestris* и представители рода *Muscadinia* [24]. Кроме того, выявлены источники устойчивости, вовлеченные в современные сорта винограда в регионе Черного моря, Армении, Иране, Средней Азии [25].

Использование молекулярных маркеров, связанных с ЛКП, облегчает селекционный процесс. Это достигается различными комплементарными путями [26], один из которых – создание генетических карт на основе признак-маркер сегрегирующих популяций. Маркерные аллели, положительно коррелирующие с признаком интереса, могут быть использованы для селекции. Второй подход основан на изучении генетического разнообразия с использованием (SSR, *simple sequence repeat*) и (SNP, *single nucleotide polymorphism*) маркеров с целью обнаружения связей между специфическими генетическими вариантами и ЛКП. Третий подход – изучение дифференциальной экспрессии генов для идентификации генов-кандидатов признаков интереса. Одновременное использование маркеров для целого ряда локусов (пирамидирование) позволяет выявлять в одном генотипе несколько носителей признака [27].

В высоко гетерозиготном геноме винограда наиболее представлены два подкласса NBS-LRR класса генов, имеющих отношение к устойчивости [28]. На основании анализа доменов устойчивости с использованием сорта 'Pinot Noir' было выявлено 233 NBS гена, несущих LRR домен, 37 TIR-NBS-LRR генов и др. Выявление в неустойчивом к патогенам 'Pinot Noir' множества генов, имеющих отношение к устойчивости, по мнению исследователей, указывает на то, что определяющие устойчивость аллели NBS-LRR генов не были вовлечены в селекцию или были утрачены в ходе отбора на признаки урожайности и качества.

Устойчивость к *Plasmopara viticola*. Картирующая популяция, полученная при скрещивании устойчивого сорта 'Regent' и неустойчивого 'Lemberger', оценивалась в полевых условиях на устойчивость к патогенам *P. viticola* и *E. necator* [29]. Интегрированная с ранее созданными карта покрывала 1,631 cM и включала 398 маркеров. Для устойчивости к ложной мучнистой росе (JMР) были выявлены два ЛКП, главный в группе сцепления 18 и минорный – в группе сцепления 4. Мажорный ЛКП к мучнистой росе (MP) был локализован в группе сцепления 15. В этой же области были локализованы несколько аналогов генов устойчивости (RGA, *resistance gene analogue*), возможно, также имеющих отношение к проявлению признака. Так, в *V. amurensis* и *V.*

riparia были определены, по крайней мере, 12 NBS-последовательностей, высоко гомологичных с известными PR-генами арабидопсиса и табака. Одна из этих NBS проб показала очевидные различия между устойчивыми и чувствительными сортами винограда [30]. Анализ сегрегирующей популяции выявил эффект локуса, обуславливающего устойчивость винограда *Muscadina rotundifolia* к ЛМР [31]. 1 RAPD, 4 ISSR и 8 SSR маркеров показали значимый эффект с уровнем устойчивости, 12 из них были локализованы в одной группе сцепления в области 45 сМ. ЛКП обуславливал 83% варибельности. Примечательно, что выявленный главный ген, обуславливающий устойчивость к ЛМР, названный Rpv1, был тесно связан с доминантным геном устойчивости к МР, Run1.

В экспериментах при инокуляции *P. viticola* листьев устойчивого представителя *V. riparia* 'Gloire de Montpellier' и чувствительного сорта 'Riesling' в первом случае были выделены иРНК семи транскриптов, которые в соответствии с гомологией были поделены на три группы: VRP1, VRP2 и VRP3 представителей класса CC-NBS-LRR [32]. Авторами была показана существенная индукция экспрессии генов VRP1-1,1-2 and 1-3, при том, что уровень соответствующих иРНК в 'Gloire de Montpellier' был высок и до заражения. Гены были изолированы, идентифицированы, охарактеризованы и картированы. Несмотря на наличие небольших вставок и делеций, различия всех трех гомологичных генов VRP1 были обусловлены длиной интрона 1. Гены были позиционированы в группе сцепления 10. Между ними не было выявлено рекомбинаций. Сравнение гомологичных последовательностей генов VRP1 устойчивого сорта 'Regent' и чувствительного 'Pinot noir' выявило только две замены аминокислот в LRR-области в положении 147 (серин на тирозин) и 644 (метионин на лейцин).

Исследователи относят *V. riparia* к одному из основных источников устойчивости к *P. viticola*. Сравнительный анализ уровней транскрипции на фоне инфицирования *P. viticola* устойчивого *V. riparia* и чувствительного *V. vinifera* показал, что выявленные различия не были обусловлены базовым уровнем транскрипции в испытуемых сортах [33]. Изменения транскрипции сравнивали после 12 часов (время, когда с помощью микроскопии выявлялись признаки устойчивости у *V. riparia*) и 24 часов от начала инфицирования. Так, у *V. riparia* по сравнению с *V. vinifera* существенно и специфически повышался уровень экспрессии PR-белков, ферментов биосинтеза фенилаланина. Более 68% генов в сигнальной трансдукции: представителей кальций-, этилензависимых путей, отдельные гены MAPKs, фосфатаз, рецептор-подобных белков, отдельных факторов транскрипции WRKY – индуцировались только в устойчивом сорте. Характерно, что факторы транскрипции WRKY связываются участками ДНК, так называемыми W-боксами (W-boxes) и активируют/подавляют гены, связанные с устойчивостью [34]. Анализ показал индуцирование экспрессии определенных генов гликолиза, пентозофосфатного пути и цикла Кребса для очевидного обеспечения как энергией, так и предшественниками биосинтеза ароматических аминокислот. Гиперчувствительный ответ был также показан только для *V. riparia*. Экспрессия генов, кодирующих ферменты синтеза жасмоната, существенно повышалась через 12 часов, а уровень жасмоната и метилжасмоната достигал максимума через 48 часов после инфицирования. По определению исследователей, полученные результаты являются подтверждением того, что устойчивость *V. riparia* является постинфекционным феноменом, характеризующимся быстрой передачей сигналов, за которой следуют сдвиги в первичном и вторичном метаболизме, что обеспечивает защиту от патогена. Используя генетические карты родителей, реакцию на инфицирование *P. viticola* и генетический контроль признаков устойчивости выявляли на листовых дисках, на растениях в контролируемых экспериментальных и в полевых условиях, полученных от скрещивания устойчивого сорта 'Bianca' (имеющего в своей родословной *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. cinerea*, *V. lincedumii* и *V. rupestris*) и чувствительного сорта 'Chardonnay' [35]. Первым видимым проявлением был некроз в местах инфекции у потенциально устойчивых растений, который существенно сдерживал дальнейшее развитие инфекции. Пики количественных признаков, проявляющихся в степени колонизации мезофилла, плотности споруляции и степени развития симптомов были связаны с локусом Rpv3. Этот локус локализован на коротком плече хромосомы 18 в области, богатой NB-LRR генами. Наличие Rpv3 гаплотипа объясняло 75% генотипической варибельности устойчивости к ЛМР в картирующих популяциях. При использовании листовых дисков количественный признак с наибольшим фенотипическим проявлением был выявлен на 18-й хромосоме 'Bianca' в доверительном интервале локализации гена HR. Область, ответственная за споруляцию, была обусловлена ЛКП с доверительным интервалом 2.9 сМ, точно перекрывающимся с маркерами, ближайшими к локусу HR. Варибельность в плотности спорангиофоров была связана с ЛКП с доверительным интервалом 3.9 сМ, полностью перекрывающим локус HR. Дополнительные минорные локусы были выявлены на хромосоме 7 (варибельность спорангиев на единицу площади) и на хромосоме 5 (степень инвазии мезофилла). Сравнительная оценка реакции растений в контролируемых условиях и на фоне естественных инфекций в полевых условиях подтвердила, что наличие Rpv3 аллели 'Bianca' существенно снижало уровень заражения.

Rpv3 рассматривается одним из основных детерминантов устойчивости к ЛМР. Но тот факт, что устойчивые диплоиды, например, 'Regent' и 'Bianca', иногда оказывались дефективными по отношению к некоторым вирулентным штаммам, может указывать на расоспецифичность признака [36]. Для прояснения этой ситуации листовые диски устойчивой гетерозиготы 'Bianca' (Rpv3⁺/Rpv3) и чувствительной гомозиготной линии '100-333' (Rpv3⁻/Rpv3⁻) одна аллель из 'Chardonnay' были инокулированы двумя изолятами (avrRpv3⁺ и avrRpv3⁻) патогена *P. viticola* для последующего сравнения профилей экспрессии [37]. На основании литературных данных исследователями было отобрано всего 33 гена, связанных с восприятием патогена, необходимых для передачи сигналов, кодирующих белки, имеющие отношение к патогенезу, факторы транскрипции WRKY и гены, связанные с HR. В результате было показано, что устойчивость зависела от специфического, а не конститутивного ответа. Гиперчувствительная реакция была только у линии Rpv3⁺/Rpv3⁻, инфицированной штаммом avrRpv3⁺. Локальный некроз сопровождался повышением транскрипции гена HSR1, связанного с гиперчувствительным ответом, и генами PR-1 и PR-2, связанными с патогенезом, а также генами, индуцируемыми салициловой кислотой. Активация их экспрессии предшествовала визуализации гиперчувствительного ответа.

Генотипирование 265 европейских сортов, 82 образцов диких видов и 233 североамериканских линий выявило 7 гаплотипов локуса Rpv3 [38]. Фактически эти гаплотипы есть результат 150-летней селекции, и источником устойчивости к данному патогену являлись североамериканские виды, среди них *V. rupestris*, *V. labrusca* и *V. riparia*. Следует отметить, что для NB-LRR генов характерны локальные дубликации, результатом чего является большое количество аллелей/паралогов устойчивости к болезни. Они, сохраняя функцию, могут обуславливать определенную специализацию для противостояния локальным популяциям патогенов. С использованием двух микросателлитных маркеров UDV305 и UDV737 были выявлены многочисленные аллели или паралоги в одной и той же области (локус Rpv3) хромосомы. Поскольку многие полезные гаплотипы присутствуют в одном локусе, в традиционной селекции возможно комбинировать только два гаплотипа в одном диплоиде. Опираясь на сравнительный анализ различных гаплотипов, исследователи полагают, что эта область не является высоко рекомбинантной, не позволяя пирамидировать устойчивость в диплоидах традиционной селекцией. Поскольку очевидно, что традиционный отбор на устойчивость осуществлялся с учетом качественных характеристик ягоды и получаемого вина, даже устойчивые образцы, но с плохим качеством продукции селекционерами отбрасывались. При этом с повышением качественных характеристик отобранных устойчивых образцов, при рекуррентных скрещиваниях с сортами *V. vinifera*, еще более снижался уровень разнообразия признака устойчивости.

Признак устойчивости к *P. viticola*, а также к мучнистой росе и антракнозу выявлен у *V. amurensis*, восточно-азиатского представителя рода. Исследователями было показано, что генетическая карта этого вида с использованием 122 SSRs и 6 RGA маркеров представляла 975 cM с 19 группами сцепления и на 82% покрывала физическую карту *V. vinifera* [39]. Через 6 дней после инокуляции *P. viticola* 232 образца первого поколения самоопыленной популяции S1 *V. amurensis* 'Ruprecht' оценивались по пяти количественным и полуколичественным параметрам споруляции и степени некроза. Анализ позволил выделить группу сцепления 14 мажорного ЛКП (Rpv8), контролирующего устойчивость к ЛМР и ответственного за 86,3% общей фенотипической варибельности.

Динамика изменений метаболизма на ранних стадиях инфекции (0, 6, 12 ч.) впервые была оценена на основе кинетики экспрессии генов в устойчивом к *P. viticola* сорте 'Regent' и чувствительном 'Trincadeira' [40]. Анализ показал, что в устойчивом по сравнению с чувствительным сортом фотосинтез подавлялся существенно, при этом значительно усиливалась экспрессия генов, имеющих отношение к передаче сигналов, защитному ответу и связанному с защитными функциями метаболизму. Количественный ПЦР подтвердил Microarray профили экспрессии, в том числе генов, связанных с защитой, передачей сигнала. Различия между устойчивостью и чувствительностью к патогену проявлялись в амплитуде и кинетике индукции определенных генов. В их числе ген белка Bcl-2. Белки семейства Bcl-2 участвуют в сигнальных путях, обусловленных кальций-кальмодулином и в апоптозе. В сорте 'Regent' сильнее экспрессировались транскрипты, кодирующие циклофилин, играющий роль в передаче сигналов при стрессах; PR-белка, субтилизин-подобной протеазы, хитиназы класса IV, белка, подобного хитиназе, и др.

Картирование F1-популяции от скрещивания линии Gf.Ga-52-42 и сорта 'Solaris' с использованием 208 SSR маркеров позволило выявить на устойчивость к ложной мучнистой росе два главных локуса количественного признака в группах сцепления 18 и 9 [41]. Первый из них был привнесен Gf.Ga-52-42 и идентичен ранее описанному Rpv3. Локус в группе сцепления 9 (в 'Solaris' из *V. amurensis*) был назван Rpv10 и обуславливал до 50% фенотипической варибельности в популяции. Устойчивость 'Solaris' сопровождалась некрозом, накоплением

каллозы и стилбена. Область генома, ограниченная маркерами, включала 3 кластера 26-и RGA генов NBS-LRR типа, серин-треонин протеин киназы, фосфатазы и др. Субпопуляция, содержащая Rpv3 и Rpv10 локусы, проявляла более существенный уровень устойчивости, указывая на аддитивный эффект пирамидирования генов.

Оценка устойчивости к ЛМР, основанная на микроскопических и морфологических наблюдениях, позволила дифференцировать 6 сортов *V. amurensis*, 3 сорта *V. rotundifolia* и десять китайских сортов на 5 уровней устойчивости/чувствительности [42]. Три сорта *V. rotundifolia* были иммунны к болезни; чрезвычайно устойчивым оказался *V. pseudoreticulata* '1057/1058'; *V. amurensis* 'Shuanghong' и *V. adenoclada*, *V. adstricta*, *V. bellula*, *V. ficifolia*, *V. hancockii* и *V. quinquangularis* показали среднюю устойчивость; пять сортов *V. amurensis* 'Changbaijiu', 'Shuangfeng', 'Shuangyou', 'Tonghuasan' и 'Zuoshanyi' были классифицированы как частично устойчивые, и четыре сорта *V. vinifera* ('Cabernet Sauvignon', 'Chardonnay', 'Thompson Seedless' и 'Yatomi Rosa') как чувствительные. В первых двух группах отчетливо проявлялся HR, что по определению исследователей может быть ключевым механизмом устойчивости против ЛМР.

Устойчивость к *Erysiphe necator*. Взаимодействие патогена и растения происходит в несколько стадий: колонизация эпидермального слоя, прорастание спор гриба и формирование аппрессорий; переключение с поверхностного роста на инвазию эпидермальных клеток; прорастание и распространение гаусторий внутри растительных клеток; подавление некроза инфицированных клеток [43]. Базовая или горизонтальная устойчивость РТИ при инфицировании *E. necator* снижает образование первичных гаусториев и образование аппрессорий. Распознавание эффектора патогена ЕТИ осуществляется рецептором хозяина продуктом NB-LRR-гена, в результате чего тормозится вторичный рост гифов и наступает некроз клеток хозяина [44].

В популяции, полученной от скрещивания устойчивого родителя VRH3082-1-42 и чувствительного сорта 'Cabernet Sauvignon', была показана колокализация гена устойчивости Run1 к *U. necator* с рядом RGA генов [45]. Источником гена являлся *M. rotundifolia*, устойчивый к МР, ЛМР, филлоксере и нематодам [46]. Опираясь на эти исследования и используя 195 маркеров, исследователи выявили 20 новых генетических маркеров, тесно связанных с Run1 [47]. 14 AFLP, RGA и SSR показали связь Run1/Rpv1 в локусе устойчивости на хромосоме 12. Область расположения гена Run1 содержала два мультигенных семейства RGA. Сравнение физической и генетической карт показало, что рекомбинация в области гена Run1 строго репрессирована. Поскольку область хроматина, окружающая этот ген(ы) устойчивости, предотвращает рекомбинацию, по мнению исследователей это может затруднять его использование в традиционной селекции.

При естественном или искусственном заражении центрально-азиатских сортов *V. vinifera* Кишмиш ваткана ('Kishmish vatkana') и Нимранг ('Nimrang') гистологический анализ показал, что патоген проникал в клетки обоих сортов, но в Кишмиш ваткана после того, как гаустории проникали в клетки, ингибировалось развитие патогена. Это определялось исследователями как ЕТИ устойчивость, устойчивость после проникновения [24]. Анализ сегрегирующей популяции Кишмиш ваткана×Нимранг с использованием 195 SSR маркеров позволил исследователям впервые выявить доминантный аллель устойчивости у культурных представителей *V. vinifera* в группе сцепления 13, названный Resistance to *E. necator* 1 (REN1). Поскольку в этой области находится семейство NBS-LRR генов, REN1 также может принадлежать к ним. В местах инфекции наблюдалось покоричневение клеток. Подобный эффект трактуется рядом исследователей как проявление программируемой гибели клеток (апоптоз), как, например, в *M. rotundifolia*, носителя Run1 локуса, содержащего TIR-NBS-LRR гены [48]. Но поскольку в случае с Кишмиш ваткана не было характерного окрашивания мертвых клеток в местах инфекции, исследователи не исключают, что появление коричневых пятен может быть опосредовано окислительным связыванием полимеров, отложениями каллозы или танина. Помимо 'Kishmish vatkana', REN1 был выявлен также в центрально-азиатском сорте 'Dzhandzhal kara' [49]. Локус расположен на той же хромосоме обоих устойчивых сортов, 38 SSR маркеров распределены внутри локуса в области 1,4 сМ. Пограничные маркеры определяют зону в 1.4 Мпо в референс геноме *V. vinifera* сорта PN40024, содержащем 27 генов с известными функциями, двумя coiled-coil NBS-LRR генами и девятью NBS-LRR псевдогенами. В REN1 локусе PN40024 различия NBS генов обусловлены смесью дупликаций сегментов, тандемов, внутригенными рекомбинациями между паралогами. Признак устойчивости в обоих сортах является моногенным, расположен на хромосоме в положении, отличном от такового Run 1 североамериканских источников. Продукт гена при этом, как и в случае Run1 [48], обеспечивает устойчивость, препятствуя развитию патогена после проникновения в клетки хозяина.

Опираясь на модель эволюции устойчивости растений к патогенам, состоящую из четырех этапов [50], Dru et al. [48] сосредоточили внимание на ряде экспериментов на различных видах растений, выявивших восстановление базовой устойчивости при взаимоотношениях с патогенами. Это коррелирует, в частности, с появлением рецессивной аллели гена(ов) MLO, другими словами – мутация доминантного гена эффективно восстанавливала базовую устойчивость к

адаптированным патогенам МР, предотвращая проникновение гаусторий патогена в эпидермальные клетки растения-хозяина. Поскольку в геноме винограда выявлено около двух десятков генов MLO, по мнению авторов, альтернативная стратегия в повышении устойчивости к МР может базироваться на выявлении рецессивных VvMLO генов, избирательном выключении или в комбинировании данных подходов. Более того, имеются наблюдения, что в онтогенезе, с возрастом у растений повышается способность противостоять патогенам. Исследователи пытаются понять, связано ли это с эффектом проникновения и/или другими компонентами базовой устойчивости [48].

Поиски носителей РТГ актуальны в связи с тем, что устойчивость ЕТГ, базирующаяся на узнавании эффектора патогена, может быть расоспецифична, а следовательно, не очень долговечна [44], [51]. При анализе сегрегирующих популяций *V. vinifera* × *V. rotundifolia* [45] на устойчивость к МР выявлен новый доминантный локус устойчивости к *E. necator* (Ren4), обуславливающий устойчивость, проявляющуюся в существенном снижении проникновения патогена. Исследователи выявили очень мало случаев роста под аппрессориями, поэтому полагают, что устойчивость определяется внешними барьерами клеток. Хотя специфический рецептор не выявлен, по представлению авторов, Ren4 является источником экстремальной и быстрой расоспецифичной устойчивости у *V. rotundifolia* и подобный механизм устойчивости не был описан ранее в Vitaceae.

M. rotundifolia проявляет устойчивость к МР, ЛМР антрактозу, серой плесени и др. [46], [52]. На основе впервые созданной генетической карты потомства самоопыления S1 *M. rotundifolia* сорта 'Regale' с использованием 177 SSR пар праймеров в группе сцепления 14 впервые был выявлен локус устойчивости к *E. necator* (Ren5), обуславливающий 58% фенотипической вариабельности [53]. Продукт гена локуса Ren5 останавливает развитие мицелия после образования первой аппрессории. В группах сцепления 5 (до 16% генетической вариабельности) и 20 были обнаружены минорные компоненты. Последний соответствовал определенной области локуса хромосомы 7 в *V. vinifera*. Примечательно, что Ren5 находится в доверительном интервале Rpv8, количественного признака устойчивости к ЛМР из *V. amurensis* [39]. Сравнение генетических карт *V. vinifera* (2n=38) и *M. rotundifolia* (2n=40) показало высокую коллинеарность их геномов.

В геноме *V. vinifera* были выявлены два PR-гена: VvNPR1.1 и VvNPR1.2 [54]. Оказалось, что VvNPR1.1 аналогичен NPR1 арабидопсиса, являющегося ключевым элементом сигнального пути салициловой кислоты [55]. Стабильно высокая экспрессия VvNPR1.1-GFP в трансформированном *V. vinifera* сопровождалась конститутивной ядерной локализацией соответствующего белка в неинфицированных растениях. Эти растения проявляли повышенную устойчивость к инфицированию МР. Поскольку ранее было показано, что NPR1 запускает SAR, ген важен для локальной базовой устойчивости и возможно инициирует прайминг. По мнению исследователей, все это указывает на важную роль VvNPR1.1 в устойчивости винограда против биотрофных патогенов. Накопление таких сигнальных иммунных компонентов, как NPR1, МРК3, МРК6, вероятно поддерживает устойчивость к повторным атакам патогенов [56]. Сравнение устойчивого *V. aestivalis* 'Norton' и чувствительного 'Cabernet Sauvignon' показало конститутивно высокий уровень салициловой кислоты в устойчивом сорте [57]. При инокуляции патогеном в устойчивом сорте были показаны изменения только в трех транскриптах по сравнению с 625 в чувствительном сорте. В последнем на уровне повышения при инокуляции содержания салициловой кислоты наблюдалось также существенное увеличение транскриптов: повышенной чувствительности к болезни ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY, MAPKK, WRKY, PR1, PR10 и фермента вторичного метаболизма стилбенсинтазы, указывая на индукцию базовой устойчивости.

Инокулировав *E. necator* в листья дикого китайского вида *V. pseudoreticulata* с использованием устойчивой 'Baihe-35-1' и чувствительной линий 'Baihe-35-2', исследователи создали библиотеку клонов [58]. Более 40% из 762 аннотированных генов были отнесены к категории «связывания» нуклеотид/нуклеиновая кислота; 2,9% (ESTs) классифицированы как регуляторы активности транскрипции. Из библиотеки был выделен новый фактор транскрипции VpWRKY3. Максимальный уровень индукции его в чувствительном генотипе был в 1,95 раза выше, чем в устойчивом. Повышенная экспрессия этого гена в табаке усиливала устойчивость к *Ralstonia solanacearum*. VpWRKY1, VpWRKY2, VvWRKY1, VvWRKY2 и VvWRKY11 имели отношение к биотическим и абиотическим стрессам. Исследователи [58] проводят аналогию индукции VpWRKY3 в чувствительной линии с показанным [59] более существенным увеличением транскрипции в ответ на МР в чувствительном *V. vinifera* по сравнению с устойчивым *V. aestivalis*, MAPKK, WRKY, PR 10, стилбенсинтазы и др. То есть в чувствительном виде патоген существенно индуцировал ориентированные на защиту изменения в транскриптоме, тогда как устойчивость *V. aestivalis* не была связана с всеобщим репрограммированием транскриптома.

Устойчивость к *Botrytis cinerea*. Инфекция индуцирует накопление белков патогенеза, включая хитиназу, осмотин, 1,3-глюканазу, фенилаланинаммоний лиазу, стилбенсинтазу,

накопление вторичных метаболитов, таких как танины, другие фенольные соединения и их производные [60]. Оценка на основе морфо-анатомических признаков: толщины воска, кутикулы, эпидермиса и отсутствия пор на поверхности ягоды выявила устойчивость только в 11 образцах из 102 анализированных сортов. Все они включали *V. labrusca*, *V. labrusca* × *V. vinifera* или другие сложные гибриды.

Обработка растений винограда *in vitro* эргостеролом, основным стеролом грибов индуцировала экспрессию VvWRKY1, липид-переносящие белки VvLTPs, стилбенсинтазу VST1, накопление ресвератрола и устойчивость к *B. cinerea* 75% обработанных растений [61]. Было показано, что WRKY и MYB-факторы транскрипции вовлечены в регуляцию промотора VvLTP1 через W-box и MYB. Исследователи предполагают следующую последовательность событий: эргостерол связывается с рецептором на мембране, запускает классическую передачу сигнала, индуцирующего экспрессию генов WRKY и других (trans-acting) белков и локальное накопление стилбенов. Затем индуцируется экспрессия гена VvLTP1, соответствующий белок секретируется во внеклеточное пространство. В то же время эргостерол стимулирует экспрессию и накопление жасмоната, который в комплексе с липид-переносящим белком LTP-JA переносится на дальние расстояния для запуска системной защиты.

В суспензионной культуре и на растеньицах винограда *in vitro* было испытано действие элиситоров рамнолипидов бактерии *Pseudomonas aeruginosa*, используемых в сельском хозяйстве в качестве биосурфактантов и эмульгаторов [62]. В суспензионной культуре рамнолипиды индуцировали изменение концентрации кальция в цитозоле, оксидативный выброс, активацию MAPKs и гибель клеток. Увеличение экспрессии хитиназы было 30-кратным при действии 0,01 мг/мл и 320-кратным при 0,025 мг/мл концентрации рамнолипидов. В растеньицах *in vitro* достоверно повышалась экспрессия глюконазы, ингибитора протеиназы, 9-липоксигеназы, фенилаланинаммоний лиазы и стилбенсинтазы. Рамнолипиды ингибировали прорастание спор и рост мицелия *B. cinerea*. Был показан синергетический эффект с элиситором хитозаном и фильтратом культуры *B. cinerea*, и значимый эффект при предобработке рамнолипидами.

Предобработка штаммами непатогенных ризосферных бактерий *Pseudomonas fluorescens* СНА0 и *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 и их экстрактами культуры клеток и листьев растений винограда *in vitro* обуславливали ISR, вызывая в последних оксидативный выброс и накопление фитоалексинов ресвератрола и виниферина в ответ на инфицирование *B. cinerea* [63]. Эффект вышеуказанных штаммов сравнивался с таковым нескольких дефицитных (deficient) штаммов ризобактерий. На основании полученных результатов был сделан вывод, что прайминг защитного ответа при использовании различных штаммов, очевидно, обуславливался салициловой кислотой, или стилбенами пиохелином и/или сидерофором пиовердином. Это может указывать на то, что индукция определяется взаимодействием специфических бактериальных штаммов с растением винограда и сосуществованием различных путей, индуцирующих устойчивость против *B. cinerea*. Исследователи оценили также способность бактерий *Pantoea agglomerans* (Pa-AF2), *Bacillus subtilis* (Bs-271), *Acinetobacter lwoffii* (Al-113) и *Pseudomonas fluorescens* (Pf-CT2) индуцировать защитный ответ на инфицирование патогеном [64]. Все испытанные бактерии и/или их экстракты индуцировали оксидативный выброс и накопление фитоалексинов ресвератрола и транс-ε-виниферина как в клеточной культуре, так и в листьях винограда. Два штамма Pf-CT2 and Al-113 были наиболее эффективны в индуцировании локального и системного ответа. Исследователи полагают, что применение элиситоров может стимулировать защитные механизмы растений и уменьшить экологическое давление использованием пестицидов.

Несмотря на очевидный прогресс в выявлении генов устойчивости к грибковым инфекциям, селекционеры все еще далеки от ясного понимания генетики признаков интереса. Многие признаки у винограда полигенны и подвержены влиянию окружающих условий, что затрудняет использование классических подходов. Классическая селекция винограда занимает около 25 лет. По мнению исследователей в этой области использование молекулярных маркеров, генетического картирования и полное секвенирование генома являются стартовой позицией от эмпирического подхода к гораздо более целенаправленной селекции и это, по мнению ученых, позволит снизить селекционный период до 10 лет.

Работа выполнена в рамках Гранта 0048/ГФ по подприоритету: «Исследования в области продовольственной безопасности» Бюджетной программы 055, финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

Литература

1. Jones J.D.G., Dangl J.L. The plant immune system // Nature. – 2006. – Vol. 444. – P. 323-329.
2. Boller Th. and Felix G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors // Annu. Rev. Plant Biol. – 2009. – Vol. 60. – P. 379-406.

3. Dodds P.N. and Rathjen J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions // *Nature Reviews Genetics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 539-548.
4. Katagiri F. and Tsuda K. Understanding the Plant Immune System // *MPMI*. – 2010. – Vol. 23. – P. 1531-1536.
5. Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz. B.J. Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response// *Cell*. – 2006. – Vol. 124. – P. 803-814.
6. Gomez-Gomez L., Boller T. FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis* // *Mol. Cell*. – 2000. – Vol. 5. – P. 1003-1011.
7. Zipfel C. Pattern-recognition receptors in plant innate immunity // *Current Opinion in Immunology*. – 2008. – Vol. 20. – P. 10-16.
8. Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J., Katagiri F. Network Properties of Robust Immunity in Plants // *PLoS Genetics*. – 2009. – Vol. 5. – P. 1-16.
9. Lecourieux D., Ranjeva R., Pugin A. Calcium in plant defence-signalling pathways // *New Phytol*. – 2006. – Vol. 171. – P. 249-269.
10. Suarez-Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. Mitogen-activated protein kinase signalling in plants // *Annu. Rev. Plant. Biol.* – 2010. – Vol. 61. – P. 621-649.
11. Koornneef A. and Pieterse C.M.J. Cross Talk in Defense Signaling // *Plant Physiol.* – 2008. – Vol. 146. – P. 839-844.
12. Bai J., Pennill L.A., Ning J., Lee S.W., Ramalingam J., Webb C.A., Zhao B., Sun Q., Nelson J.C., Leach J.E., Hulbert S.H. Diversity in leucine in nucleotide binding site-Leucine-rich repeat genes in cereals // *Genome Res.* – 2002. – Vol. 12. – P. 1871-1884.
13. Belkhadir Y., Subramaniam R., Dangi J.L. Plant disease resistance protein signaling: NBS–LRR proteins and their partners // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2004. – Vol. 7. – P. 391-399.
14. Peressotti E., Wiedemann-Merdinoglu S., Delmotte F., Bellin D., Di Gaspero G., Testolin R., Merdinoglu D., Mestre P. Breakdown of resistance to grapevine downy mildew upon limited deployment of a resistant variety // *BMC Plant Biology*. – 2010. – Vol. 10:147.
15. Boyd L.A. Perspective Can the durability of resistance be predicted? // *J Sci Food Agric*. – 2006. – Vol. 86. – P. 2523-2526.
16. Vlot C.A., Klessig D.F., Park S-W. Systemic acquired resistance: the elusive signal(s) // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2008. – Vol. 11. – P. 436-442.
17. Pieterse C.M.J., Dicke M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology // *Trends Plant Sci.* – 2007. – Vol. 12. – P. 564-569.
18. Mathys J., De Cremer K., Timmermans P., Van Kerckhove S., Lievens B., Vanhaecke M., Cammue B.P.A., De Coninck B. Genome-wide characterization of ISR induced in *Arabidopsis thaliana* by *Trichoderma hamatum*T382 against *Botrytis cinerea* infection // *Frontiers in Plant Science*. – 2012. – Vol. 3. – P. 1-25.
19. Conrath U. Molecular aspects of defence priming // *Trends in Plant Science*. – 2011. – Vol. 16. – P. 524-531.
20. Pastora V., Lunab E., Mauch-Manic B., Tonb J., Florsa V. Primed plants do not forget // *Environmental and Experimental Botany*. – Available online 5 March, 2012.
21. Gomès E.E. and Coutos-Thévenot P. Molecular aspects of grapevine-pathogenic fungi interactions // In Roubelakis-Angelakis K.A. (ed.), *Grapevine Molecular Physiology & Biotechnology*. Springer Science+Business Media B.V. 2nd edn. – 2009. – P. 407-428.
22. Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2002. – Vol. 50. – P. 2731-2741.
23. FINAL REPORT “Study on the Use of the Varieties of Interspecific Vines”, EU 16th July, 2003.
24. Hofmann S., Di Gaspero G., Kovács L., Howard S., Kiss E., Galbács Z., Testolin R., Kozma P. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth // *Theor Appl Genet.* – 2008. – Vol. 116. – P. 427-438.
25. This P., Lacombe T., Thomas M. Historical origin and genetic diversity of wine grapes // *Trends Genet.* – 2006. – Vol. 22. – P. 511-519.
26. Schmitt A., Rex M., Ebert S., Friedt W., Töpfer R., Zyprian E. Marker Development for Important Grapevine Traits by Genetic Diversity Studies and Investigation of Differential Gene Expression // In: S. Delrot et al. (eds.), *Methodologies and Results in Grapevine Research*, Springer Science+Business Media B. – 2010. – Ch. 27. – P. 375-487.
27. Eibach R., Hausmann L., Töpfer R. Marker assisted selection (MAS) as a new tool for developing high quality cultivars with sustainable resistance. Federal Research Centre for Cultivated Plants. Julius Kühn-Institute Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof. - 2010. - 6 pp.
28. Velasco R. et al. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety // *PLoS ONE*. – 2007. – Vol. 12. – P. 1-18.

29. Welter L.J., Göktürk-Baydar N., Akkurt M., Maul E., Eibach R., Töpfer R., Zyprian E.M. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.) // *Mol Breeding*. – 2007. – Vol. 20. – P. 359-374.
30. Di Gaspero G., Cipriani G. Resistance gene analogs are candidate markers for disease-resistance genes in grape (*Vitis* spp.) // *Theor Appl Genet*. – 2002. – Vol. 106. – P. 163-172.
31. Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Coste P., Dumas V., Haetty A., Butterlin G., Greif C. Genetic analysis of downy mildew resistance derived from *Muscadinia rotundifolia* // *Acta Hort*. – 2003. – Vol. 603. – P. 451-456.
32. Kortekamp A., Welter L., Vogt S., Knoll A., Schwander F., Töpfer R., Zyprian E. Identification, isolation and characterization of a CC-NBS-LRR candidate disease resistance gene family in grapevine // *Mol Breeding*. – 2008. – Vol. 22. – P. 421-432.
33. Polesani M., Bortesi L., Ferrarini A., Zamboni A., Fasoli M., Zadra C., Lovato A., Pezzotti M., Delledonne M., Polverari A. General and species-specific transcriptional responses to downy mildew infection in a susceptible *Vitis vinifera* and a resistant *V. riparia* grapevine species *BMC Genomics*. – 2010. – 11:117.
34. Pandey S.P., Somssich I.E. The role of WRKY transcription factors in plant immunity // *Plant Physiol*. – 2009. – Vol. 150. – P. 1648-1655.
35. Bellin D., Peressotti E., Merdinoglu D., Wiedemann-Merdinoglu S., Adam-Blondon A.-F., Cipriani G., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine 'Bianca' is controlled by a major dominant gene causing localized necrosis at the infection site // *Theor Appl Genet*. – 2009. – Vol. 120. – P. 163-176.
36. Kast W.K., Stark-Urnau M., Seidel M., Gemmrich A.R. Inter-isolate variation of virulence of *Plasmopara viticola* on resistant vine varieties // *Bull OILB/SROP*. – 2001. – Vol. 24. – P. 45-49.
37. Casagrande K., Falginella L., Castellarin S.D., Testolin R., Di Gaspero G. Defence responses in Rpv3-dependent resistance to grapevine downy mildew // *Planta*. – 2011. – Vol. 234. – P. 1097-1109.
38. Di Gaspero G., Copetti D., Coleman C., Castellarin S.D., Eibach R., Kozma P., Lacombe T., Gambetta G., Zvyagin A., Cindri P., Kovács L., Morgante M., Testolin R. Selective sweep at the Rpv3 locus during grapevine breeding for downy mildew resistance // *Theor Appl Genet*. – 2012. – Vol. 124. – P. 277-286.
39. Blasi P., Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Prado E., Rühl E.H., Mestre P., Merdinoglu D. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of Rpv8, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew // *Theor Appl Genet*. – 2011. – V. 123. – P. 43-53.
40. Figueiredo A., Monteiro F., Fortes A.M., Bonow-Rex M., Zyprian E., Sousa L., Pais M.S. Cultivar-specific kinetics of gene induction during downy mildew early infection in grapevine // *Funct Integr Genomics*. – 2012. – Vol. 12. – P. 379-386.
41. Schwander F., Eibach R., Fechter I., Hausmann L., Zyprian E., Töpfer R. Rpv10: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine // *Theor Appl Genet*. – 2012. – Vol. 124. – P. 163-176.
42. Yu Y., Zhang Y., Yin L., Lu J. The mode of host resistance to *Plasmopara viticola* infection of grapevines (*Vitis* L.). *Phytopathology*. – 2012. - Aug 9.
43. Hućkelhoven R. and Panstruga R. Cell biology of the plant-powdery mildew interaction // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2011. – Vol. 14. – P. 738-746.
44. Ramming D.W., Gabler F., Smilanick J., Cadle-Davidson M., Barba P., Mahanil S., Cadle-Davidson L. A Single Dominant Locus, Ren4, Confers Rapid Non-Race-Specific Resistance to Grapevine Powdery Mildew // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 502-508.
45. Pauquet J., Bouquet A., This P., Adam-Blondon A.F. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection // *Theor Appl Genet*. – 2001. – Vol. 103. – P. 1201-1210.
46. Olmo H.P. The potential role of (*Vinifera-Rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement // *Experientia*. – 1986. – Vol. 42. – P. 921-926.
47. Barker C.L., Donald T., Pauquet J., Ratnaparkhe M.B., Bouquet A., Adam-Blondon A.-F., Thomas M.R., Dry I. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, Run1, using a bacterial artificial chromosome library // *Theor Appl Genet*. – 2005. – Vol. 111. – P. 370-377.
48. Dry I.B., Feechan A., Anderson C., Jermakow A.M., Bouquet A., Adam-Blondon, A.F., Thomas M.R. Molecular strategies to enhance the genetic resistance of grapevines to powdery mildew. *Aust. J. Grape Wine Res*. – 2010. – Vol. 16. – P.94-105.
49. Coleman C., Copetti D., Cipriani G., Hoffmann S., Kozma P., Kovács L., Morgante M., Testolin R., Di Gaspero G. The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines // *BMC Genetics*. – 2009. – Vol. 10. – P. 1-20.
50. Bent A.F and Mackey D. Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions // *Annual Review of Phytopathology*. – 2007. – Vol. 45. – P. 399-436.

51. Wan Y.Z., Schwaninger H., He P.C., Wang Y.J. Comparison of resistance to powdery mildew and downy mildew in Chinese wild grapes // *Vitis*. – 2007. – Vol. 46. – P. 132-136.
52. Olien W.C. The muscadine grape: Botany, viticulture, history and current industry // *Hort Sci*. – 1990. – Vol. 25. – P. 732-739.
53. Blanc S., Wiedemann-Merdinoglu S., Dumas V., Mestre P., Merdinoglu D. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of Ren5, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew // *Theor Appl Genet*. Published on line 03 August, 2012.
54. Le Henanff G., Heitz T., Mestre P., Mutterer J., Walter B., Chong J. Characterization of *Vitis vinifera* NPR1 homologs involved in the regulation of pathogenesis-related gene expression // *BMC Plant Biol*. – 2009. – Vol. 9:54. – P.1-14.
55. Le Henanff G., Farine S., Kieffer-Mazet F., Miclot A-S., Heitz T., Mestre P., Bertsch C., Chong J. *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew // *Planta*. – 2011. – Vol. 234. – P. 405-417.
56. Spoel S.H. and Dong X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells // *Nature Reviews Immunology*. – 2012. – Vol. 12. – P. 89-100.
57. Fung R.W.M., Gonzalo M., Fekete C., Kovacs L.G., He Y., Marsh E., McIntyre L.M., Schachtman D.P., Qiu W. Powdery Mildew Induces Defense-Oriented Reprogramming of the Transcriptome in a Susceptible But Not in a Resistant Grapevine // *Plant Physiology*. – 2008. – V. 146. – P. 236-249.
58. Zhu Z., Shi J., Cao J., He M., Wang Y. VpWRKY3, a biotic and abiotic stress-related transcription factor from the Chinese wild *Vitis pseudoreticulata* // *Plant Cell Rep*. Published on line July, 2012.
59. Zhang H., Jin J.P., Tang L.A., Zhao Y., Gu X.C., Gao G., Luo J.C. PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – Vol. 39. – D1114–D1117.
60. Gabler F.M., Smilanick J.L., Mansour M., Ramming D.W., Mackey B.E. Correlations of Morphological, Anatomical, and Chemical Features of Grape Berries with Resistance to *Botrytis cinerea* // *Phytopathology*. – 2003. – Vol. 93. – P. 1263-1273.
61. Laquitaine L., Gomès E., François J., Marchive C., Pascal S., Hamdi S., Atanassova R., Delrot S., Coutos-Thévenot P. Molecular basis of ergosterol-induced protection of grape against *Botrytis cinerea*: Induction of type I LTP promoter activity, WRKY, and stilbene synthase gene expression // *MPMI*. – 2006. – Vol. 19. – P. 1103-1112.
62. Varnier A.L., Sanchez L., Vatsa P., Boudesocque L., Garcia-Brugger A., Rabenoelina F., Sorokin A., Renault J.H., Kauffmann S., Pugin A., Clement C., Baillieux F., Dorey S. Bacterial rhamnolipids are novel MAMPs conferring resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine // *Plant Cell Environ*. – 2009. – Vol. 32. – P. 178-193.
63. Verhagen B.W., Trotel-Aziz P., Couderchet M., Höfte M., Aziz A. *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine // *J Exp Bot*. – 2010. – Vol. 61. – P. 249-260.
64. Verhagen B., Trotel-Aziz P., Jeandet P., Baillieux F., Aziz A. Improved resistance against *Botrytis cinerea* by grapevine-associated bacteria that induce a prime oxidative burst and phytoalexin production // *Phytopathology*. – 2011. – Vol. 101. – P. 768-777.

Түйін

Өсімдіктердің иммунитетінің негізі қазіргі заманғы көзқарас бойынша екі түрмен сипатталады: негізгі төзімділік, өсімдіктердің реакциялары жалпы көптеген микроағзалардың элиситорлар – заттектеріне және эффектор патогендерге төзімділіктерінің пайда болуымен негізделген. *Vitis vinifera* туысына жататын көптеген жүзім сорттары, экономикалық тұрғыдан зиянын тигізетін мынадай *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Botrytis cinerea* саңырауқұлақ патогендеріне өте сезімтал. Осы патогендерге молекулалық – генетикалық тәсілдемелерді қолдану арқылы бір қатар төзімді гендері *Vitis* туысының өкілдері Солтүстік Америка және Азиядағы жүзім түрлерінен табылған. Генетикалық карта және де тізбекті топтардан төзімді гендерді табуға мүмкіндік беретін молекулалық маркерлер құрастырылды. Жүзімге тиісті патогендерді жұқтыру арқылы иммундық реакциялардың, сигналдардың берілуінің, бір қатар транскрипция факторларының экспрессияларының, гормондардың, ферменттердің және фитоалексиндердің синтездерінің жүйеліліктері бір қатар үлгілерде сипатталған. Бұл тәсілдер *V. vinifera* – ның патогендерге төзімділігін ұзарту мақсатында жаңа гендерді анықтауға мүмкіншілік беретін, негізі болып табылады. Сонымен қатар зерттеушілер патогендерге төзімділіктің, негізгі төзімділікті қайта қалпына келтіру арқылы баламалы стратегияларды өңдеуде.

Кілтті сөздер: өсімдіктердің иммундық жүйесі, жалған ақ ұнтақ, ақ ұнтақ, сұр зең, төзімділік гендері.

Summary

Plants respond to microorganisms using two modes or two-branched innate immune system [Jones, Dangl, 2006]. The first branch (PTI) recognizes with pattern recognition receptor (PRR) and responds to molecules (elicitors) common to many classes of microbes, non-pathogens and pathogens. PRR-perception mediates increased influx of H^+ and Ca^{2+} and a concomitant efflux of K^+ , activates calcium-dependent protein kinases, the oxidative burst, activates of MAPK cascades accompanied by changes in protein phosphorylation, hormones biosynthesis, up/downregulation of many hundreds genes, callose deposition. The second (ETI) responds by one of the NB-LRR proteins, products of resistance genes (PRs) to pathogen virulence factors. According to [Katagiri, Tsuda, 2010] plants seem to use a common signaling network differently in PTI and ETI.

Vitis vinifera cultivars are most susceptible to the fungal pathogens *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, *Botrytis cinerea* causing severe economic losses worldwide. The strategy of development new resistant varieties is based on the search for resistance genes (PR), elucidation of the mechanisms and sustainability of resistance in the field. Researchers have identified a number of PRs to pathogens in North American and Asian representatives of the *Vitis*. There are developed genetic maps, molecular markers localizing PRs in linkage groups. In some experiments the sequence of immune responses, signal transduction, the expression of several transcription factors, and synthesis of hormones, enzymes and phytoalexins in grape inoculated with pathogens has been described. According to some researchers hypersensitive response may be a key mechanism of resistance to pathogenic fungi.

Along with the search for PRs researchers investigate an alternative strategy to pathogens resistance: PTI re-establishing. The relevance of this is due to the fact that resistance, based on recognition of pathogen effector may be race specific, and therefore not very durable. By the other hand resistance induced in grape by symbiotic fungi, avirulent strains, elicitors, effectors and so on not associated with PR gene expression or salicylate accumulation can result in systemic (ISR), broad-spectrum resistance.

All of these approaches are the basis for the elucidation of the resistance mechanisms, the identification of new candidate genes for pyramiding to make resistance as sustainable as possible.

Keywords: plant immune system, *Vitis*, downy mildew, powdery mildew, grey mould, resistance genes.