

# ПОПУЛЯЦИОННАЯ ГЕНЕТИКА *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Ю.Т. ДЬЯКОВ, С.Н. ЕЛАНСКИЙ

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

## ВСТУПЛЕНИЕ

Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) deBary - возбудитель фитофтороза, самой экономически важной болезни картофеля и томата - уже более полутора столетий привлекает пристальное внимание исследователей из разных стран. Внезапно появившись в Европе в середине XIX столетия, он вызвал эпидемию картофеля, оставшуюся в памяти многих поколений. До сих пор его часто называют «гриб ирландского голода». Почти сто лет спустя после первых эпидемий были обнаружены устойчивые к фитофторозу дикие мексиканские виды картофеля, разработаны методы их скрещивания с культурным картофелем (Muller, 1935) и получены первые фитофтороустойчивые сорта (Пушкарев, 1937). Однако вскоре после начала их коммерческого выращивания накопились вирулентные к устойчивым сортам расы возбудителя фитофтороза, вводимые в сорта новые гены устойчивости из дикого мексиканского картофеля стали быстро терять эффективность.

Неудачи с использованием моногенной (вертикальной) устойчивости заставили селекционеров искать более сложные пути эксплуатации неспецифической, полигенной (горизонтальной) устойчивости. Однако в последние годы в отдельных популяциях паразита стали накапливаться высоко агрессивные расы, вызывающие эрозию даже неспецифической устойчивости, то есть стала возможна вариация не только вирулентности, но и агрессивности (Филиппов и др., 2004).

Такие же проблемы возникли и при использовании химических методов защиты картофеля. Фитофторовые грибы входят в класс Oomycetes, который образует отдельную от большинства грибов филу, относящуюся к царству Stramenopila (поэтому оомицеты иногда называют псевдогрибами). Вследствие значительных отличий оомицетов от истинных грибов в химическом составе, ультраструктуре и метаболизме системные фунгициды, применяющиеся для защиты растений от многих грибных болезней, для оомицетов неэффективны. Поэтому в химической защите от фитофтороза использовали многократные (до 12 раз за сезон) опрыскивания контактными препаратами. Революцию в химической защите от фитофтороза совершили фениламины, токсичные для оомицетов и системно передвигающиеся в растениях. Однако повсеместное их применение быстро привело к накоплению в грибных популяциях резистентных к фениламинам штаммов (Davidse et al., 1981), что усложнило применение защитных мероприятий. Вместе с тем, *P. infestans* является практически единственным грибным паразитом умеренного пояса, вред которого невозможно нейтрализовать нехимическими мероприятиями в условиях органического фермерства (VanBruggen, 1995).

Все вышесказанное объясняет огромное внимание, которое уделяют исследователи из разных стран популяциям *P. infestans*, динамике численности и генетического состава, генетическим механизмам изменчивости. Авторы данной публикации много лет работают в этой области и, наряду с другими сотрудниками, аспирантами и студентами каф. микологии и альгологии Московского университета, в разные годы занимавшимися этой проблемой (Т.А. Кузовниковой, В.Б. Кулиш, Н.Л. Поединок, А.В. Долговой, В.А. Тереховой, Л.М. Супрун, М.К. Деревягиной, И.Н. Рыбаковой, С.Ф. Багировой, А.Н. Смирновым, А.С. Кравцовым, В.П. Апрышко, Ф.Х. Ахматхановой, Е.И. Лавровой, Д.И. Милютиной), внесли некоторый вклад в ее изучение.

## ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

*Phytophthora infestans* развивается внутри листьев картофеля межклеточную грибницу с гаусториями. Питаясь тканями листа, он вызывает образование темных пятен, которые во влажную погоду чернеют и загнивают. При сильном поражении погибает весь лист. После периода питания на грибнице образуются выросты - спорангиеносцы, которые высовываются наружу через устьица. Во влажную погоду они образуют налет белого цвета вокруг пятен с нижней стороны листьев. На концах спорангиеносцев формируются лимонovidные зооспорангии, которые отрываются и разносятся брызгами дождя. Попадая в капли воды на поверхности листа картофеля, спорангии прорастают 6-8 зооспорами, которые после периода движения округляются, покрываются оболочкой и прорастают ростковой трубкой. Росток через устьице проникает в ткань листа. При определенных условиях зооспорангий может прорасти ростковой трубкой напрямую в ткань листа. При благоприятных условиях время от заражения до образования нового спороношения составляет всего 3-4 дня.

Попадая на землю и профильтровываясь через почву, спорангии заражают клубни. Сильно пораженные клубни при хранении гнивают, в слабо пораженных инфекция может сохраняться до следующего сезона. Кроме того, возбудитель фитофтороза может сохраняться в зимний период в виде ооспор (толстостенные покоящиеся половые споры) в почве на растительных остатках и на семенах томата. Ооспоры образуются на живых органах растений при встрече штаммов разных типов спаривания при избыточном увлажнении. Весной на посаженных зараженных клубнях и на растительных остатках с ооспорами образуется бесполое спороношение, зооспорангии выходят в почву и вызывают заражение нижних листьев растений. В некоторых случаях мицелий может расти из зараженного клубня по зеленой части растения и проявляться, как правило, в верхней части стебля.

Серьезное отличие оомицетов от большинства грибов заключается в преобладании диплофазы в их жизненном цикле с гаметическим мейозом и прорастанием зигот (ооспор) без редукционного деления ядер. Эта особенность, плюс диполярный гетероталлизм, заменяющий двуполость, казалось бы, позволяют применить к оомицетам подходы, разработанные для изучения популяций высших эукариот (анализ панмиксии и подразделенности популяций, внутри- и межпопуляционных потоков генов и др.). Однако три фактора не позволяют полностью переносить эти подходы при изучении популяций *P. infestans*:

1/. Наряду с гибридными ооспорами в популяциях образуются самофертильные, партеногенетические ооспоры (Fife, Shaw, 1992; Аникина и др., 1997a; Savenkova, Cherepnikoba-Anirina, 2002; Смирнов, 2003), причем частота их образования может быть достаточной, чтобы повлиять на результаты анализов.

2/. Половой процесс у *P. infestans* вносит незначительный вклад в динамику численности популяций, ибо гриб размножается главным образом вегетативными спорами, образуя за вегетационный период несколько генераций бесполого спороношения (полициклическое развитие болезни). Ооспоры играют важную роль в сохранении организма в период, когда отсутствуют зеленые растения (зимой) и в первичном заражении всходов. Затем, в течение лета происходит клональное размножение и увеличение или, наоборот, падение численности отдельных клонов, возникших в результате половой рекомбинации, что определяется главным образом отбором более приспособленных. Поэтому соотношение отдельных клонов в популяции в начале и конце эпифитотии может быть совершенно различным.

3/. Описанный цикл характерен для нативных популяций *P. infestans* на их родине – в Центральной Америке. В других зонах мира более 100 лет половой процесс у этого гриба не был известен, зимующей стадией был вегетативный мицелий в зараженных клубнях картофеля. Жизненный цикл был полностью агамным, а распространение носило очаговый характер: инфекция из единичных зараженных высаженных клубней переходила на листья, образуя первичные очаги болезни, которые могли сливаться при массовом развитии заболевания.

Таким образом, в одних регионах может быть чередование полового и бесполого циклов, а в других – только бесполой цикл (рис.1).

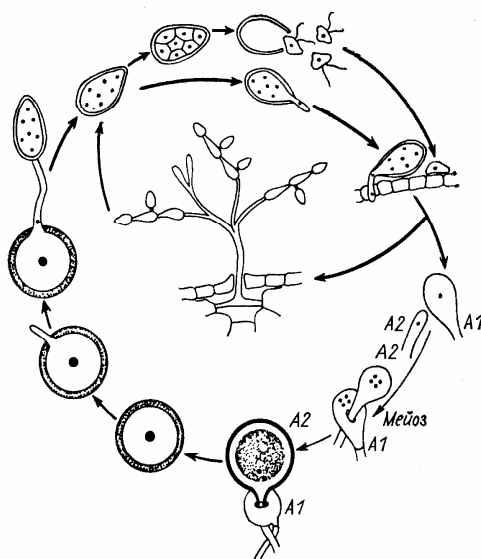


Рис. 1. Жизненный цикл *Phytophthora infestans*.

## МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

### Мутационный процесс

Поскольку возникновение мутаций – случайный процесс, протекающий с низкой частотой, возникновение мутаций по какому-либо локусу зависит от частоты мутирования этого локуса и численности популяции. При изучении частоты мутаций штаммов *P. infestans* обычно определяют численность колоний, выросших на селективных питательных средах после обработки химическими или физическими мутагенами. Как видно из представленных в табл.1 данных, частота мутирования одного и того же штамма по разным локусам может различаться на несколько порядков. Высокая частота мутаций устойчивости к металаксилу может быть одной из причин накопления резистентных к нему штаммов в природе.

Таблица 1.

Частота мутаций *Phytophthora infestans* к рост ингибирующим веществам, под действием нитрозометилмочевины (Долгова, Дьяков, 1986; Bagirova et al., 2001)

Соединение	Частота мутаций
Окситетрациклин	$6,9 \times 10^{-8}$
Бластицидин S	$7,2 \times 10^{-8}$
Стрептомицин	$8,3 \times 10^{-8}$
Трихотецин	$1,8 \times 10^{-8}$
Циклогексимид	$2,1 \times 10^{-8}$
Даконил	$<4 \times 10^{-8}$
Диметоморф	$6,3 \times 10^{-7}$
Металаксил	$6,9 \times 10^{-6}$

Частота спонтанных или индуцированных мутаций, вычисленная на основании лабораторных опытов, не всегда соответствует процессам, происходящим в природных популяциях, по следующим причинам:

1). При несинхронных ядерных делениях невозможно оценить частоту мутаций, приходящихся на одну ядерную генерацию. Поэтому большинство экспериментов дает информацию лишь непосредственно о частоте мутаций, не делая различий между двумя мутационными событиями и одним событием, следующим за митозом.

2/. Одношаговые мутации обычно снижают сбалансированность генома, поэтому наряду с приобретением нового свойства снижается общая приспособленность организма. Большинство экспериментально полученных мутаций имеет пониженную агрессивность и не фиксируется в природных популяциях. Так, коэффициент корреляции между степенью устойчивости мутантов *P. infestans* к фениламидным фунгицидам и скоростью роста на искусственной среде составил в среднем (-0,62), а устойчивостью к фунгицидам и агрессивностью на листьях картофеля – (-0,65) (Деревягина и др., 1993), что свидетельствует о низкой приспособленности мутантов. Мутации устойчивости к диметоморфу также сопровождались резким снижением жизнеспособности (Bagirova et al., 2001).

3/. Большинство спонтанных и индуцированных мутаций рецессивны и не проявляются фенотипически в экспериментах, но составляют скрытый резерв изменчивости природных популяций. Мутантные штаммы, выделенные в лабораторных опытах, несут доминантные или полудоминантные мутации (Кулиш, Дьяков, 1979). Видимо, диплоидностью ядер объясняются неудачные попытки получить мутантов, вирулентных на ранее устойчивых сортах под воздействием УФ-облучения (McKee, 1969). По расчетам автора такие мутации могут возникать с частотой менее 1:500000. Переход рецессивных мутаций в гомозиготное, фенотипически выраженное состояние может произойти вследствие половой или бесполой рекомбинации (см. ниже). Однако даже в таком случае мутация может маскироваться доминантными аллелями ядер дикого типа в ценотическом (многоядерном) мицелии и фенотипически фиксироваться только при образовании одноядерных зооспор.

Размеры популяций также играют решающую роль в появлении спонтанных мутаций. В очень больших популяциях, в которых численность клеток  $N > 1/a$ , где  $a$  – скорость мутирования, мутация перестает быть случайным явлением (Квитко, 1974). Расчеты показывают, что при средней зараженности картофельного поля (35 пятен на одном растении) на одном гектаре ежедневно формируется  $8 \times 10^{12}$  спор (Дьяков, Супрун, 1984). По-видимому, в таких популяциях встречаются все дозволённые типом обмена мутации по каждому локусу. Даже редкая мутация, возникающая с

частотой  $10^{-9}$ , будет обретаема тысячами особей из миллионов, обитающих на одном гектаре картофельного поля. Для мутаций, возникающих с более высокой частотой (например,  $10^{-6}$ ), в такой популяции могут ежедневно возникать разнообразные парные мутации (одновременно по двум локусам), т.е. мутационный процесс заменит рекомбинацию.

### Миграции

Для *P. infestans* известны два главных типа миграции: на близкие расстояния – в пределах картофельного поля или соседних полей – разносом зооспорангиев воздушными токами или дождевыми брызгами, и на дальние расстояния – с посадочными клубнями или перевозимыми плодами томатов. Первый способ обеспечивает расширение очага болезни, второй – создание новых очагов в местах, удаленных от первичного. Распространение инфекции с клубнями и плодами томата не только способствует возникновению болезни в новых местах, но и является основным источником генетического разнообразия популяций. В Московской области выращивается картофель, привезенный из разных регионов России и Западной Европы. Плоды томата привозятся из южных регионов России (Астраханская обл., Краснодарский край, Северный Кавказ). Семена томата, которые тоже могут служить источниками инфекции (Rubin et al., 2001), также привозятся из южных регионов России, Китая, государств Европы и других стран. Подмосковные популяции возбудителя фитофтороза отличаются очень высоким разнообразием. Так, среди 18 проанализированных изолятов сборов 1997-1998 гг обнаружено 15 мультилокусных генотипов (анализ проводили по 26 фингерпринтам ядерной ДНК, трем типам митохондриальной ДНК, двум изоферментным локусам и типу спаривания), т.е. практически каждый изолят уникален. В то же время на огромной территории азиатской части России (от Екатеринбурга до Сахалина и Владивостока), где картофель выращивают, в основном, из местного посадочного материала, а томаты сравнительно малораспространены и тоже выращиваются из местных семян, среди 39 проанализированных изолятов тех же лет сборов обнаружено только три генотипа, причем один из них (SIB-1) встречается повсеместно (обнаружен у 79% изолятов) (Elansky et al., 2001).

По расчетам Э. Майра (1974) генетические изменения в локальной популяции, обусловленные мутациями, редко превышают  $10^{-5}$  на локус, в то время как в открытых популяциях обмен вследствие встречного потока генов составляет не менее  $10^{-3} - 10^{-4}$ .

Миграцией в зараженных клубнях обусловлено попадание *P. infestans* в Европу, распространение по всем регионам мира, где выращивают картофель; ими вызваны самые серьезные популяционные перестройки. Фитофтороз на картофеле появился на территории Российской империи почти одновременно с его появлением в Западной Европе. Поскольку болезнь впервые была отмечена в 1846-1847 гг в Прибалтике и только в последующие годы распространилась в Белоруссии и Северо-Западных районах России, ее западноевропейское происхождение очевидно. Не столь очевиден первый источник фитофтороза в Старом Свете. Развиваемая Фраем с соавторами (Fry et al., 1992; Fry, Goodwin, 1995, Goodwin et al., 1994) гипотеза предполагает, что паразит попал из Мексики сначала в Северную Америку, где распространился по посевам, а затем был перевезен в Западную Европу (рис. 2).



Рис. 2. Пути миграции *P. infestans* в 40-х годах 19 века. 1 – первая миграция из Мексики в Северо-Восточные США (1842-1843 гг.), 2 – миграция из США в Европу (примерно 1845 г.), 3 – миграция из Европы в другие страны мира, последующие года (Goodwin et al., 1994).

В результате повторного дрейфа (двойного эффекта «бутылочного горлышка») в Европу попали единичные клоны (возможно, один), потомство которого вызвало пандемию на всей территории Старого Света, где выращивают картофель. В качестве доказательств этой гипотезы авторы приводят, во-первых, повсеместную встречаемость только одного типа спаривания (A1) и, во-вторых, однородность генотипов исследованных штаммов из разных регионов (все они по молекулярным маркерам, включающим 2 изоферментных локуса, паттерны фингерпринтинга ДНК и структуру митохондриальной ДНК, идентичны, и соответствуют описанному в США клону US-1). Однако некоторые данные заставляют сомневаться по крайней мере в некоторых положениях изложенной гипотезы. Анализ митохондриальной ДНК *Phytophthora infestans*, выделенной из гербарных образцов картофеля, зараженных в годы первой эпифитотии 40-х годов XIX в показал, что по структуре митохондриальной ДНК они отличаются от клона US-1, который, следовательно был, по крайней мере, не единственным источником инфекции в Европе (Ristaino et al, 2001).

Вторая точка зрения, развиваемая Перуанскими фитопатологами (Abad, Abad, 1995; Abad et al., 1995), предполагает южноамериканское (андское) происхождения инфекции. Авторы показали, что *P. infestans* издавна паразитирует (рукописные материалы 16-19 вв.) в Перу и Эквадоре на дынной груше (*Solanum muricatum*), причем штаммы из картофеля и дынной груши взаимно патогенны (Adler et al., 2002a). Из листьев дынной груши выделены изоляты, имеющие оба типа спаривания (Adler et al., 2002b). Против «перуанского» источника инфекции может свидетельствовать сильнейшее поражение картофеля привезенными штаммами, отсутствие у него как вертикальной, так и горизонтальной устойчивости к фитофторозу (мексиканские виды и сорта картофеля высокоустойчивы к фитофторозу).

Ситуация с фитофторозом вновь ухудшилась в 80-е годы XX века. Произошли следующие изменения:

1) Увеличилась средняя агрессивность популяции, что привело, в частности, к широкому распространению наиболее вредоносной формы фитофтороза – поражению черешков и стеблей.

2) Произошел сдвиг времени появления фитофтороза на картофеле - с конца июля на начало июля и даже на конец июня.

3) Стал повсеместно встречать тип спаривания A2, отсутствующий ранее в Старом Свете.

Изменениям предшествовали два события – массовое применения нового фунгицида – металаксила (Schwinn, Staub, 1980) и выход Мексики в мировые экспортеры картофеля (Niederhauser, 1993). В соответствии с этим были выдвинуты две причины популяционных изменений – конверсия типа спаривания под влиянием металаксила (Ko, 1994) и массовый занос новых штаммов с зараженными клубнями из Мексики (Fry, Goodwin, 1995). Хотя взаимопревращения типов спаривания под влиянием металаксила получены не только Ko, но и в работах, выполненных в нашей лаборатории (Savenkova, Chherennicova-Fnikina, 2002), вторая гипотеза предпочтительнее. Наряду с появлением второго типа спаривания произошли серьезные изменения в генотипе коллекционируемых штаммов *P. infestans*, в том числе в нейтральных генах – изоферментных и RFLP-локусах, а также в структуре митохондриальной ДНК. Комплекс этих изменений нельзя объяснить действием металаксила, скорее произошел массовый завоз новых штаммов из Мексики, которые, будучи более агрессивными (Kato et al., 1997), вытеснили старые штаммы, став доминирующими в популяциях. Перестал встречаться штамм US-1. Изменение состава европейских популяций произошло в очень короткий срок – с 1980 по 1985 гг (Fry et al., 1992). На территории бывшего СССР «новые штаммы» были обнаружены в сборах из Эстонии 1985 г, то есть раньше, чем в Польше и Германии (Goodwin et al., 1994). Последний раз «старый штамм» в России выделен с пораженного томата в Московской области в 1993 г. (Долгова и др., 1997). Также и во Франции «старые» штаммы встречались в посадках томатов до начала 90-х годов, то есть после того, как на картофеле они давно исчезли (Leberton, Andrivon, 1998). Изменения штаммов *P. infestans* затронули многие признаки, в том числе имеющие важное практическое значение, и усилили вредоносность фитофтороза.

### **Половая рекомбинация**

Для того чтобы половая рекомбинация могла бы вносить вклад в изменчивость необходимо, во-первых, присутствие в популяции двух факторов спаривания в соотношении, близком к 1:1, и наличие исходной вариабельности популяции.

Соотношение двух типов спаривания сильно варьирует в разных популяциях и даже в разные годы в одной популяции (таблица 2). Причины столь резких изменений частот типов спаривания в популяциях (как, например, в России и в Израиле в начале 90х гг прошлого века) не известны, но полагают, что это связано с завозом более конкурентоспособных клонов (Cohen, 2002).

Некоторые косвенные данные свидетельствуют о протекании полового процесса в отдельные годы и в отдельных регионах :

1) Исследования популяций из Московской области показало, что в 13 популяциях, в которых доля типа спаривания A2 была менее 10%, общее генетическое разнообразие, вычисленное по трем изоферментным локусам, составило 0,08, а в 14 популяциях, в которых доля тип спаривания A2 превышала 30%, генетическое разнообразие было вдвое выше (0,15) (Еланский и др., 1999). Таким образом, чем выше вероятность полового процесса, тем больше генетическое разнообразие популяции.

2) Связь между соотношением типов спаривания в популяциях и интенсивностью образования ооспор наблюдали в Израиле (Cohen et al., 1997) и в Голландии (Flier et al., 2004). Наши исследования показали, что в популяциях, в которых изоляты с типом спаривания A2 составляли 62, 17, 9 и 6%, ооспоры обнаружены в 78, 50, 30 и 15% проанализированных листочков картофеля (имеющих 2 и более пятен) соответственно. Образцы с 2 и более пятнами значительно чаще содержали ооспоры, чем образцы с 1 пятном (32 и 14% образцов соответственно) (Апрышко и др., 2004).

3) В некоторых регионах были обнаружены уникальные генотипы, возникновение которых связывают с половой рекомбинацией. Так в Польше в 1089 г и во Франции в 1990 г были обнаружены штаммы, гомозиготные по локусу глюкозо-6-фосфатизомеразы (*GPI 90/90*). Поскольку ранее в течение 10 лет встречались только гетерозиготы *90/100*, гомозиготность приписывают половой рекомбинации (Sujkowski et al., 1994). В бассейне Колумбии (США) обычны изоляты, сочетающие A2 с *GPI 100/110* и A1 с *GPI 100/100*, однако в конце сезона 1994 г (16 августа и 9 сентября) были обнаружены штаммы, имеющие рекомбинантные генотипы (A1 *GPI 100/110* и A2 *GPI 100/100*) (Miller et al., 1997).

4) В некоторых популяциях из Польши (Sujkowski et al., 1994) и Северного Кавказа (Ахматханова и др., 2004) распределение фингерпринтных локусов ДНК и аллозимных локусов белков соответствует распределению Харди-Вайнберга, что свидетельствует о высокой доле вклада половой рекомбинации в изменчивость популяций. В других регионах России соответствия распределению Харди-Вайнберга в популяциях не обнаружено, но показано наличие неравновесного сцепления, свидетельствующего о преобладании клонального размножения (Еланский и др., 1999).

5) Генетическое разнообразие ( $G_{ST}$ ) между штаммами, имеющими разные типы спаривания (A1 и A2) было более низким, чем между разными популяциями (Sujkowski et al., 1994), что косвенно свидетельствует о половых скрещиваниях.

Таблица 2.

Встречаемость типов спаривания (% A2) в разных регионах

Годы	Япония (Kato et al., 1998)	Израиль (Cohen, 2002)	Россия, Моск. обл. (Воробьева и др., 1991; Долгова и др., 1996); Еланский и др., 1999)	Белоруссия (Авдей, 1995; не опубликовано )	Польша (Sujkowski et al.,1994)	Вост. Германия (Gotz, 1991)	Зап. Германия (Schober- Butin et al., 1995)
1987	54	100	79		0	0	41
1988	71	100	53		0	3	30
1989	90	100	65	2	29	27	33
1990	87	100		4	10	13	22
1991	90	100	76	2			8
1992	97			0			0
1993	97	30	3	23			23
1994		18		65			7
1995		10	5				
1996		0	87				
1997		5	17				
1998		0	26				
1999		30	63	40			
2000		3	65	38			
2001			30				

В то же время вклад половой рекомбинации в популяционное разнообразие не может быть очень высоким. Подсчет этого вклада был сделан в популяциях из Московской области (Еланский и др., 1999). По расчетам Левонтина (1979) «рекомбинация, которая может продуцировать новые варианты из двух локусов с частотой, не превышающей произведение их гетерозиготностей, становится эффективной только в том случае, если величины гетерозиготности по обоим аллелям уже высокие».

При обычном для Московской области соотношении двух типов спаривания, равных 4:1, частота рекомбинации составит 0,25. Вероятность того, что скрещивающиеся штаммы будут гетерозиготны по двум из трех изученных изоферментных локусов в исследованных популяциях составила 0,01 (2 штамма из 177). Следовательно, вероятность возникновения двойных гетерозигот в результате рекомбинации не должна превышать их произведение, помноженное на вероятность скрещивания ( $0,25 \times 0,02 \times 0,02 = 10^{-4}$ ), т.е. половые рекомбинанты обычно не попадают в исследованную выборку штаммов. Эти расчеты сделаны для популяций из Московской области, характеризующихся относительно высокой вариабельностью. В мономорфных популяциях, подобных сибирским, половой процесс, если даже и происходит в отдельных популяциях, не может оказать влияние на их генетическое разнообразие.

Кроме того, для *P. infestans* характерны частые нарушения расхождения хромосом в мейозе, что приводит к анеуплоидии. С помощью анализа расхождения RLP-маркеров показано, что 4% гибридов триплоиды (все 20 маркеров представлены в тройном наборе) и 30% - трисомии по разным хромосомам (Carter et al., 1999). Такие нарушения снижают фертильность гибридов.

### **Парасексуальная рекомбинация, митотическая конверсия генов**

В экспериментах по сращиванию штаммов *P. infestans*, имеющих мутации резистентности к разным ингибиторам роста, было обнаружено возникновение изолятов, устойчивых к обоим ингибиторам (Shattock, Shaw, 1975; Дьяков, Кузовникова, 1974; Кулиш, Дьяков, 1979). Устойчивые к двум ингибиторам роста штаммы возникали вследствие гетерокариотизации мицелия, и в этом случае расщеплялись при размножении одноядерными зооспорами (Judelson, Ge Yang, 1998), или не расщеплялись в монозооспоровом потомстве, ибо имели диплоидные (тетраплоидные, поскольку исходные изоляты диплоидны) ядра (Кулиш, Дьяков, 1979). Гетерозиготные диплоиды сегрегировали с очень низкой частотой вследствие гаплоидизации, нерасхождения хромосом и митотического кроссинговера (Поединок и др., 1982). Частоту этих процессов можно было увеличить с помощью определенных воздействий на гетерозиготные диплоиды (УФ-облучением прорастающих спор, обработкой *p*-фторфенилаланином).

Хотя формирование вегетативных гибридов с двойной устойчивостью происходит не только *in vitro*, но и в зараженных смесью мутантов картофельных клубнях (Кулиш и др., 1978), оценить роль парасексуальной рекомбинации в генерировании новых генотипов в популяциях сложно. Частота образования сегрегантов вследствие гаплоидизации, нерасхождения хромосом и митотического кроссинговера без специальных воздействий ничтожна (менее  $10^{-3}$ ).

В основе возникновения гомозиготных сегрегантов гетерозиготных штаммов может лежать как митотический кроссинговер, так и митотическая генная конверсия, которая у *P. sojae* протекает с частотой от  $3 \times 10^{-2}$  до  $5 \times 10^{-5}$  на локус в зависимости от штамма (Chamnanpant et al., 2001).

Хотя частота возникновения гетерокарионов и гетерозиготных диплоидов оказалась неожиданно высокой (достигает десятков процентов), этот процесс происходит только при сращивании мутантных культур, полученных из одного штамма. При использовании разных изолированных из природы штаммов гетерокариотизация не происходит (или происходит с очень низкой частотой) вследствие наличия вегетативной несовместимости (Поединок, Дьяков, 1981; Аникина и др., 1997,б; Cherepennikova-Anikina et al., 2002). Так что роль парасексуальной рекомбинации может быть сведена только к внутриклональной рекомбинации в гетерозиготных ядрах и переходу отдельных генов в гомозиготное состояние без полового процесса. Этот процесс может иметь эпидемиологическое значение у штаммов, имеющих рецессивную или полудоминантную мутацию устойчивости к фунгицидам. Переход ее в гомозиготное состояние вследствие парасексуального процесса повысит резистентность носителя мутации (Долгова, Дьяков, 1986).

### **Интрогрессия генов**

Гетероталлические виды *Phytophthora* способны скрещиваться с образованием гибридных ооспор (см. Воробьева, Гриднев, 1983; Sansome et al., 1991; Veld et al., 1998). Природный гибрид двух видов *Phytophthora* оказался настолько агрессивным, что уничтожил тысячи экземпляров ольхи в Великобритании (Brasier et al., 1999). *P. infestans* может встречаться с другими видами рода (*P. erythroseptica*, *P. nicotianae*, *P. cactorum* и др.) на общих растениях-хозяевах и в почве, но о возможности возникновения межвидовых гибридов в литературе мало сведений. В лабораторных условиях были получены гибриды между *P. infestans* и *P. mirabilis* (Goodwin, Fry, 1994).

## ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ

Изучение генетической структуры популяций в настоящее время основывается на анализе чистых культур (изолятов) входящих в нее штаммов. Анализ популяций без выделения изолятов также проводится с определенными целями, такими, например, как изучение агрессивности популяции или присутствия в ней устойчивых к фунгицидам штаммов (Филиппов и др, 2004, Деревягина и др., 1999). Этот тип исследований предполагает использование специальных методов, описание которых выходит за рамки предлагаемого обзора.

Для сравнительного анализа штаммов используют ряд методов, основанных как на анализе структуры ДНК, так и на изучении фенотипических проявлений. При сравнительном анализе популяций приходится иметь дело с большим количеством изолятов, что накладывает определенные требования на используемые методы. В идеале они должны соответствовать следующим требованиям (Cooke, Lees, 2004, Mueller, Wolfenbarger, 1999):

- быть дешевыми, несложными в исполнении, не требовать значительных временных затрат, базироваться на общедоступных технологиях (например, ПЦР),
- должны генерировать достаточно большое число независимых кодоминантных маркерных признаков,
- иметь высокую воспроизводимость,
- использовать минимальное количество исследуемой ткани,
- быть специфичными к субстрату – имеющееся в культуре загрязнение не должно влиять на результаты
- не требовать применения опасных процедур и сильно токсичных химикатов.

Методов, соответствующих всем вышеперечисленным параметрам, к сожалению, не существует. Для сравнительного исследования штаммов в наше время используются методы, основанные на анализе фенотипических признаков: тип спаривания, спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы, и на анализе структуры ДНК: полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (RFLP), который обычно дополняют гибридизационной пробой RG 57, анализ микросателлитных повторов (SSR и InterSSR), амплификация со случайными праймерами (RAPD), амплификация рестрикционных фрагментов (AFLP), амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов (например, Inter SINE PCR), определение гаплотипов митохондриальной ДНК.

### **Краткие описания методов сравнительного исследования штаммов, применяемых в работе с *P. infestans***

#### **Тип спаривания.**

Для проведения исследования необходимы тестерные штаммы с известными типами спаривания – A1 и A2. Исследуемый изолят высеивается с ними попарно в чашки Петри с овсяной агаризованной средой. После инкубации в течение 10 дней чашки изучаются на наличие или отсутствие ооспор в среде в зоне контакта штаммов. Возможны 4 варианта: штамм относится к типу спаривания A1, если он образует ооспоры с тестером A2, к A2, если образует ооспоры с тестером A1, к A1A2, если образует ооспоры с обоими тестерами, или является стерильным, если не образует ооспор ни с каким тестером (последние две группы встречаются редко).

#### **Спектры изоферментов**

Изоферментные маркеры обычно не зависимы от внешних условий, показывают менделевское наследование и являются кодоминантными, позволяя различать гомо- и гетерозиготы. Использование белков как генных маркеров позволяет регистрировать как крупные реорганизации генетического материала, включая хромосомные и геномные мутации, так и обнаруживать единичные аминокислотные замены.

Электрофоретические исследования белков показали, что большинство ферментов существуют в организмах в виде нескольких различающихся по электрофоретической подвижности фракций. Эти фракции - результат кодирования множественных форм ферментов разными локусами (изозимы или изоферменты) или разными аллелями одного локуса (аллозимы или аллоферменты). То есть изозимы — это разные формы одного фермента. Разные формы имеют одинаковую каталитическую активность, немного различаются по единичным аминокислотным заменам в составе пептида и по зарядам. Такие различия обычно устанавливаются при проведении электрофореза.

При исследовании штаммов *P. infestans* используют спектры изоферментов двух белков – пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы (этот фермент в Российских популяциях мономорфен, поэтому методы его изучения в данной работе не приводятся). Для их разделения на изозимы в электрическом поле на пластину целлюлозоацетатного геля, помещенную в электрическое поле, наносят белковые препараты из изучаемых организмов. Скорость диффузии в геле отдельных белков зависит от заряда и молекулярной массы, поэтому в электрическом поле происходит разделение смеси белков на отдельные фракции, которые можно визуализировать с помощью специальных красителей на соответствующий белок.

Исследование изоферментов пептидазы проводится на целлюлозо-ацетатных, крахмальных или полиакриламидных гелях. Наиболее удобным является метод, основанный на использовании целлюлозо-ацетатных гелей, производимых фирмой **Helena Laboratories Inc.** Он не требует больших количеств исследуемых материалов, позволяет получать контрастные полосы на геле после электрофореза для обоих локусов фермента, его проведение не требует больших временных и материальных затрат.

Небольшой кусочек мицелия переносится в микропробирку на 1,5 ml., к нему добавляется 1-2 капли дистиллированной воды. После этого образец гомогенизируется (например, электродрелью с пластмассовой насадкой, подходящей к микропробирке), осаждается в течение 25 секунд на центрифуге при 13000 об/мин. Из каждой микропробирки по 8 мкл. супернатанта переносится на плашку аппликатора.

Целлюлозо-ацетатный гель вынимают из контейнера с буфером, промокают между двумя листами фильтровальной бумаги и помещают рабочим слоем вверх на пластмассовую базу аппликатора. Раствор из плашки переносится аппликатором на гель 2-4 раза. Гель перемещают в электрофорезную камеру, на край геля помещается каплю краски (бромфеноловый синий) Электрофорез проводится в течение 20 мин. при 200 В. После электрофореза гель переносится на покрасочный столик, покраска проводится следующим раствором (таблица 3). После окончания электрофореза гель переносят для покраски на стекло. 10 мл 1,6 % DIFCO агара предварительно расплавляют в СВЧ печке, остужают до 60° С, 2 ml агара смешивают с покрасочной смесью (табл. 3) и выливают на гель, после чего в течение 15 - 20 мин проявляются полосы. Реактив L-amino-acid oxidase добавляют непосредственно перед смешиванием с расплавленным агаром.

Таблица 3

Покраска на спектр изоферментов пептидазы.

TRIS HCl, 0,05M, Ph 8,0	2 мл
Peroxidase, 1000 U/ml	5 капель
o-dianisidine, 4 mg/ml	8 капель
MgCl <sub>2</sub> , 20 mg/ml	2 капли
Gly-Leu, 15 mg/ml	10 капель
L-amino-acid oxidase, 20 u/ml	2 капли

В российских популяциях локус Per 1 представлен генотипами 100/100и 92/100. Гомозигота 92/92 встречается крайне редко (около 0,1%). Локус Per 2 представлен тремя генотипами 100/100, 100/112 и 112/112, причем все 3 варианта встречаются достаточно часто (рис. 3).

Метод исследования спектра изоферментов пептидазы подробно изложен в статье Еланского и Смирнова (Elanky, Smirnov, 2003; она доступна в Интернете по ссылке <http://www.kartofel.org/elansky.htm>).

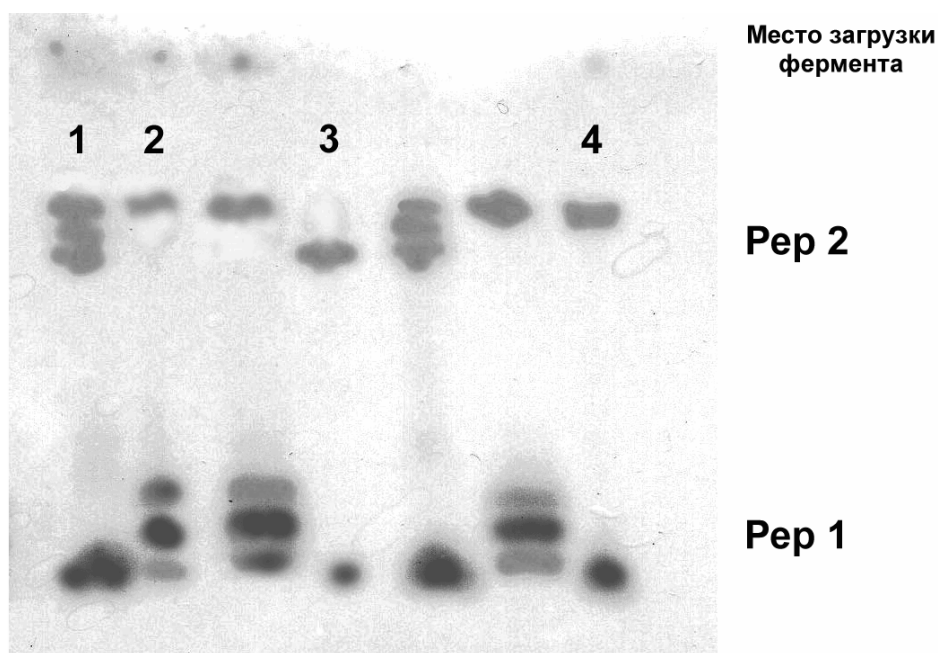


Рис. 3. Спектр изоферментов пептидазы после электрофоретического разделения. Генотипы (Per 1#Per 2): 1 – 100/100#100/112; 2 – 92/100#100/100; 3 – 100/100#112/112; 4 – 100/100#100/100.

### **Исследования генома.**

#### Полиморфизм длин рестриционных фрагментов с последующей гибридизацией (RFLP-RG 57)

Тотальную ДНК обрабатывают рестриктазой Eco R1, фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Ядерная ДНК очень большая и имеет много повторяющихся последовательностей, в связи с чем непосредственный анализ многочисленных фрагментов, полученных под действием рестриктаз, проводить сложно. Поэтому разделенные в геле фрагменты ДНК переносят на специальную мембрану и используют для гибридизации с зондом RG 57, в состав которого входят нуклеотиды, меченые радиоактивными или флюоресцентными метками. Этот зонд гибридизуется с многократно повторяющимися последовательностями генома (Goodwin et al., 1992, Forbes et al., 1998). После визуализации результатов гибридизации на свето- или радиоактивночувствительном материале получаем многолокусный профиль гибридизации (fingerprinting), представленный 25-29 фрагментами (Forbes et al., 1998). Бесплое (клоновое) потомство будет иметь одинаковые профили. По расположению полос на электрофорезе судят о сходстве и различиях сравниваемых организмов.

#### Гаплотипы митохондриальной ДНК

Митохондриальный геном *P. infestans* был сиквенирован (Paquin et al, 1997), ряд работ был посвящен анализу длин рестриционных фрагментов (Carter et al, 1990, Goodwin, 1991, Gavino, Fry, 2002). После того, как Griffith и Shaw (1998) разработали несложный и быстрый метод определения гаплотипов MtDNA, этот маркер стал одним из самых популярных при исследованиях *P. infestans*. Суть метода заключается в последовательной амплификации двух фрагментов митохондриальной ДНК (из общего генома) праймерами F2-R2 и F4-R4 (табл. 4) и их последующей рестрикции с помощью рестриктаз MspI (1-й фрагмент) и EcoR1 (2-й фрагмент). Он позволяет выделить 4 гаплотипа: Ia, IIa, Ib, IIb. Тип II отличается от типа I присутствием вставки размером 1881 пн и другим расположением сайтов рестрикции в регионах P2 и P4 (рис. 4). Последние 12 лет среди штаммов, собранных на территории России, отмечались только гаплотипы Ia и IIa. Их можно идентифицировать после разделения продуктов рестрикции с праймером F2-R2 в электрическом поле (рис. 5, 6)

Условия амплификации: 1x (500 сек. 94°C), 40x (30 сек. 90°C, 30 сек. 52°C, 90 сек. 72°C); 1x (5 мин. 72°C).

Реакционная смесь: (20 мкл): 0,2U Taq ДНК полимеразы, 1x 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-Taq-буфер, 0,2 mM каждого dNTP, 30 pM праймера и 5 ng исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 20 мкл.

Рестрикция ПЦР-продукта проводилась в течение 4-6 часов при температуре 37°C. Смесь для рестрикции (20 мкл): 10x MspI – 2 мкл, 10x restriction buffer – 2 мкл, деионизованная вода – 6 мкл, ПЦР- продукт – 10 мкл.

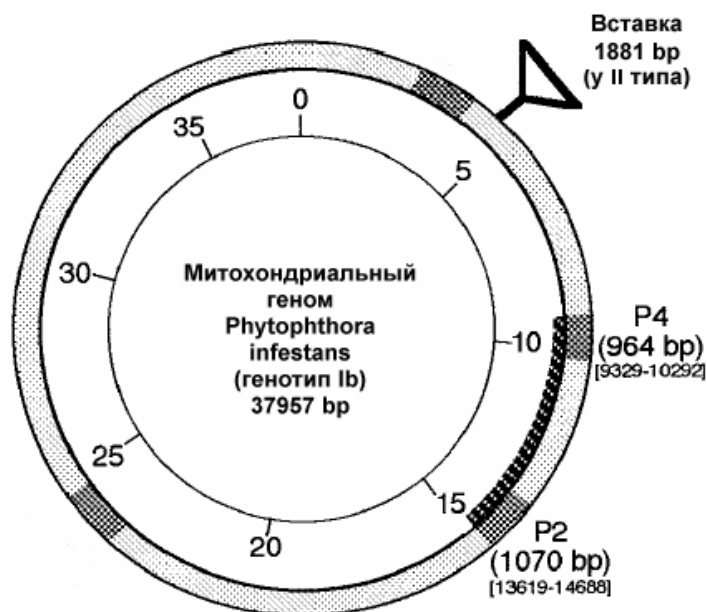


Рис. 4. Диаграмма, показывающая расположение локусов P2, P4 и вставки у 2-го типа. Темным (регион P2-P4) показана локализация длинного ПЦР-продукта, получающегося при амплификации с праймерами F4-R2.

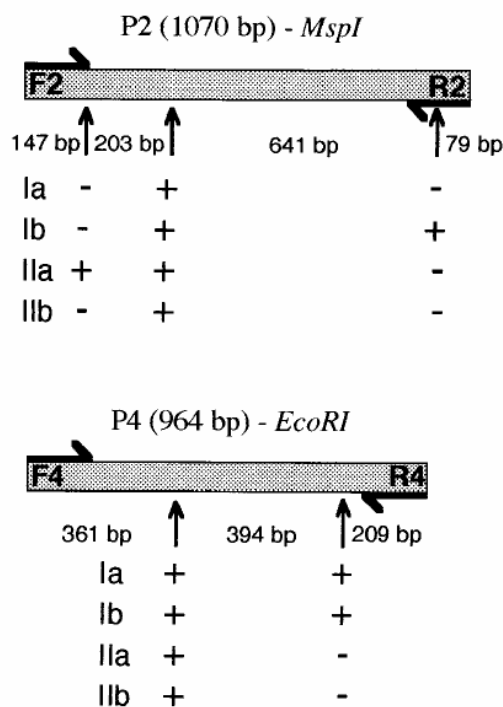


Рис.5. Продукты, получающиеся после рестрикции ПЦР-продуктов регионов P2 и P4 (Griffith, Shaw, 1998).

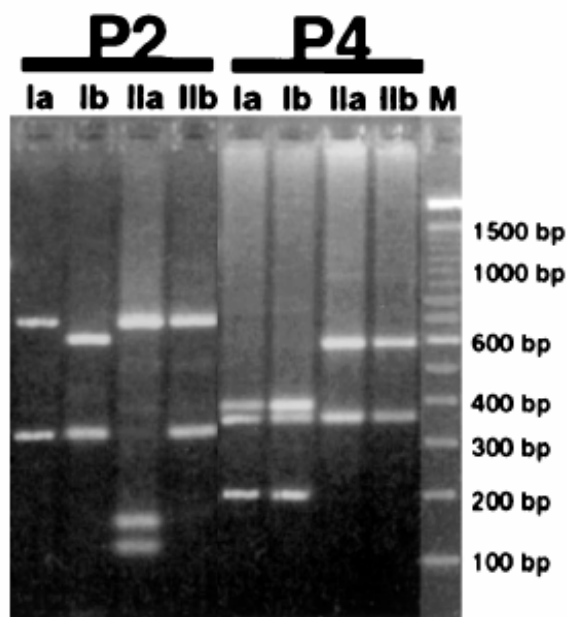


Рис. 6. Вид продуктов рестрикции после электрофоретического разделения (Griffith, Shaw, 1998).

Таблица 4

Праймеры, используемые для амплификации полиморфных регионов MtDNA

Локус	Праймер	Длина праймера и его размещение	Длина ПЦР-продукта	Рестриктаза
P2	F2: 5'- TTCCCTTTGTCCTCTACCGAT	21; 13619-13639	1070	MspI
	R2: 5'- TTACGGCGGTTTAGCACATACA	22; 14688-14667		
P4	F4: 5'- TGGTCATCCAGAGGTTTATGTT	22; 9329-9350	964	EcoRI
	R4: 5'- CCGATACCGATACCAGCACCAA	22; 10292-10271		

#### Амплификация со случайными праймерами (RAPD).

При проведении RAPD используют один праймер (иногда – несколько праймеров одновременно) с произвольной последовательностью нуклеотидов, длиной, как правило, 10 нуклеотидов, с высоким содержанием (от 50 %) GC-нуклеотидов и низкой температурой отжига (порядка 35°C). Такие праймеры «салятся» на многочисленные комплементарные сайты в геноме. После амплификации получается большое число фрагментов генома. Их число зависит от используемого праймера (праймеров) и условий реакции (концентрации MgCl<sub>2</sub> и температуры отжига). Визуализацию фрагментов проводят разгонкой в полиакриламидном или агарозном геле. При проведении RAPD анализа необходимо тщательно следить за чистотой анализируемого материала, т.к. контаминация другими живыми объектами может вызвать значительное увеличение артефактов, которых и при анализе чистого материала довольно много (Perez et al, 1998). Использование этого метода при исследовании генома *P. infestans* отражено во многих работах: Judelson, Roberts, 1999, Ghimire et al., 2002, Carlisle et al., 2001. Подбор условий реакции и праймеров (исследован 51 десятинуклеотидный праймер) приведен в статье Abu-El Samen et al., 2003.

#### Анализ микросателлитных повторов (SSR)

Микросателлитные повторы состоят из коротких последовательностей из 2-3 (до 6) нуклеотидов (например, CAT) которые повторяются много раз (CATCATCAT...). Количество повторов может различаться даже у разных индивидуумов. Праймеры должны быть гомологичны последовательностям, ограничивающим регионы с повторами, поэтому их разработка необходима для каждого вида живых организмов в отдельности и достаточно трудоемка. Однако, к счастью, для *P. infestans* эта работа уже проведена (Кнапова et al., 2001, Кнапова, Gisi, 2002) и SSR анализ не

представляет большой сложности. В работе использовали две группы праймеров на локусы Pi4B и Pi4G соответственно:

F: 5' - AAAATAAAGCCTTTGGTTCA и R: 5' - GCAAGCGAGGTTTGTAGATT

F: 5' - CGCTGTGTGGATGACAAGTA и R: 5' - TCGACCTGACATACGAGCTA

Реакционная смесь (15 мкл): 1x 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-Taq-буфер, 0,38 U Taq ДНК полимеразы, 0,075 mM каждого dNTP, 0,5 мкМ и 1 мкМ прямого и обратного праймера соответственно, 30 ng исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 15 мкл.

Условия амплификации: 35x (40 сек. 94°C, 40 сек. 58°C, 20 сек. 72°C); 1x (5 мин. 72°C).

Близким к этому методу является метод Inter SSR, который основан на использовании праймеров, представляющих собой участки микросателлитных повторов (например, CATCATCATCAT). Этот метод позволяет получить большое количество ПЦР-продуктов разного размера. Для уменьшения количества ПЦР-продуктов к праймеру добавляют один произвольный нуклеотид. Хорошие результаты при исследовании *P. infestans* показал праймер (GA)<sub>8</sub>C (Ю.М. Тикунов, личное сообщение).

Реакционная смесь (25 мкл): 1U Taq ДНК полимеразы, 1x 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>-Taq-буфер, 0,25 mM каждого dNTP, 30 pM праймера и 5 ng исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 25 мкл.

Условия амплификации: 5 мин. 94°C, 35 циклов: 1 мин. 94°C, 1 мин. 55°C, 2 мин. 72°C; 7 мин. 72°C.

#### Полиморфизм длин амплифицированных рестрикционных фрагментов (AFLP).

После рестрикции выделенной из объекта ДНК с помощью рестриктаз MseI и EcoRI на продуктах рестрикции остаются «липкие концы» (одноцепочечные участки ДНК). К этим «липким концам» надстраиваются специальные адаптеры с гомологичными «липким концам» участками. После этого проводится амплификация с праймерами, комплиментарными последовательностям адаптеров. Для уменьшения числа ПЦР-продуктов к праймерам добавляются 1 или 2 нуклеотида. Метод обладает хорошей воспроизводимостью. Подробное описание метода приведено в работах Mueller, Wolfenbarger, 1999, Savelkoul et al., 1999. Изучение применения 17 пар праймеров для AFLP *P. infestans* описано в работе Abu-El Samen et al., 2003.

#### Амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов

Мобильные элементы встречаются в большом числе в геномах большинства живых объектов. Поэтому, если сделать праймеры, комплиментарные стабильным последовательностям тех или иных мобильных элементов, можно амплифицировать участки генома, находящиеся между ними. В исследованиях возбудителя фитофтороза успешно применялся метод амплификации участков генома с помощью праймера, комплиментарного коровой последовательности ретропозона SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) (Лаврова, Еланский, 2003). Метод обладает очень высоким разрешением и средней воспроизводимостью.

#### **Особенности применения методов сравнительного исследования штаммов в популяционных исследованиях.**

При планировании исследования надо четко представлять цели, которые оно преследует, и использовать соответствующие методы. Так, некоторые методы позволяют генерировать большое число независимых маркерных признаков, но при этом имеют низкую воспроизводимую, сильно зависят от используемых реактивов, условий реакции, загрязненности исследуемого материала. Поэтому в каждом исследовании группы штаммов необходимо использовать несколько стандартных (референтных) изолятов, но даже и в этом случае результаты нескольких экспериментов очень трудно объединить. К этой группе методов можно отнести RAPD, AFLP, InterSSR, InterSINE PCR. После амплификации получается большое число фрагментов ДНК разного размера. Подобные методики целесообразно использовать в случае необходимости установления различий между близкородственными штаммами (родители-потомки, дикий тип-мутанты, и т.д), либо в других случаях, когда необходим детальный анализ небольшой выборки. Так, метод AFLP широко используется при генетическом картировании у *P. infestans* (van der Lee et al., 1997) и при внутривидовых исследованиях (Кнарова, Gisi, 2002, Cooke et al, 2003, Flier et al, 2003). Эти методы нецелесообразно использовать при создании баз данных штаммов, т.к. практически невозможно унифицировать учет результатов при проведении анализов в разных лабораториях. При кажущейся простоте и быстроте исполнения (выделение ДНК без хорошей очистки, амплификация, визуализация результатов) эта группа методов требует применения специального метода

документирования результатов: разгонки в полиакриламидном геле с мечеными (радиоактивно или люминисцентно) праймерами и последующей засветки свето- или радиоактивночувствительного материала. Обычный метод визуализации в агарозном геле с бромистым этидием для этих методов обычно непригоден, т.к. большое число фрагментов ДНК разного размера может сливаться.

Другие методы, напротив, позволяют генерировать малое число признаков при их очень высокой воспроизводимости. К этой группе можно отнести исследование гаплотипов митохондриальной ДНК (в России отмечены только два гаплотипа Ia и IIa), тип спаривания (большинство изолятов подразделяются на 2 типа: A1 и A2, редко встречаются самофертильные SF) и спектры изоферментов пептидазы (два локуса *Per1* и *Per2*, состоящие из двух изозимов каждый) и глюкозо-6-фосфат изомеразы (в России варибельности по этому признаку нет, хотя в других странах мира отмечается значительный полиморфизм). Эти признаки целесообразно использовать при анализе коллекций, составлении баз данных регионального и мирового масштаба. В случае анализа изоферментов и гаплотипов митохондриальной ДНК можно обойтись вообще без стандартных штаммов, при анализе типов спаривания необходимо два тестерных изолята с известными типами спаривания. Условия реакции и реактивы могут влиять только на контрастность продукта на электрофореграмме, проявление артефактов в этих видах исследований маловероятно.

В настоящее время большинство популяций в европейской части России представлены штаммами обоих типов спаривания (табл. 2), среди них встречаются изоляты с Ia и IIa типами митохондриальной ДНК (другие 4 типа, встречающиеся в мире, в России после 1993 года не обнаружены). Спектры изоферментов пептидазы представлены двумя генотипами по локусу *Per 1* (100/100, 92/92 и гетерозигота 92/100, причем генотип 92/92 встречается крайне редко (<0,3%)) и двумя генотипами по локусу *Per 2* (100/100, 112/112 и гетерозигота 100/112, причем генотип 112/112 встречается реже 100/100, но тоже достаточно часто). Варибельности спектра изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы после 1993 года (исчезновение клональной линии US-1) не отмечено, все исследованные изоляты имели генотип 100/100 (Elansky, Smirnov, 2002).

Третья группа методов позволяет получить достаточную группу независимых маркерных признаков при высокой воспроизводимости. На сегодняшний день к этой группе можно отнести пробу RFLP-RG57, при использовании которой получается 25-29 фрагментов ДНК разного размера. Поэтому использовать RFLP-RG57 можно как при анализе выборок, так и при составлении баз данных. Однако этот метод значительно дороже предыдущих, требует больших временных затрат на его проведение, необходимо достаточно большое количество ДНК высокой очистки. Поэтому исследователь вынужден ограничивать объем тестируемого материала.

Разработка RFLP-RG57 в начале 90-х годов прошлого века существенно активизировала популяционные исследования возбудителя фитофтороза. Он стал основой метода, основанного на выделении и анализе «Клональных линий» (см. ниже). Наряду с RFLP-RG57 для идентификации клональных линий применяют тип спаривания, фингерпринтинг ДНК (метод RFLP-RG57), спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы и тип митохондриальной ДНК. Благодаря ему было показано глобальное распространение клона US-1 (Goodwin et al., 1994), смена старых популяций новыми (Drenth et al, 1993, Sujkowski et al, 1994, Goodwin et al, 1995a), выявлены клональные линии, преобладающие во многих странах мира. Исследования российских штаммов с использованием этого метода показало высокий генотипический полиморфизм штаммов Европейской части и мономорфизм популяций Азиатской и Дальневосточной частей России (Elansky et al, 2001). И сейчас этот метод остается основным при проведении популяционных исследований *P. infestans*. Однако широкому его распространению препятствуют довольно высокая стоимость и трудоемкость в исполнении.

Другим перспективным методом, пока довольно редко используемому в исследованиях *P. infestans*, является анализ микросателлитных повторов (SSR). Он генерирует небольшое (4-7) число ПЦР-продуктов, что делает возможным учет результатов в агарозном геле. Используемая ДНК не требует высокой очистки. Его применение для анализа структуры популяций *P. infestans* на картофеле и томате из Франции и Швейцарии показало хорошие результаты (Кнарoва et al., 2001, Кнарoва, Gisi, 2002).

Для анализа штаммов широко использовались (и продолжают использоваться) такие фенотипические маркерные признаки, как наличие генов вирулентности к сортам картофеля (Авдей, 1995, Иванюк и др., 2002, Уланова и др., 2003) и томата. К настоящему времени гены вирулентности к сортам картофеля утратили свою ценность как маркерные признаки для популяционных исследований в связи с появлением максимального (или близкого к нему) числа генов вирулентности у подавляющего большинства изолятов. В то же время ген вирулентности T1 к сортам

томата, несущим соответствующий ген Ph1, до сих пор успешно используется в качестве маркерного признака (Лаврова и др., 2003, Уланова и др., 2003).

Во многих работах в качестве маркерного признака используется устойчивость к фунгицидам. Этот признак нежелательно использовать в популяционных исследованиях в связи с достаточно легким появлением мутаций устойчивости в клональных линиях после применения металаксил- (или мефеноксам-) содержащих фунгицидов на поле. Например, существенные различия по уровню устойчивости показаны внутри клональной линии Sib1 (Elansky et al., 2001).

Итак, предпочтительными маркерными признаками для создания банков данных и маркирования штаммов в коллекциях являются тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, тип митохондриальной ДНК, RFLP-RG57. Для сравнения ограниченных выборок, при необходимости применения максимального числа маркерных признаков, можно использовать AFLP, RAPD, SSR, InterSSR, Inter-SINE PCR. Однако следует помнить, что эти методы слабовоспроизводимы, и в каждом отдельном эксперименте (цикле амплификация – электрофорез) необходимо использовать несколько референтных изолятов.

Таблица 5

Сравнение методов сравнительного исследования штаммов по практически важным критериям

Критерий	ТС	Изоферменты	MtDNA	RFLP-RG57	RAPD	ISSR	SSR	AFLP	Rev SINE PCR
Количество информации	Н	Н	Н	С	В	В	С	В	В
Воспроизводимость	В	В	В	В	Н	Н	С	С	С
Возможность артефактов	Н	Н	Н	Н	В	С	Н	С	В
Стоимость	Н	С	Н	В	Н	Н	Н	С	Н
Трудоемкость	Н	Н	Н	В	НС*	НС*	Н	С	НС*
Скорость проведения анализа**	В	Н	Н	С	Н	Н	Н	Н	Н

Прим.: Н – низкая, С – средняя, В – высокая; НС\* - трудоемкость низкая при использовании агарозного геля или автоматического генотайпера, средняя – при разгонке в полиакриламидном геле с мечеными праймерами,

\*\* - не считая затрат времени на наращивание мицелия для выделения ДНК.

## СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ

В отсутствие рекомбинации или при незначительном ее вкладе в популяционную структуру популяция состоит из некоторого числа клонов, генетические обмены между которыми крайне редки. В таких популяциях более информативно изучение не частот отдельных генов, а частот генотипов, имеющих общее происхождение (**клональных линий** или clonal lineages) и различающихся лишь точковыми мутациями. Популяционные исследования возбудителя фитофтороза и анализ **клональных линий** существенно ускорились после появления метода RFLP-RG57 в начале 90-х годов прошлого века. Наряду с RFLP-RG57 для идентификации клональных линий применяют тип спаривания, фингерпринтинг ДНК (метод RFLP-RG57), спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы и тип митохондриальной ДНК. Характеристика наиболее часто встречающихся клональных линий приведена в таблице 6.

Клон US-1 повсеместно доминировал в популяциях до конца 80-х годов XX века, после чего стал заменяться другими клонами и исчез в Европе и Северной Америки. Сейчас он встречается на Дальнем Востоке (Филиппины, Тайвань, Китай, Япония, Корея, Koh et al., 1994, Mosa et al., 1993), в Африке (Уганда, Кения, Руанда, Goodwin et al., 1994, Vega-Sanchez et al., 2000; Ochwo et al., 2002) и в Южной Америке (Эквадор, Бразилия, Перу, Forbes et al., 1997, Goodwin et al., 1994). Не было идентифицировано штаммов, принадлежащих к линии US-1 только в Австралии. По-видимому, в Австралию изоляты *P. infestans* попали с другой волной миграции (Goodwin, 1997).

Клон US-6 мигрировал из Северной Мексики в Калифорнию в конце 70-х годов и вызвал там эпидемию на картофеле и томатах после 32 лет отсутствия болезни. В связи с высокой агрессивностью он вытеснил клон US-1 и стал доминировать на западном побережье США (Goodwin et al., 1995a).

Генотипы US-7 и US-8 были обнаружены в США в 1992 г и уже в 1994 г широко распространились в США и Канаде. В течение одного полевого сезона клон US-8 способен почти полностью вытеснить клон US-1 на картофельных полях исходно зараженных обоими клонами в равной концентрации (Miller, Johnson, 2000).

Клоны BC-1 – BC-4 изолированы в Британской Колумбии у небольшого числа изолятов Goodwin et al., 1995b). Клон US-11 широко распространился в США и вытеснил US-1 на Тайване. Клоны JP-1 и EC-1 наряду с клоном US-1 распространены в Японии и Эквадоре соответственно (Koh et al., 1994; Forbes et al., 1997).

SIB-1 – клон, доминирующий в России на огромной территории от Московской обл. до Сахалина. Его тип спаривания A1. В Московской обл. он был обнаружен в 1993 г., причем некоторые полевые популяции состояли преимущественно из штаммов этой клональной линии, высокоустойчивых к металаксилу. После 1993 г. его широкого распространения не отмечалось. За Уралом в 1997-1998 годах встречался повсюду за исключением Хабаровского края (там распространен клон SIB-2, имеющий тип спаривания A2) в сборах 1995, 1997 и 1998 гг. Пространственное разделение клонов, имеющих разные типы спаривания, исключает половой процесс на территории Сибири и Дальнего Востока. В Московской области, в отличие от Сибири, популяция представлена множеством клонов, так что почти каждый изолят имеет уникальный мультилокусный генотип (Elansky et al., 2001). Это разнообразие нельзя объяснить только завозом штаммов гриба из разных районов мира с посадочными клубнями. Поскольку в популяции встречаются оба типа спаривания, возможно, ее разнообразие обусловлено также рекомбинацией. Так, в Британской Колумбии предполагается возникновение генотипов BC-2, BC-3 и BC-4 вследствие гибридизации клонов BC-1 и US-6 (Goodwin et al., 1995b). Возможно, и в Московских популяциях встречаются гибридные штаммы. Например, гетерозиготные по PEP-локусу штаммы MO-4, MO-8 и MO-11 могут быть гибридами между штаммами MO-12, MO-21, MO-22, имеющими тип спаривания A2 и гомозиготными по одной аллели PEP-локуса и штаммом MO-8, имеющим тип спаривания A1 и гомозиготным по другой аллели локуса. А если это так, и в современных популяциях *P. infestans* имеется тенденция к усилению роли полового процесса, то информационное значение анализа мультилокусных клонов будет падать, как это показано для подмосковных популяций.

Таблица 6.

Мультилокусные генотипы некоторых клональных линий *Phytophthora infestans*

Название	Тип спаривания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК	Тип MtDNA
		GPI	PEP		
US-1	A1	86/100	92/100	1011101011001101000110011	Иb
US-2	A1	86/100	92/100	1011101001001101011110011	—
US-3	A1	86/100	92/100	1011100000001101000110011	—
US-4	A1	100/100	92/92	1011101001001101100110011	—
US-5	A1	100/100	92/100	1011101001001101011110011	—
US-6	A1	100/100	92/100	1011111001001100010110011	Иb
US-7	A2	100/111	100/100	1001100001001101010110011	Ia
US-8	A2	100/111/122	100/100	1001100001001101000110111	Ia
US-9	A1	100/100	83/100	—*	—
US-10	A2	111/122	100/100	—	—
US-11	A1	100/111	92/100	1010111001001101010110011	Иb
US-12	A1	100/111	92/100	1000100001001100010110011	—
US-14	A2	100/122	100/100	1000000000001100010110011	—
US-15	A2	100/100	92/100	1000100001001110010110011	Ia
US-16	A1	100/111	100/100	1000110001001101010110011	—
US-17	A1	100/122	100/100	1010001000001101010110011	—
US-18	A2	100/100	92/100	1000100001001101000110011	Ia
US-19	A2	100/100	92/100	1010101000001101000110011	Ia
EC-1	A1	90/100	96/100	1111101001001101000111011	IIa
SIB-1	A1	100/100	100/100	1000100011001101000110011	IIa
SIB-2	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	IIa
SIB-3	A1	100/100	100/100	1100101010001101000110011	IIa
MO-1	A2	100/100	100/100	1000100011001101000110011	IIa
MO-2	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	Ia
MO-3	A1	100/100	100/100	1010100001001101000110011	IIa
MO-4	A1	100/100	92/100	1010111011001101000110011	IIa
MO-5	A1	100/100	100/100	1000101001001101010110011	IIa
MO-6	A1	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia
MO-7	A1	100/100	92/100	1000100011001100000110011	IIa
MO-8	A1	100/100	92/92	1010110001001100000110011	IIa
MO-9	A1	100/100	92/100	1000100001001101000110011	IIa
MO-10	A1	100/100	100/100	1010110000001100000110011	Ia
MO-11	A1	100/100	92/100	1010101001001100000110011	Ia
MO-12	A2	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia
MO-13	A1	100/100	100/100	1010101000001101000110011	Ia
MO-14	A1	100/100	100/100	0010101001001100000110011	Ia
MO-15	A1	100/100	100/100	0110111001001100010110011	Ia
MO-16	A1	100/100	100/100	1000100000001101000110011	IIa
MO-17	A1	86/100	100/100	1010101011001101000110011	Иb
MO-18	A1	100/100	100/100	1010111001001101000010011	IIa
MO-19	A1	100/100	100/100	1010101000001101010110011	IIa
MO-20	A2	100/100	100/100	1010101000001101000110011	IIa
MO-21	A2	100/100	100/100	1010101000001100010110011	IIa

Прим. \* — нет данных.

### Изменчивость в клональных линиях.

До 90-х годов 20 века в мире была широко распространена клональная линия US-1. Большинство полевых и региональных популяций состояли исключительно из штаммов с генотипом US-1. Однако при этом наблюдались и различия между изолятами, вызванные, вероятнее всего, мутационным процессом. Мутации отмечались в ядерной и митохондриальной ДНК, уровне устойчивости к фениламидным препаратам, в числе генов вирулентности к сортам картофеля. Линии, отличающиеся от исходных генотипов мутациями, обозначаются как дополнительные номера через точку после названия исходного генотипа (например, мутантная линия US-1.1 клональной линии US-1). Фингерпринтинги ДНК линии US-1.5 и US-1.6 содержат добавочные линии разного размера (Goodwin et al., 1995a, 1995b), клональная линия US-6.3 также отличается от US-6 добавочной линией на фингерпринтинге (Goodwin, 1997, табл. 7).

При исследовании митохондриальной ДНК выяснилось, что в клональной линии US-1 встречается только 1b тип митохондриальной ДНК (Carter et al., 1990). Однако при исследовании штаммов этой клональной линии из Перу и Филиппин были отмечены изоляты, типы митохондриальной ДНК которых отличались от 1b наличием вставок и делеций (Goodwin, 1991, Koh et al., 1994).

Также встречаются изменения в спектрах изоферментов. Как правило, они вызваны распадом исходно гетерозиготного по этому ферменту организма на гомозиготные. В 1993 году на плодах томата нами был идентифицирован штамм с характерными для US-1 признаками: фингерпринтингом, типом митохондриальной ДНК и генотипом 86/100 по глюкозо-6-фосфатизомеразе, но он был гомозиготен (100/100) по первому локусу пептидазы вместо типичной для этой клональной линии гетерозиготы 92/100. Генотип этого штамма мы назвали MO-17 (таблица ). Мутантные линии US-1.1 и US-1.4 отличаются от US-1 мутациями в первом локусе пептидазы.

Таблица 7

Мультилокусные генотипы и их мутантные линии

Название	Тип спаривания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК (RG57)	Примечания
		GPI	PEP-1		
<b>US-1</b>	<b>A1</b>	<b>86/100</b>	<b>92/100</b>	<b>1011101011001101000110011</b>	Исходный генотип 1
US-1.1	A1	86/100	<u>100</u> /100	1011101011001101000110011	Мутация в PEP
US-1.2	A1	86/100	92/100	101110101 <u>000</u> 1101000110011	Мутация в RG57
US-1.3	A1	86/100	92/100	10111010 <u>0</u> 1001101000110011	Мутация в RG57
US-1.4	A1	86/100	<u>100</u> /100	101110101 <u>000</u> 1101000110011	Мутация в RG57 и PEP
US-1.5	A1	86/100	92/100	10111010110011010 <u>1</u> 0110011	Мутация в RG57
<b>US-6</b>	<b>A1</b>	<b>100/100</b>	<b>92/100</b>	<b>1011111001001100010110011</b>	Исходный генотип 2
US-6.1	A1	100/100	92/ <u>92</u>	1011111001001100010110011	Мутация в PEP
US-6.2	A1	100/100	92/100	10111 <u>0</u> 1001001100010110011	Мутация в RG57
US-6.3	A1	100/100	92/100	10111110010 <u>1</u> 1100010110011	Мутация в RG57
US-6.4	A1	100/100	<u>100</u> /100	1011 <u>0</u> 11001001100010110011	Мутация в RG57 и PEP
US-6.5	A1	100/100	92/100	1011111001001100010 <u>0</u> 10011	Мутация в RG57
<b>BR-1</b>	<b>A2</b>	<b>100/100</b>	<b>100/100</b>	<b>1011101000001100001111011</b>	Исходный генотип 3
BR-1.1	A2	100/100	100/100	101010100000110000111 <u>0</u> 011	Мутация в RG57

Мутации, ведущие к изменениям числа генов вирулентности к сортам картофеля и томата встречаются довольно часто. Они были отмечены среди изолятов клональной линии US-1 в популяциях из Нидерландов (Drenth et al., 1994), Перу (Goodwin et al., 1995a), Польши (Sujkowski et al., 1991), северной части Северной Америки (Goodwin et al., 1995b). Различия в числе генов вирулентности к картофелю также были отмечены среди изолятов клональных линий US-7 и US-8 в Канаде и США (Goodwin et al., 1995a), среди изолятов линии Sib-1 в Азиатской части России (Elansky et al, 2001).

Изоляты, имеющие сильные различия в уровнях устойчивости к фениламидным препаратам, были идентифицированы в моноклональных полевых популяциях, все штаммы в которых принадлежали к клональной линии Sib-1 (Elansky et al, 2001). Почти все штаммы клональной линии US-1 отличаются высокой чувствительностью к металаксилу. Однако высокоустойчивые изоляты были выделены на Филиппинах (Koh et al., 1994) и в Ирландии (Goodwin et al., 1996).

## ДИНАМИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ПОПУЛЯЦИЙ

Изменения генотипического состава популяций *P. infestans* могут происходить под влиянием миграции новых клонов из других регионов, агротехнических приемов (смены сортов, применения фунгицидов) и погодных условий. Внешние воздействия влияют неодинаково на клоны, находящиеся на разных этапах жизненного цикла, поэтому в популяциях ежегодно протекают циклические смены частот генов, подверженных отбору, обусловленные сменой преобладающей роли генного дрейфа и отбора.

### Влияние сорта

Новые сорта с эффективными генами вертикальной устойчивости (R-генами) являются мощным селективным фактором, отбирающим в популяциях *P. infestans* клоны с комплементарными генами вирулентности. При отсутствии у сорта картофеля неспецифической устойчивости, сдерживающий рост популяции патогена, процесс смены доминирующих в популяции клонов происходит очень быстро. Так, после распространения в Московской области сорта Домодедовский, имеющего ген устойчивости R3, частота клонов, вирулентных для этого сорта, за один год выросла с 0,2 до 0,82 (Dyakov, Derevjagina, 2000). Однако смена частот генов вирулентности (патотипов) в популяциях происходит не только под влиянием выращиваемых сортов картофеля. Например, в Белоруссии до 1977 г доминировали клоны с генами вирулентности 1 и 4, что было вызвано выращиванием сортов картофеля, имеющих гены устойчивости R1 и R4 (Дорожкин, Бельская, 1979). Однако в конце 70х годов XX века появились клоны, имеющие различные гены вирулентности и их сочетания, причем комплементарные им гены устойчивости никогда не были использованы в селекции картофеля (лишние гены вирулентности) (Иванюк и др., 2002). Причина появления таких клонов, по-видимому, обусловлена миграцией в Европу инфекционного материала из Мексики с клубнями картофеля. На родине эти клоны развивались не только на культурном картофеле, но и на диких видах, несущих разнообразные гены устойчивости, поэтому сочетание в геноме многих генов вирулентности было необходимо для выживания в тех условиях.

Что касается сортов с неспецифической устойчивостью, то они, снижая скорость размножения патогена, задерживают эволюцию его популяций, которая, как уже было сказано, является функцией численности. Поскольку агрессивность полигенна, клоны, содержащие большее число генов "агрессивности", накапливаются тем скорее, чем выше численность популяции. Поэтому высоко агрессивные расы не являются продуктом адаптации к выращиваемым сортам с неспецифической устойчивостью, а наоборот, скорее выявляются в посадках высоковосприимчивых сортов, которые являются накопителями спор паразита. Так, в России наиболее агрессивные популяции *P. infestans* обнаружены в зонах ежегодных эпифитотий (Сахалин, Ленинградская, Брянская области). Агрессивность этих популяций оказалась более высокой, чем Мексиканской (Филиппов и др., 2004).

Кроме того, в листьях устойчивых сортов формируется меньше ооспор, чем в восприимчивых (Hanson, Shattock, 1998), то есть неспецифическая устойчивость сорта также снижает рекомбинационные способности паразита и возможность альтернативных способов зимовки.

### Влияние фунгицидов

Фунгициды не только снижают численность фитопатогенных грибов, т.е. влияют на количественную характеристику их популяций, но могут также изменять частоты отдельных генотипов, т.е. влиять на качественный состав популяций. Среди важнейших показателей популяций, изменяющихся под влиянием фунгицидов можно назвать следующие: изменение резистентности к фунгицидам, изменение агрессивности и вирулентности и изменение систем размножения.

### Влияние фунгицидов на резистентность и агрессивность популяций

Степень подобного влияния определяется, прежде всего, типом используемого фунгицида, которые можно условно разделить на *полисайтовые*, *олигосайтовые* и *моносайтовые*.

К первым относится большинство **контактных фунгицидов**. Резистентность к ним (если она возможна вообще) контролируется большим числом очень слабо экспрессивных генов. Эти свойства обуславливают отсутствие видимых изменений резистентности популяции после обработки ее фунгицидами (хотя в экспериментах некоторое повышение резистентности было получено при работе со многими грибами (в том числе с *P. infestans*)). Грибная популяция, сохранившаяся после опрыскиваний контактными фунгицидами, состоит из двух групп штаммов:

1) Штаммы, сохранившиеся на участках растений, не обработанных препаратом. Поскольку контакта с фунгицидом не было, агрессивности и резистентности этих штаммов не меняются.

2) Штаммы, контактировавшие с фунгицидом, концентрация которого в местах контакта была ниже летальной. Как было сказано выше, резистентность этой части популяции также не меняется, однако, вследствие частичного повреждающего действия фунгицида даже в сублетальной концентрации на метаболизм грибной клетки, падает общая приспособленности и ее паразитический компонент – агрессивность (Деревягина, Дьяков, 1990).

Таким образом, даже не погибшая часть популяции, подвергнутая контакту с фунгицидом, имеет слабую агрессивность и не может быть источником эпифитотии. Поэтому тщательная обработка, снижающая частоту не контактирующей с фунгицидом доли популяции — условие успеха защитных мероприятий.

Устойчивость к **олигосайтовым фунгицидам** (большой частью – системным) контролируется несколькими аддитивными генами. Мутация каждого гена приводит к некоторому повышению резистентности, а общая степень резистентности обусловлена сложением таких мутаций. Поэтому повышение резистентности происходит ступенчато. Примером ступенчатого увеличения резистентности является фунгицид диметоморф, широко используемый для защиты картофеля от фитофтороза. Устойчивость к диметоморфу полигенна и аддитивна. Одношаговая мутация незначительно повышает резистентность. Каждая следующая мутация уменьшает размер мишени и, следовательно, частоту последующих мутаций (Bagirova et al., 2001). Увеличение средней резистентности популяции после многократных обработок олигосайтовым фунгицидом происходит ступенчато и постепенно. Скорость этого процесса определяется, по крайней мере, тремя факторами: частотой мутирования генов резистентности, коэффициентом резистентности (отношением летальной дозы резистентного штамма по отношению к чувствительному) и влиянием мутаций генов резистентности на приспособленность.

Частота возникновения каждой последующей мутации ниже, чем предыдущей, поэтому процесс имеет затухающий характер (Bagirova et al., 2001). Однако, если в популяции протекают рекомбинационные процессы (половой или парасексуальный), то возможно объединение в гибридном штамме разных мутаций родителей и ускорение процесса. Поэтому панмиксные популяции приобретают резистентность быстрее агамных, а у последних – популяции, не имеющие барьеров вегетативной несовместимости, быстрее, чем популяции, подразделенные такими барьерами. В связи с этим наличие в популяциях штаммов, различающихся типами спаривания, ускоряет процесс приобретения резистентности к олигосайтовым фунгицидам.

Второй и третий факторы не способствуют быстрому накоплению резистентных к диметоморфу штаммов в популяциях. Каждая последующая мутация увеличивает резистентность примерно вдвое, что незначительно, и при этом снижает как скорость роста на искусственной среде, так и, особенно, агрессивность (Bagirova et al., 2001; Stem, Kirk, 2004). Может быть поэтому среди природных штаммов *P. infestans*, даже собранных из обработанных диметоморфом посадок картофеля, практически нет резистентных.

Популяция, подвергнутая обработке олигосайтовым фунгицидом, также будет состоять из двух групп штаммов: не контактировавшие с фунгицидом, и поэтому не изменившие первоначальных признаков (если среди этой группы и встречаются резистентные штаммы, они не будут накапливаться вследствие более высокой агрессивности и конкурентоспособности чувствительных штаммов), и штаммов, контактировавших с сублетальными концентрациями фунгицида. Именно среди последних возможно накопление резистентных штаммов, ибо здесь они имеют преимущества перед чувствительными. Поэтому при использовании олигосайтовых фунгицидов важна не столько тщательная обработка, сколько высокая концентрация препарата, в несколько раз превышающая летальную дозу, ибо при ступенчатом мутагенезе начальная резистентность мутатных штаммов невелика.

Наконец, мутации резистентности к **моносайтовым фунгицидам** высоко экспрессивны, то есть одна мутация может сообщить высокий уровень резистентности вплоть до полной потери чувствительности. Поэтому повышение резистентности популяций происходит очень быстро. Примером таких фунгицидов могут быть фениламины, включая наиболее распространенный препарат ридомил (металаксил). Мутации устойчивости к нему возникают с высокой частотой, причем степень резистентности у мутантов очень высокая – превышает чувствительный штамм в тысячу и больше раз (Деревягина и др., 1993). Хотя скорость роста и агрессивность резистентных мутантов снижается, на фоне гибели чувствительных штаммов от системного фунгицида, численность резистентной популяции быстро растет и параллельно повышается ее агрессивность. Поэтому через несколько лет

использования фунгицида агрессивность резистентных штаммов может не только сравняться с агрессивностью чувствительных, но и превзойти ее (Деревягина, Дьяков, 1992).

### **Влияние фунгицидов на системы размножения и частоту рекомбинации**

**Влияние на половую рекомбинацию.** Поскольку частое нахождение типа спаривания *A2* в популяциях *P. infestans* совпало по времени с интенсивным использованием металаксилла против фитофтороза, было предположено, что металаксил вызывает конверсию типов спаривания. У вида *P. parasitica* такая конверсия под действием хлоронеба и металаксилла была доказана экспериментально (Ко, 1994). Однократный пассаж на среде с низкой концентрацией металаксилла привел к возникновению гомотоллических изолятов из чувствительного к металаксилу штамма *P. infestans* с типом спаривания *A1* (Savenkova, Cherepnikova-Anikina, 2002). При последующих пассажах на средах с более высокой концентрацией металаксилла не удалось обнаружить ни одного изолята, имеющего тип спаривания *A2*, однако большинство изолятов при скрещивании с изолятами *A2* вместо ооспор формировали уродливые скопления мицелия и были стерильными. Пассажи резистентного штамма, имеющего тип спаривания *A2*, на средах с высокой концентрацией металаксилла позволили обнаружить три формы изменений типа спаривания: 1) полную стерильность при скрещивании с изолятами *A1* и *A2*; 2) гомоталлизм (формирование ооспор в монокультуре); 3) конверсия *A2* типа спаривания в *A1*. Таким образом, металаксил может быть причиной изменений типов спаривания в популяциях *P. infestans* и, следовательно, протекания в них половой рекомбинации.

**Влияние на вегетативную рекомбинацию.** Некоторые гены резистентности к антибиотикам увеличивали частоту гетерокариотизации гиф и диплоидизации ядер (Поединок, Дьяков, 1981). Как было сказано, гетерокариотизация гиф при сращивании разных штаммов *P. infestans* происходит очень редко вследствие явления вегетативной несовместимости у этого гриба. Однако гены устойчивости к некоторым антибиотикам могут оказывать побочные действия, выражающиеся в преодолении вегетативной несовместимости. Таким свойством обладал ген устойчивости к стрептомицину мутанта 1S-1. Наличие подобных мутантов в полевых популяциях фитофторы может увеличить поток генов между штаммов и ускорить адаптацию всей популяции к новым сортам или фунгицидам.

Некоторые фунгициды и антибиотики могут оказывать влияние на частоту митотической рекомбинации, также способной изменять частоты генотипов в популяциях. Широко используемый фунгицид беномил связывается с  $\beta$ -тубулином – белком, из которого построены микротрубочки цитоскелета, и тем самым нарушает процессы рахождения хромосом в анафазе митоза, увеличивая частоту митотической рекомбинации (Hastie, 1970). Таким же свойством обладает фунгицид парафторфенилаланин, используемый для лечения язв от голландской болезни. Парафторфенилаланин увеличивал частоту рекомбинации и у гетерозиготных диплоидов *P. infestans* (Поединок и др., 1982).

### **Циклические изменения генотипического состава популяций в жизненном цикле *P. infestans***

Классический цикл развития *P. infestans* в умеренной зоне складывается из 4-х фаз. 1) Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза) с короткими генерациями. Эта фаза обычно начинается в июле и продолжается 1,5-2 мес. 2) Фаза остановки роста численности популяции вследствие резкого уменьшения доли непораженной ткани или наступления неблагоприятных погодных условий. Эта фаза в хозяйствах, проводящих заблаговременное предуборочное удаление ботвы, выпадает из годового цикла. 3) Фаза зимовки в клубнях, сопровождающаяся значительным уменьшением численности популяции вследствие случайного заражения клубней, медленного развития в них инфекции, отсутствия при нормальных режимах хранения перезаражения клубней, сгнивания и выбраковки пораженных клубней. 4) Фаза медленного развития в почве и на всходах (моноклическая фаза), при которой продолжительность генерации может достигать месяца и больше (конец мая – начало июля). Обычно в это время больные листья трудно обнаружить даже при специальных наблюдениях.

#### **Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза)**

Многочисленные наблюдения (Пшедецкая, Козубова, 1969; Борисенок, 1969; Оша, 1969; Дьяков, Супрун, 1984; Рыбакова, Дьяков, 1990) показали, что в начале эпифитотии преобладают маловирулентные и слабоагрессивные клоны, которые в дальнейшем заменяются более вирулентными и агрессивными, причем скорость роста агрессивности популяции тем выше, чем менее устойчив сорт растения-хозяина.

По мере роста численности популяции увеличивается концентрация, как селективно-важных генов, введенных в коммерческие сорта (R1-R4), так и селективно нейтральных (R5-R11). Так, в подмосковных популяциях в 1993 г. средняя вирулентность с конца июля до середины августа выросла с 8,2 до 9,4, причем наибольший рост наблюдался для селективно нейтрального гена вирулентности R5 (с 31 до 86% вирулентных клонов) (Смирнов, 1996).

Уменьшение скорости роста популяции сопровождается снижением паразитической активности популяции. Поэтому в депрессивные годы как общее число рас, так и доля высоковирулентных рас ниже, чем в эпифитотийные (Борисенок, 1969). Если в разгар эпифитотии погодные условия изменяются на неблагоприятные для фитофтороза и уменьшается пораженность картофеля, то концентрация высоковирулентных и агрессивных клонов также уменьшается (Рыбакова и др., 1987).

Увеличение частот генов, влияющих на вирулентность и агрессивность популяции, возможно, происходит вследствие отбора более вирулентных и агрессивных клонов в смешанной популяции. Для демонстрации отбора разработан метод анализа нейтральных мутаций, с успехом использованный в хемостатных популяциях дрожжей (Adams et al., 1985) и *Fusarium graminearum* (Wiebe et al., 1995). Частота мутантов, устойчивых к бластицидину S в полевой популяции *P. infestans* падала параллельно росту агрессивности популяции, что свидетельствует о смене доминирующих клонов в процессе роста численности популяции (Рыбакова и др., 1987).

#### **Фаза зимовки в клубнях**

В процессе зимовки в клубнях картофеля вирулентность и агрессивность штаммов *P. infestans* падают, причем падение вирулентности происходит медленнее, чем агрессивности (Рыбакова, Дьяков, 1990). По-видимому, в условиях, способствующих быстрому росту численности популяции (г-отбору), «лишние» гены вирулентности и высокая агрессивность оказываются полезными, поэтому развитие эпифитотии сопровождается отбором наиболее вирулентных и агрессивных клонов. В условиях насыщения среды, когда большую роль приобретает не скорость размножения, а стойкость существования в неблагоприятных условиях (К-отбор) «лишние» гены вирулентности и агрессивность снижают приспособленность, и клоны, имеющие эти гены, первыми вымирают, так что средняя агрессивность и вирулентность популяции падает.

#### **Фаза вегетации в почве (моноциклическая фаза)**

Эта фаза – самая загадочная в жизненном цикле (см. обзор Andrivon, 1995). Ее существование постулировано чисто умозрительно – вследствие отсутствия сведений о том, что происходит с патогеном в течение длительного срока (иногда – более месяца) – от появления всходов картофеля до возникновения на них первых пятен болезни. На основе наблюдений и экспериментов было реконструировано поведение гриба в этом периоде жизни (Hirst, Stedman, 1960; Богуславская, Филиппов, 1976).

На зараженных клубнях в почве может формироваться спороношение гриба. Образующиеся споры прорастают гифами, которые могут длительно вегетировать в почве. Первичные (образовавшиеся на клубнях) и вторичные (на мицелии в почве) споры капиллярными токами поднимаются на поверхность почвы, но приобретают способность заражать картофель только после того как его нижние листья опустятся и придут в контакт с поверхностью почвы. Такие листья (а именно на них обнаруживают первые пятна болезни) формируются не сразу, а после длительного роста и развития ботвы картофеля.

Таким образом, в жизненном цикле *P. infestans* может существовать и фаза сапротрофной вегетации. Если в паразитической фазе жизненного цикла агрессивность является важнейшим компонентом приспособленности, то в сапротрофной фазе отбор направлен на снижение паразитических свойств, как это показано экспериментально для некоторых фитопатогенных грибов (см. Carson, 1993). Поэтому в данной фазе цикла агрессивные свойства должны теряться наиболее интенсивно. Но пока прямых экспериментов, подтверждающих высказанные предположения, не проведено.

Сезонные изменения затрагивают не только патогенные свойства *P. infestans*, но и резистентность к фунгицидам, которая в полициклической фазе (в период эпифитотий) растет, а в период зимнего хранения – падает (Деревягина и др., 1991; Kadish, Cohen, 1992). Особенно интенсивное падение резистентности к металаксилу наблюдалось в период между высадкой пораженных клубней и появлением первых пятен болезни в поле.

## ВНУТРИВИДОВАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ И ЕЕ ЭВОЛЮЦИЯ

*P. infestans* вызывает эпидемии на двух коммерчески важных культурах – картофеле и томате. Если эпифитотии на картофеле начались вскоре после попадания гриба в новые районы, то, хотя поражение томата было отмечено также вскоре после попадания инфекции, но эпифитотии на томате были отмечены лишь через сто лет – в 40х-60х годах XX столетия. Вот что пишут о поражении томатов в США Галлегли и Нидерхаузер (1962): «В течение примерно 100 лет после сильной эпифитотии 1845 г. мало или почти совсем не делалось попыток для получения устойчивых сортов томатов. Хотя впервые фитофтороз зарегистрирован на томатах еще в 1848 г., он не стал на этом растении объектом серьезного внимания селекционеров вплоть до сильной вспышки болезни в 1946 г.». На территории России фитофтороз томатов был зарегистрирован еще в XIX веке. «На это заболевание долгое время исследователи не обращали внимания, так как оно не причиняло существенного экономического ущерба. Но в 60-70х гг. эпифитотии фитофтороза на томатах наблюдаются и в Советском Союзе, главным образом в Нижнем Поволжье, на Украине, Северном Кавказе, в Молдавии...» (Балашова, 1979). С тех пор поражения томата фитофторозом стали ежегодными, распространились по всей территории промышленного и приусадебного культивирования и вызывают огромный экономический ущерб этой культуре.

Что же произошло? Почему первое появление паразита на картофеле и эпифитотийное поражение этой культуры произошли почти одновременно, а для возникновения эпифитотии на томате понадобилось столетие? Эти различия свидетельствует в пользу мексиканского, а не южноамериканского источника инфекции. Если вид *Phytophthora infestans* сформировался как паразит мексиканских клубненосных видов рода *Solanum*, понятно, почему столь сильно поразился культурный картофель, относящийся к той же секции рода, что и мексиканские виды, но, вследствие отсутствия коэволюции с паразитом, не выработавший механизмов специфической и неспецифической устойчивости. Томат относится к иной секции рода, тип его обмена имеет существенные отличия от клубненосных видов, поэтому несмотря на то, что томат не находится за пределами пищевой специализации *P. infestans*, интенсивность его поражения была недостаточной для серьезных экономических потерь. Возникновение эпифитотий на томате обусловлено серьезными генетическими изменениями паразита, повысившими приспособленность (патогенность) при паразитировании. Мы полагаем, что новая, специализированная для паразитирования на томате форма – это описанная М. Галлегли раса T1, поражающая сорта вишневидного томата (Red Cherry, Ottawa), устойчивого к распространенной на картофеле расе T0 (Gallegly, 1952). По-видимому, мутация (или серия мутаций), превратившая расу T0 в расу T1 и привела к появлению клонов, высоко приспособленных к поражению томата. Как часто случается, повышение патогенности к одному хозяину сопровождалось понижением ее к другому, то есть возникла начальная, пока не полная внутривидовая специализация – к картофелю (раса T0) и к томату (раса T1).

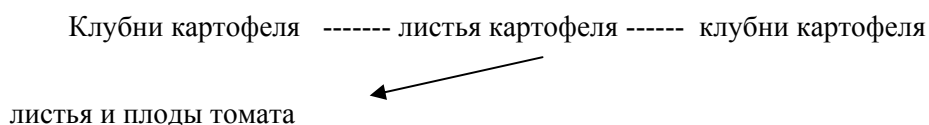
### Каковы свидетельства в пользу этого предположения?

#### 1) Встречаемость на картофеле и томате.

На листьях томата раса T1 преобладает, в то время как на листьях картофеля она встречается редко. По данным С.Ф.Багировой и Т.А. Орешковой (не опубликовано) в Московской области в 1991-1992 гг встречаемость расы T1 в посадках картофеля составила 0%, а в посадках томата – 100%; в 1993-1995 гг – 33% и 90% соответственно; в 2001 г – 0% и 67%. Сходные данные получены и в Израиле (Cohen, 2002). Эксперименты с заражением клубней картофеля изолятами расы T1 и смесью изолятов T0 и T1 показали, что изоляты расы T1 плохо сохраняются в клубнях и вытесняются изолятами расы T0 (Дьяков и др., 1975; Рыбакова, 1988).

#### 2) Динамика расы T1 в посадках томата.

Первичное заражение листьев томата осуществляется изолятами расы T0, которые доминируют при анализе инфекции в первых пятнах, образующихся на листьях. Это подтверждает общепринятую схему миграции паразита:



Основной массив инфекции из картофеля составляет раса T0, однако, незначительное число клонов расы T1, сохранившихся в картофеле, попав на томат вытесняет расу T0 и накапливается к концу эпифитотии. Возможно и наличие альтернативного источника инфекции листьев томата расой T1, не столь мощного, как картофельные клубни и листья, но постоянного. Поэтому на генетическую структуру популяции, заражающей томат, этот источник влияет слабо, но в дальнейшем обуславливает накопление расы T1 (Рыбакова, 1988; Дьяков и др., 1994).

### 3) Агрессивность к картофелю и томату.

Искусственное заражение изолятами рас T0 и T1 листьев томата и картофеля показало, что первые более агрессивны для картофеля, чем для томата, а вторые более агрессивны для томата, чем для картофеля. Эти различия проявляются в вытеснении изолятов не «своей» расы из смешанной популяции при пассажах на листьях в теплице (Дьяков и др., 1975) и в полевых делянках (Leberton et al., 1999); различиях в минимальной инфекционной нагрузке, латентном периоде, размере инфекционных пятен и споровой продукции (Рыбакова, 1988; Дьяков и др., 1994; Legard et al., 1995; Forbes et al., 1997; Oyarzun et al., 1998; Leberton et al., 1999; Vega-Sanchez et al., 2000; Кнапова, Gisi, 2002; Sussuna et al., 2004).

Агрессивность изолятов расы T1 к сортам томата, не имеющим генов устойчивости, настолько высока, что эти изоляты спороносят на листьях как на питательной среде без некротизации зараженной ткани (Дьяков и др., 1975; Vega-Sanchez et al., 2000).

### 4) Вирулентность для картофеля и томата.

Раса T1 поражает сорта вишневидного томата, обладающие геном устойчивости Ph1, а раса T0 не способна поражать эти сорта, т.е. обладает более узкой вирулентностью. По отношению к дифференциаторам R-генов картофеля наблюдается обратная зависимость, т.е. штаммы, выделенные из листьев томата менее вирулентны, чем «картофельные» штаммы (табл. 8).

Таблица 8.

Частоты генов вирулентности к сортам-дифференциаторам картофеля у штаммов *Phytophthora infestans*

Страна	Год	Среднее число генов вирулентности у штаммов		Автор
		из картофеля	из томата	
Франция	1995	4,4	3,3	Leberton et al., 1999
	1996	4,8	3,6	Leberton, Andrivon, 1998
Франция, Швейцария	1996-97	6,8	2,9	Кнапова, Gisi, 2002
США	1989-94	5,0	4,8	Goodwin et al., 1995
США, Зап. Вашингтон		1996	4,6	5,0
	1997	6,3	3,5	“
Эквадор	1993-95	7,1	1,3	Oyarzun et al., 1998
Израиль	1998	7,0	4,8	Cohen, 2002
	1999	6,0	5,7	“
	2000	6,7	6,1	“
Россия, Моск. обл.	1993	8,9	6,7	Смирнов, 1996
Россия, раз- ные области	1995	9,4	8,0	Козловская и др. (не опубликовано)
	1997	9,2	9,2	“
	2000	8,7	4,8	“

#### 5) Нейтральные маркеры.

О разнонаправленном внутривидовом отборе свидетельствует и анализ нейтральных маркеров в популяциях *P. infestans*, паразитирующих на картофеле и томате.

**Изоферменты.** В таблице 9 сведены данные по частотам ферментных локусов в разных популяциях *P. infestans*. Исходя из преобладания клональной системы размножения, в таблице приведены не аллельные частоты, как это принято в популяционной генетике, а частоты гомо- и гетерозиготных генотипов. В таблице однозначно показано, что частоты генотипов и направления их эволюции в популяциях, паразитирующих на картофеле и томате различны.

Та же особенность отмечена и в Московской области, где, в отличие от выше цитированных работ, проводили сравнение аллельных частот изоферментов в посадках картофеля и томата, расположенных в непосредственной близости. Глюкозофосфатизомеразы оказалась мономорфной (все изоляты были гомозиготны – 100/100), а по пептидазе наблюдался полиморфизм (таблица 10).

**Мультилокусные генотипы ДНК.** В бразильских популяциях *P. infestans* изоляты из листьев томата принадлежали к клональной линии US-1, а из листьев картофеля – к линии BR-1 (Suassuna et al., 2004). Во Флориде (США) на картофеле с 1994 г. начал доминировать (встречаемость более 90%) клон US-8, а на томате – клоны US-11 и US-17, причем изоляты последнего более агрессивны для томата, чем для картофеля (Weingartner, Tombolato, 2004).

Достоверные различия частот генотипов (фингерпринтов ДНК) у изолятов из картофеля и томата установлено для 1200 штаммов *P. infestans*, собранных в США с 1989 по 1995 годы (Deahl et al., 1995).

Использование метода AFLP позволило разделить 74 штамма, собранных с листьев картофеля и томата в 1996-1997 гг во Франции и Швейцарии, на 7 групп. Штаммы из картофеля и томата четко не разошлись, но «картофельные» штаммы оказались генетически более разнообразными, чем «томатные». Первые встречались во всех семи кластерах, а вторые – только в четырех, что свидетельствует о более специализированном геноме последних (Кнапова, Gisi, 2002).

#### 6) Механизмы изоляции.

Если популяции паразита на двух видах растений-хозяев эволюционируют в направлении сужения специализации к «своему» хозяину, то возникают различные пре- и постмейотические механизмы, препятствующие межпопуляционным генетическим обменам (Дьяков, Лекомцева, 1984). В нескольких работах было исследовано влияние источника родительских штаммов на эффективность гибридизации.

При скрещивании штаммов, изолированных из разных видов рода *Solanum* в Эквадоре (Oliva et al., 2002), было установлено, что штаммы с типом спаривания А2 из диких пасленовых (клональная линия ЕС-2) хуже всего скрещиваются со штаммами из томата (линия ЕС-3), а наиболее эффективно скрещиваются со штаммом из картофеля (ЕС-1). Штаммы из диких пасленовых занимали промежуточное положение. Все гибриды оказались непатогенными. Авторы полагают, что низкий процент гибридизации и редукция патогенности у гибридов обусловлены постмейотическими механизмами репродуктивной изоляции популяций.

В опытах Багировой с соавторами (1998) проведено скрещивание большого числа штаммов из картофеля и томата, имеющих свойства рас Т0 и Т1. Наиболее высокофертильными оказались кроссы штаммов Т1 x Т1, выделенных из томата (36 ооспор в поле зрения микроскопа, 44% прорастания ооспор), наименее эффективными – скрещивания рас Т0 x Т1, выделенных из разных хозяев (низкое число формирующихся и проросших ооспор, высокая доля abortивных и недоразвитых ооспор). Эффективность кроссов между изолятами расы Т0, выделенными из картофеля оказалась промежуточной. Поскольку основной массив штаммов расы Т0 поражает картофель, она имеет надежный источник зимовки – картофельные клубни, вследствие чего значение ооспор как зимующих инфекционных единиц для популяций из картофеля, невысоко. Адаптированная «томатная форма» способна зимовать на томате в форме ооспор (см. ниже) и поэтому сохраняет более высокую продуктивность полового процесса. За счет высокой фертильности Т1 приобретает самостоятельный потенциал первичной инфекции на томате.

Таким же образом можно интерпретировать результаты, полученные Кнаповой с соавт. (Кнапова et al., 2002). Кроссы штаммов, выделенных из картофеля с штаммами из томата дали наивысшее число ооспор – 13,8 на кв.мм. среды (с разбросом 5-19) и промежуточный процент прорастания ооспор (6,3 с разбросом 0-24). Скрещивания штаммов, изолированных из томата, дали наименьший процент ооспор (7,6 с разбросом 4-12) при наивысшем проценте их прорастания (10,8). Кроссы между штаммами, выделенными из картофеля, дали промежуточное число ооспор (8,6 с высоким разбросом данных – 0-30) и наименьший процент прорастания ооспор (2,7). Таким образом, штаммы из картофеля менее

фертильны, чем из томата, но межпопуляционные скрещивания дали не худшие результаты, чем внутривидовые. Возможно, различия с приведенными выше данными Багировой с соавт. объясняются тем, что российские исследователи работали с штаммами, изолированными в начале 90-х годов XX в., а швейцарские – с штаммами изолированными в конце 90-х гг.

В основе низкой фертильности может лежать гетероплоидность штаммов. Если в Мексиканских популяциях, где половой процесс и первичное заражение ооспоровым потомством регулярны, большинство исследованных штаммов *P. infestans* диплоидны, то в странах Старого Света наблюдается внутривидовый полиморфизм плоидности (ди-, три- и тетраплоидные штаммы, а также гетерокариотические штаммы с гетероплоидными ядрами), причем штаммы, имеющие разные типы спаривания, т.е. взаимно фертильные, различаются плоидностью ядер (Therrien et al., 1989, 1990; Whittaker et al., 1992; Ritch, Daggett, 1995). Разноплоидность ядер в антеридиях и оогониях может быть причиной низкой фертильности.

Что касается ядерных обменов между гифами при анастомозах, то этому препятствует фегетативная несовместимость, разбивающая бесполое популяционное на множество генетически изолированных клонов (Поединок, Дьяков, 1987; Горбунова и др., 1989; Аникина и др., 1997b).

### 7) Конвергенция популяций.

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что гибридизация между «картофельными» и «томатными» штаммами *P. infestans* возможна. Также возможно реципрокное перезаражение разных хозяйств, хотя и с пониженной агрессивностью. Исследование популяционных маркеров у изолятов из расположенных рядом полей картофеля и томата в 1993 г. показало, что примерно четверть изолятов, выделенных из листьев томата, перенесена с соседнего картофельного поля (Долгова и др., 1997). Теоретически можно было предполагать, что дивергенция популяций на двух хозяевах будет усиливаться и приведет к возникновению внутривидовых специализированных форм (*f.sp. potato* и *f.sp. tomato*). Тем более что ооспоры могут сохраняться в растительных остатках (Drenth et al., 1995; Багирова, Дьяков, 1998) и семенах томата (Rubin et al., 2001). Следовательно, томаты имеют в настоящее время независимый от клубней картофеля источник весеннего возобновления.

Однако все произошло иначе. Зимовка ооспорами позволила паразиту избежать самого узкого этапа в его жизненном цикле – моноциклическую стадию вегетации в почве, при которой снижаются паразитические свойства, постепенно восстанавливающиеся летом в полициклической фазе. Первичные зооспорангии и зооспоры, которыми прорастают ооспоры, обладают высокой степенью паразитической активности, особенно если ооспоры сформировались партеногенетически под влиянием феромонов штамма, обладающего противоположным типом спаривания. Поэтому инфекционный материал на всходах томата, выросший из зараженных ооспорами семян, высоко патогенен как для томата, так и для картофеля. Эти изменения привели к очередной популяционной перестройке, выразившейся в следующих важных с эпидемиологической точки зрения переменах:

1) Зараженные всходы томата стали важным источником первичного заражения картофеля (Филиппов, Иванюк, личные сообщения).

2) В связи с этим эпифитотии на картофеле стали наблюдаться уже в июне, примерно на месяц ранее, чем обычно.

3) В посадках картофеля увеличился процент расы T1, которая раньше встречалась там в незначительном количестве (Уланова и др., 2003).

4) Штаммы, изолированные из листьев томата, перестали отличаться от штаммов из картофеля по вирулентности на картофельных дифференциаторах генов вирулентности и стали превосходить «картофельные» штаммы по агрессивности не только на томате, но и на картофеле (Лаврова и др., 2003; Уланова и др., 2003).

Таким образом, вместо дивергенции произошла конвергенция популяций – возникновение единой популяции на двух растениях-хозяевах с высокой вирулентностью и агрессивностью к обоим видам.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, несмотря на более чем 150-летнее интенсивное изучение *Phytophthora infestans*, в биологии, в том числе, популяционной биологии этого возбудителя важнейших болезней культивируемых пасленовых растений, остается много неизвестного. Непонятно, как влияет на структуру популяций прохождение отдельных этапов жизненного цикла, каковы генетические механизмы канализованной изменчивости агрессивности и вирулентности, каково соотношение половой и клональной систем размножения в природных популяциях, как наследуется вегетативная несовместимость, какова роль картофеля и томата в первичном заражении этих культур и в чем заключается их влияние на структуру популяций паразита. До сих пор не решены такие важнейшие для практической деятельности вопросы, как генетические механизмы изменения агрессивности паразита или эрозия неспецифической устойчивости картофеля. По мере углубления и расширения исследований фитофтороза картофеля паразит ставит перед исследователями все новые задачи. Однако совершенствование экспериментальных возможностей, возникновение новых методологических подходов манипуляции с генами и белками, позволяют надеяться на успешное продвижение вперед.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдей О.В. Расовый состав и типы совместимости *Phytophthora infestans*. В сб. «Защита растений в условиях реформирования АПК: экономичность, эффективность, экологичность». С.-Пб.: 1995. 149с.
2. Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Самофертильные изоляты *Phytophthora infestans* // Изв. РАН, сер. биол. 1997а. №4. С. 414—418.
3. Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Взаимодействия между штаммами *Phytophthora infestans* (Mont.) deBy. // Микол. и фитопатол. 1997b. Т.31. С. 33—38.
4. Апрышко В.П., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* в природных очагах фитофтороза в Московской области в 2003 г.// Материалы Юбилейной конференции «Микология и альгология – 2004». М.: Прометей, 2004. С. 21—22.
5. Ахматханова Ф.Х., Дьяков Ю.Т., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н., Козловская И.Н., Козловский Б.Е., Морозова Е.В., Смирнов А.Н. Популяции *Phytophthora infestans* на Северном Кавказе // Микол. и фитопатол. 2004. Т.38. В.3. С. 71—78.
6. Багирова С.Ф., Дьяков Ю.Т. Роль ооспор в возобновлении первичной инфекции фитофтороза томата // С-Х биология. 1998. №3. С.67—71.
7. Багирова С.Ф., Ан Цзянь Ли, Дьяков Ю.Т. Механизмы генетической изоляции специфических патогенных форм *Phytophthora infestans* в половых и бесполом популяциях // Микол. и фитопатол. 1998. Т.32, №4. С. 47—50.
8. Балашова Н.Н. Фитофтороустойчивость рода *Lycopersicon* Tougn. и методы использования ее в селекции томата // Кишинев. “Штиница”. 1979.
9. Богуславская Н.В., Филиппов А.В. Распространение возбудителя фитофтороза в почве // Микол. и фитопатол. 1976. Т. 10. С. 316—317.
10. Борисенко А.Б. Расовый состав *Phytophthora infestans* в годы, различающиеся метеорологическими условиями // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4. В.8. С 83—88.
11. Воробьева Ю.В., Гриднев В.В. Генетика фитофторозных грибов. Сообщ.2. // Генетика. 1983. Т.19. С. 1786—1789.
12. Воробьева Ю.В., Кваснюк Н.Я., Гриднев В.В., Шемякина Е.П., Морозова Е.В., Кузнецова Л.Н. Защита картофеля от фитофтороза в системе семеноводства // Защита растений. 1991. N5. С.17—20.
13. Галлегли М.Е., Нидерхаузер Дж.С. Генетическое регулирование взаимодействий хозяина и паразита при фитофторозе картофеля. В сб. “Проблемы и достижения фитопатологии”. М.: Сельхозиздат. 1962. С. 193-211.
14. Горбунова Е.В., Багирова С.Ф., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Вегетативная несовместимость у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // ДАН СССР. 1989. Т.104. С. 1245—1248.
15. Деревягина М.К., Воловик А.С., Дьяков Ю.Т. Изменение чувствительности к ридомилу в жизненном цикле возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* и целесообразность весенних опрыскиваний // Микол. и фитопатол. 1991. Т. 25. С. 426—436.
16. Деревягина М.К., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Мутанты *Phytophthora infestans*, резистентные к фениламидным фунгицидам // Микол. и фитопатол. 1993. Т.27. N3. С.57—61.
17. Деревягина М.К., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Резистентность *Phytophthora infestans* к фунгициду диметоморфу // Микол. и фитопатол. 1999. Т. 33, N3. С. 208—213.
18. Деревягина М.К., Дьяков Ю.Т. Влияние системных и контактных фунгицидов на поражение листьев картофеля фитофторозом // Микол. и фитопатол. 1990. Т. 24. С. 252—256.
19. Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Генетика устойчивости возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* к фунгициду металаксилу // Генетика. 1986. Т.22, №10. С. 2423—2429.
20. Долгова А.В., Смирнов А.Н., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в России и некоторых странах бывшего СССР // Микол. и фитопатол. 1996. Т.30. В.3. С. 55—60.
21. Долгова А.В., Смирнов А.Н., Малеева Ю.В., Багирова С.Ф., Козловская И.Н., Колесников А.А., Шоу Д.С., Дьяков Ю.Т. Сравнение популяций *Phytophthora infestans* на картофеле и томатах в Московской области // В сб. «Проблемы оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства». СПб.: 1997. С. 348—357.
22. Дорожкин Н.А., Бельская С.И. Болезни картофеля // Минск: Наука и техника. 1979. 248 с.
23. Дьяков Ю.Т., Ащайе А., Вайнштейн В.М. О статусе “томатных” рас *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1975, 9, №4. С. 277—282.

24. Дьяков Ю.Т., Долгова А.В., Рыбакова И.Н., Багирова С.Ф. Дивергенция популяций фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в связи со специализацией к растению-хозяину // Журнал общей биол. 1994. 55. С. 179—188.
25. Дьяков Ю.Т., Кузовникова Т.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. II. Генетические исследования // Микол. и фитопатол. 1974. Т.8, В.2. С. 81—89.
26. Дьяков Ю.Т., Лекомцева С.Н. О симпатрическом видообразовании у грибов // Биол. науки. 1984, №11, С. 5—16.
27. Дьяков Ю.Т., Супрун Л.М. Вероятностный метод расчета частот генов вирулентности и его применение для анализа популяций возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* // Сельскохозяйственная биология. 1984, N3. С.111—118.
28. Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. I. Системы размножения // Микол. и фитопатол. 1999. Т.33, В.5. С. 346—352.
29. Иванюк В.Г., Журомский Г.К., Авдей О.В. Микроэволюция *Phytophthora infestans* в условиях Белоруссии // Микол. и фитопатол. 2002. Т.36, В.6. С. 81—90.
30. Квитко К.В. Относительная роль мутаций и отбора в микробных популяциях // Успехи совр. генетики. 1974. Т.5. С.101-113.
31. Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т., Ерохина С.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. 3. Фитопатологические исследования // Микол. и фитопатол. 1978, 12, №5, С. 406—409.
32. Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т. Выделение диплоидных штаммов из смешанных культур двух физиологических рас *Phytophthora infestans* // ДАН. 1979. Т. 244, №3. С. 435-438.
33. Лаврова О.И., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Селекция штаммов *Phytophthora infestans* в бесполой генерации // Ж. Росс. Фитопатол. общества. 2003. Т.4. С. 1—7.
34. Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: «Мир». 1978.
35. Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: «Мир». 1974. 457 с.
36. Оша М.Я. Расы *Phytophthora infestans* и устойчивость сортов и гибридов картофеля в Латвийской ССР // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4, В.8. С. 110—114.
37. Поединок Н.Л., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Парасексуальный процесс фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Генетика. 1982. Т.18. С. 1423—1428.
38. Поединок Н.Л., Дьяков Ю.Т. Обнаружение вегетативной несовместимости у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1981. Т.15, №4, С. 275—279.
39. Пушкарев И.И. Новый фитофтороустойчивый сорт картофеля 8670.. М.: Сельхозгиз. 1937.
40. Пшедецкая Л.И., Козубова И.А. Изучение сезонной динамики расового состава гриба *Phytophthora infestans* на различных сортах картофеля // Труды Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1964. Т.4. В.8. С. 38—41.
41. Рыбакова И.Н. Изменение агрессивности и вирулентности в популяциях *Phytophthora infestans* (Mont.)de Vu – возбудителя фитофтороза картофеля и томатов // Автореферат канд. дисс. М. 1988. 23 с.
42. Рыбакова И.Н., Дьяков Ю.Т. Циклические изменения генотипического состава популяций фитопатогенных грибов на примере возбудителя фитофтороза картофеля // Журнал общей биол. 1990. Т. 51. С. 651—660.
43. Рыбакова И.Н., Супрун Л.М., Дьяков Ю.Т. Динамика генотипов в популяциях фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* (Mont.)de Vary // Докл. АН СССР. 1987. Т.294. 696-698.
44. Смирнов А.Н. Популяционная структура фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в Московской области в 1991-1996 гг. // Автореферат канд. дисс. М. 1996. 24 с.
45. Смирнов А.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 2003. Т.37. N1. С. 3—21.
46. Уланова Т.И., Еланский С.Н., Филиппов А.В., Дьяков Ю.Т., Апрышко В.П., Козловский Б.Е., Смирнов А.Н., Коффей М.Д. Устойчивость к фитофторозу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum* // Ж. Российского фитопатологического общества. 2003. Т.4. С. 9—15.
47. Филиппов А.В., Гуревич Б.И., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Спиглазова С.Ю., Кравцов А.С., Сметанина Т.И., Смирнов А.Н. Горизонтальная устойчивость листьев картофеля к *Phytophthora infestans* и агрессивность изолятов патогена из разных географических районов // Микол. и фитопатол. 2004. Т.38, N5. С. 74-87.
48. Abad Z.G., Abad J.A. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America // In “*Phytophthora infestans* 150”. L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 36—41.
49. Abad Z.G., Abad J.A., Ochoa C. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the peruvian Andes as the center of origin of *Phytophthora infestans* // In “*Phytophthora infestans* — 150”. L.J. Dowly et al., eds. 1995, P. 239—245.

50. Abu-El Samen F.M., Secor G.A., Gudmestad N.C. Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers // *Plant Pathology*. 2003. V.52, P. 314—325.
51. Adams J., Paquin Ch., Oeller P.W., Lee L.W. Physiological characterization of adaptive clones in evolving populations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Genetics*. 1985. V.110. P. 173—185.
52. Adler N., Chacon G., Forbes G., Flier W. *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host specificity // In “Late blight: Managing the Global Threat” Lima, Peru. 2002a. P. 13—17.
53. Adler N.E., Chacon G., Flier W.G., Forbes G.A. The Andia fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Ecuador // *Plant Pathol.* 2002b. V.51. P. 802.
54. Andrivon D. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil // *Phytopathology*. 1995. V.85. P.1053—1056.
55. Bagirova S.F., An Zsan Li, Dolgova A.V., Elanski S.N., Shaw D.C., Dyakov Y.,T. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to dimethomorph fungicide // *J. Rus. Phytopathol. Soc.* 2001. V.2, P. 19—24.
56. Brasier C.M., Cooke D.E.L., Dubcan J.M. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V.96. P. 5878—5883.
57. Carlisle D.J., Cooke L.R., Brown A.E. Phenotypic and genotypic characterization of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* // *Europ. J. of Plant Pathology*. 2001. V. 107, N 3. P. 291—303.
58. Carson M.L. Relationship between parasitic and saprophytic fitness in *Cochliobolus heterostrophus*, cause leaf blight of maize // In “Durability of Disease Resistance”. Kluwer Acad. Publ. The Netherlands. 1993. 285 p.
59. Carter D.A., Buck K.W., Archer S.A., Van der Lee T., Shattock R.C., Shaw D.S. The detection of nonhybrid, trisomic, and triploid offspring in sexual progeny of mating of *Phytophthora infestans* // *Fungal Genet. and Biol.* 1999. V.26. P. 198—208.
60. Carter D.A., Archer S.A., Buck K.W., Shaw D.S., Shattock R.C. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans* // *Mycol. Res.* 1990. V.94. P. 1123 — 1128.
61. Chamnanpant J., Shan Wei-xing, Tyler B.M. High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V.98. P. 14530—14535.
62. Cherepennikova-Anikina M.I., Savenkova L.V., Dolgova A.V., Shaw D.S., Dyakov Yu.T. Vegetative incompatibility of *Phytophthora infestans* // *J. Russ. Phytopathol. Soc.* 2002. V.3. P. 19—32.
63. Cohen Y. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes during 1983 to 2000 // *Phytopathology*. 2002. V.92. P. 300—307.
64. Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves // *Phytopathology*. 1997. V.87. P. 191—196.
65. Cooke D.E.L., Young V., Birch P.R.J., Toth R., Gourlay F., Day J.P., Carnegie S., Duncan J.M. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995 – 1997) // *Plant Pathology*, 2003, 52, P. 181—192.
66. Cooke D.E.L., Lees A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity // *Plant pathology*. 2004. N 53. P. 692—704.
67. Davidse L.C., Looijen D., Turnensteen L.I., Vanderwal D. Occurrence of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields // *Neth. J. Plant Pathol.* 1981. V.87, N2. P. 65—68.
68. Deahl K.L., De Muth S.P., Fry W.E. Genetic and phenotypic diversity in population of *Phytophthora infestans* in the United States of America // In “*Phytophthora infestans* – 150. Eds. L.J. Dowley et al. Dublin. 1995. 362p.
69. Dorrance A.E., Inglis D.A., Derie M.L., Brown C.R., Goodwin S.B., Fry W.E. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Western Washington // *Phytopathology*. 1999. V.89. P. 423—428.
70. Drenth A., Goodwin S. B., Fry W. E., Davidse L. C. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism // *Phytopathology*. 1993. V. 83. P. 1087 — 1092.
71. Drenth A., Janssen E.M., Govers F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions // *Plant Pathol.* 1995. V.44. P. 86—94.
72. Drenth A., Tas I.C.Q., Govers, F. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands// *Eur.J. Plant Pathol.* 1994. V.100. P. 97—107.
73. Dyakov Yu.T., Derevjahina M.K. Late blight of potato and its control in Russia. *Pesticide Outlook*. 2000.V.11. P. 230—232.
74. Elansky S. N., Smirnov A. N. Second locus of Peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* // *Botanica Lithuanica*. V. 9(3). P. 275—283.

75. Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozovsky B, Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow Region, Siberia and Far East // J. Phytopathology. 2001. V.149. P. 605—611.
76. Erselius L.J., Hohl H.R., Ordonez M.E., Oyarzun P.J., Jarrin F., Velasco A., Ramon M.P., Forbes G.A. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various hosts in Equador // CIP program report 1997-98. 1998. P. 39—48.
77. Fife A.M., Shaw D.S. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1992. V.96. P. 390-394.
78. Flier W.G., Kessel G.J.T., Shepers H.T.A.M. The impact of oospores of *Phytophthora infestans* on late blight epidemics // Plant breeding and seed science. 2004. V. 50. P. 5—13.
79. Flier W.G., Grunwald N.J., Kroon L.P.N.M., Sturbaum A.K., van der Bosch T.B.M., Geray-Serrano E., Lozoya-Saldana H., Fry W.E., Turkensteen L.J. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of Central Mexico suggests genetic differentiations between populations from cultivated potato and wild *Solanum* spp // Phytopathology. 2003. V.93. P. 382—390.
80. Forbes G.A., Escobar X.C., Ayala C.C., Revelo J., Ordonez M.E., Fry B.A., Doucett K., Fry W.E. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in Ecuador // Phytopathology. 1997. V.87. P.375—380.
81. Forbes G.A., Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E. Host specificity of late blight pathogen on potato and tomato in Ecuador. Program Report 1995-1996 // Internat. Potato Center. 1997. P. 138—143.
82. Fry W.E., Goodwin S.P., Matuszak J.M., Spielman L.J., Milgroom M.G. Population genetics and intercontinental migrations of *Phytophthora infestans* // Ann. Rev. Phytopathol. 1992, 30, P. 107—129.
83. Fry W.E., Goodwin S.B. Recent migrations of *Phytophthora infestans* // In “*Phytophthora infestans* 150”. L. T. Dowly et al. editors. Dublin, Ireland. 1995. P. 89—95.
84. Gallegly M.E. Physiological races of tomato late blight fungus // Phytopathology. 1952. V. 42. P. 461—462.
85. Ghimire S.R., Hyde K.D., Hodgkiss I.J., Shaw D.S., Liew E.C.Y. Variations in the *Phytophthora infestans* population in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms // Phytopathology. 2003. V.93, N.2. P. 236—243.
86. Goodwin S.B. The population genetics of *Phytophthora* // Phytopathology. 1997. V. 87, N 4. P. 462—473.
87. Goodwin S.B., Drenth A., Fry W.E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* // Current Genetics. 1992. V. 22(2). P. 107—115.
88. Goodwin S.B., Drenth A. Origin of A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1997. V. 87. N. 10. P.992—999.
89. Goodwin S.B., Cohen B.A., Fry W.E. Panglobal distributin of single clonal lineage of the Irish potato famine fungus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V.91, P. 11591—11595.
90. Goodwin S.B., Fry W.E., Genetic analysis of of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis* // Exp. Mycol. 1994. V.18. P. 20—32.
91. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineage of the potato late blight disease fungus // Phytopathology. 1995a. V.85. P. 669—676.
92. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and western Canada // Phytopathology. 1996. V.86, P. 793—800.
93. Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Dyer A.T., Fry B.A., Fry W.E. Direct detection of gene flow and probably sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America // Phytopathology. 1995b. V.85. P. 473—479.
94. Gotz E. Untersuchungen zum Auftreten des A2-Paarungstyps bei *Phytophthora infestans* in Ostdeutschland // Potato Res. 1991. V.34. P. 233—237.
95. Griffith G.W., Shaw D.S. Polymorfism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure culture or from host lesion // Applied and Env. Microbiol. 1998. Vol.64, № 10. P. 4007—4014.
96. Hanson K., Shattock R.C. Gormation of oospores of *Phytophthora infestans* in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance // Plant Pathol. 1998. V.47. P. 123—129.
97. Hastie A.C. Benlate-induced instability of *Aspergillus* diploids // Nature. 1970. V. 226. P. 771.
98. Hirst J.M., Stedman O.J. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum // Ann. App. Biol. 1960. V.48. P. 489—517.

99. Judelson H.S., Ge Yang. Recombination pathways in *Phytophthora infestans*: polyploidy resulting from aberrant sexual development and zoospore-mediated heterokaryosis // Mycol. Res. 1998. V.102. P. 1245—1253.
100. Judelson H.S., Roberts, S. Multiple loci determining insensitivity to phenilamide fungicides in *Phytophthora infestans* // Phytopathology. 1999. V. 89, N 9. P. 754—760.
101. Jyan M.H., Ann P.J., Tsai J.N., Hsin S.D., Chang T.T., Liou R.F. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan // Canad. J. Plant Pathol. P. 188—192.
102. Kadish D., Cohen Y. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers // Phytopathology. 1992. V.82. P. 887—889.
103. Kato M., Mizubuti E.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Sensitivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineage of *Phytophthora infestans* in the United States // Phytopathology. 1997. 87. P. 973—978.
104. Kato M., Sato N., Takahashi K., Shimaniki T. Yearly change of frequency and geographic distribution of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in Japan from 1987 to 1993 // Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 1999. V.64. P. 168—174.
105. Knapova G., Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* population on potato and tomato in France and Switzerland // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 641—653.
106. Knapova, G, Tenzer, I., Gessler, G., Gisi, U. Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with molecular markers // Proceedings of the 5<sup>th</sup> congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina, Italy. 2001. P. 6—9.
107. Knapova G., Schlenzig A., Gisi U. Crosses between isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato and characterization of F1 and F2 progeny for phenotypic and molecular markers // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 698—709.
108. Ko W.H. An alternative possible origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1994. V. 84. P. 1224—1227.
109. Koh Y.J., Goodwin S.B., Dyer A.T., Cohen B.A., Ogoshi A., Sato N., Fry W.E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries // Phytopathology. 1994. V.84. P. 922—927.
110. Leberton L., Andrivon D. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype // Phytopathology. 1998. V. 88. P. 583—594.
111. Leberton L., Lucas J-M., Andrivon D. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates collected from potato and tomato in France — Phytopathology. 1999. V.89. P. 679—686.
112. Legard D.E., Lee T.Y., Fry W.E. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: aggressiveness on tomato // Phytopathology. 1995. V.85. P. 1356—1361.
113. McKee R.K. Effects of ultraviolet irradiation on zoospores of *Phytophthora infestans* // Transact. British Mycol. Soc. 1969. V.52. P.281—291.
114. Miller J.S., Hamm P.B., Johnson D.A. Characterization of the *Phytophthora infestans* populations in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995 // Phytopathology. 1997. V.87. P. 656—660.
115. Miller J.S., Johnson D.A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions // Phytopathology. 2000. V.90. P. 220—227.
116. Mosa A.A., Kobayashi K., Ogoshi A., Kato M., Sato N. Isoenzyme polymorphism and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // Plant pathol. 1993. V. 42. P. 26—34.
117. Muller K.O. Über den augenblicklichen Stand unserer Kenntnis zur biologischen Spezialisierung des Krautfäuleerreggers der Kartoffel (*Phytophthora infestans*) // Der Züchter. 1935. N7.
118. Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // TREE. V.14, N. 10. P. 389—394.
119. Niederhauser J.S. International cooperation in potato research and development // Ann. Rev. Phytopathol. 1993. V.31. P. 1—21.
120. Ochwo M.K.N., Kamoun S., Adipala E., Rubaihayo P.R., Lamour K., Olanya M. Genetic diversity of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in the Eastern and Western highlands of Uganda // J. Phytopathol. 2002. V.150. P. 541—542.
121. Oliva R.F., Erselius L.J., Adler N.E., Forbes G.A. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans sensu lato* in Ecuador // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 710—719.
122. Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E., Doucett K., Forbes G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador // Phytopathology. 1998. V.88. P. 265—271.

123. Perez T., Alborno J., Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature // *Mol.Ecol.* 1998. V.7. P. 1347 — 1358.
124. Reis A., Smart C.D., Fry W.E., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000 // *Plant Disease*, V.87, N.8. P. 896—900.
125. Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // *Nature*. 2001, V. 411. P. 695—697.
126. Ritch D.L., Daggett S.S. Nuclear DNA content and chromosome number in German isolates of *Phytophthora infestans* // *Mycologia*. 1995. V.87. P. 579—581.
127. Rubin E., Baider A., Cohen Y. *Phytophthora infestans* produced oospores in fruits and seeds of tomato // *Phytopathology*. 2001. V.91. P. 1074—1080.
128. Sansome E., Brasier C.M., Hamm P.B. *Phytophthora meadii* may be a species hybrid // *Mycol. Res.* 1991. V.95. P. 273—277.
129. Savelkoul P.H., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. Amplified Fragment Length Polymorphism analysis: the State of the Art // *Journal of Clinical Microbiology*. Oct. 1999. P. 3083—3091.
130. Savenkova L.V., Cherepnikova-Anikina M.I. Effect of metalaxyl and N-nitro-N-nitrosomethylurea on mating type of *Phytophthora infestans* // *J. Russ. Phytopathol. Soc.* 2002. V.3. P. 33—38.
131. Schober-Butin B., Knapova G., Knipfelberg L., Nieopold F. *Phytophthora infestans* in Germany: population dynamics and modern methods in diagnosis // In: “*Phytophthora infestans* – 150”. Dublin 1995. P. 96—101.
132. Schwinn F.J., Staub T. Biological properties of metalaxyl. In “System Fungizides and Antifungale Verbindungen” // 6 Internat. Symp. Abh. Akad. Wiss. DDR. 1980. P. 123—133.
133. Shattock R.C., Shaw D.S. Novel phenotypes of *Phytophthora infestans* from mixed cultures of antibiotic resistant mutants // *Transact. British Mycol. Soc.* 1976. V.67. P. 201—206.
134. Stem J.M., Kirk W.W. The generation and quantification of resistance to dimethomorph in *Phytophthora infestans* // *Plant Disease*. 2004. V.88. P. 930—934.
135. Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Changes in specific virulence in polish population of *Phytophthora infestans*: 1985–1991 // *Eur. J. Plant Pathol.* 1991. V.102. P. 555—561.
136. Sujkowski L. S., Goodwin S. B., Dyer A. T., Fry W. E. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland // *Phytopathology*. 1994. V.84. P. 201—207.
137. Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Dyer A.T., Fry W.E. Increased genotypic diversity via migration and possible occurrence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland // *Phytopathology*. 1994. V.84. P. 201—207.
138. Suassuna N.D., Maffia I.A., Mizubuti F. S.G. Aggressiveness and host specificity of Brazilian isolates of *Phytophthora infestans* // *Plant Pathol.* 2004. V.53. P. 405—413.
139. Therrien C.D., Daggett S.S., Ritch D.L., Sato N., Spielman L.J., Tolley P.N. Mating type, nuclear DNA content, and isozyme composition of thirty-three isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // *Phytopathology*. 1990. V.80. P. 124 (abstr.).
140. Therrien C.D., Ritch D.L., Davidse L.C., Jespers B.K., Spielman L.J. Nuclear DNA content, mating type, and metalaxyl sensitivity of eighty-three isolates of *Phytophthora infestans* from the Netherlands // *Mycol. Res.* 1989. V.92. P. 140—146.
141. VanBruggen A.H.C. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming system // *Plant Disease*. 1995. V.79, N.10. P. 976—984.
142. Vega-Sanchez M.E., Erselius L.J., Rodriguez A.M., Bastidas O., Hohl H.R., Ojiambo P.S., Mukalazi J., Vermeulen T., Fry W.E., Forbes G.A. Host adaptation to potato and tomato within the US-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya // *Plant Pathol.* 2000. V.49. P. 531—539.
143. Veld W.A.M in't, Veenbaas-Rijks W.J., Ilieva E., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., Pieters R. Natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA // *Phytopathology*. 1998. V.88. P. 922—929.
144. Weingartner D.P., Tombolato D. Temporal, geographic and host distribution of *Phytophthora infestans* genotypes in Florida // *Amer. Potato J.* 2004. V.81. P. 94—95.
145. Whittaker S.L., Shattock R.S., Shaw D.S. The duplication cycle and DAPI-DNA contents in nuclei in germinating zoospores cysts of *Phytophthora infestans* // *Mycol. Res.* 1992. V.96. P. 355—358.
146. Wiebe M.G., Robson G.D., Oliver S.G., Trinici A.P.J. Evolution of *Fusarium graminearum* a315 grown in a series of glucose-limited chemostat cultures at a high dilution rate // *Mycol. Res.* 1995. V.99. P. 173—178.