

Московский Государственный Университет имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет

На правах рукописи

ЕЛАНСКИЙ
Сергей Николаевич

**ВИДОВОЙ СОСТАВ И СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ФИТОФТОРОЗА И АЛЬТЕРНАРИОЗА
КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА**

Специальность 03.02.12 – «Микология»

Автореферат диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва
2012

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

Научный консультант: доктор биологических наук
Дьяков Юрий Таричанович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
академик Россельхозакадемии
Левитин Марк Михайлович

доктор биологических наук
Джалилов Февзи Сеид-Умерович

доктор биологических наук
Ткаченко Олег Борисович

Ведущая организация: ГНУ Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства Россельхозакадемии

Защита диссертации состоится 09 ноября 2012 года в 15 часов 30 минут на заседании Диссертационного совета Д. 501.001.46 Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 12. Факс (495) 939-39-70.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «04» октября 2012 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



М.А.Гусаковская

Актуальность темы. Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и несовершенные грибы из рода *Alternaria* – возбудители фитофтороза и альтернариоза, опасных заболеваний картофеля и томата. Потери урожая картофеля от этих заболеваний за счет преждевременного отмирания ботвы, поражения плодов и клубней во время вегетации и при хранении в среднем составляют около 10%, но в эпифитотийные годы могут возрастать до 30% и более. Потери томата в случае эпифитотийного развития и массового поражения созревающих плодов могут достигать 100%. Борьба с фитофторозом и альтернариозом осложняется очень высокой изменчивостью возбудителей этих болезней, позволяющей им быстро приспосабливаться к новым устойчивым сортам растений и к новым фунгицидам. Полностью устойчивых к этим заболеваниям сортов картофеля и томата не существует.

Основой защиты всех возделываемых сортов картофеля и томата является использование химических фунгицидов. Однако мероприятия химической защиты могут быть эффективны только в том случае, если в популяциях возбудителей нет (или очень небольшая доля) высокоустойчивых к используемым фунгицидам штаммов. Для оптимального выбора фунгицидных препаратов и расчета сроков и кратности их применения необходимо знать не только долю резистентных штаммов, но и устойчивость выращиваемых сортов к распространенным на данной территории штаммам возбудителей. Сведения о клональной структуре популяций позволяют изучить вероятность полового процесса и гибридизации и, в практическом плане, полезны для оценки риска инвазии особо опасных штаммов и клональных линий патогенов (например, их завоз из-за рубежа или из других регионов с партиями семенного картофеля). В результате полового процесса у *P. infestans* образуются половые споры (ооспоры), способные длительное время сохраняться в почве и инициировать начало эпифитотий. Поэтому для того, чтобы защитные мероприятия были эффективны, необходим постоянный мониторинг структуры популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза.

В последнее время вопросы защиты картофеля от болезней стали особенно актуальными в связи с тем, что эта культура рассматривается как одна из самых перспективных технических культур. Кроме переработки на картофелепродукты (чипсы, замороженный картофель, крахмал, картофельная мука) картофель может быть использован для получения этилового спирта, глюкозы, сахарных сиропов, красителей, антиоксидантов и других веществ. Развитие грибных заболеваний вызывает изменение химического состава клубней, что делает их непригодными для переработки.

Целью работы было изучение видового состава и структуры популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата в России.

В качестве **основных задач** были определены следующие:

— изучение генотипического состава популяций *P. infestans* на основе независимых маркерных признаков: тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, гаплотипы митохондриальной ДНК, структура отдельных участков генома;

— оценка хозяйственно-важных биологических показателей штаммов *P. infestans*: устойчивость к фунгицидам и вирулентность к сортам картофеля и томата;

— исследование закономерностей образования ооспор *P. infestans* в агроценозах на разных растениях-хозяевах;

— определение видового состава возбудителей альтернариоза картофеля и томата, разработка метода экспресс-идентификации наиболее распространенных видов, изучение устойчивости изолятов *Alternaria* sp. к фунгицидам.

Научная новизна. В настоящей работе обобщены результаты проведенных автором исследований штаммов *P. infestans*, выделенных на территории России и Беларуси в период с 1991 по 2011 годы. Впервые проведен анализ структуры российских популяций *P. infestans* с помощью признанного в мировой практике набора независимых маркерных признаков. Выявлены различия в клональной структуре популяций Европейской и Азиатско-Дальневосточной частей России. Исследовано распределение типов спаривания, определены некоторые закономерности образования ооспор в пораженных органах картофеля и томата. Для изучения структуры популяций впервые использованы такие новые маркерные признаки, как локус пептидазы *Per-2* и полиморфизм участков генома, расположенных между ретропозонами *SINE*. Исследовано поражение диких видов томата фитофторозом в Московской области, изучены изменения агрессивности при реципрокных заражениях картофеля и томата.

Исследован видовой состав возбудителей альтернариоза картофеля и томата из разных регионов России по морфологическим и молекулярно-генетическим (последовательность нуклеотидов участков ядерных и митохондриальных рибосомных генов) характеристикам. На основе полученных последовательностей нуклеотидов созданы праймеры для ПЦР и отработаны методы идентификации видового состава возбудителей альтернариоза в пораженном листе без выделения изолята в чистую культуру.

Исследована устойчивость возбудителей фитофтороза и альтернариоза из разных регионов к некоторым широко используемым фунгицидам.

Теоретическое значение работы. В работе изучены разные в таксономическом и эколого-трофическом планах группы организмов:

биотрофный паразит оомицет и некротрофные паразиты – аскомицетные грибы, паразитирующие на одних и тех же растениях – картофеле и томате.

Исследования *P. infestans* показали, что процессы внутривидовой эволюции при паразитировании на разных растениях, первоначально показывавшие тенденции дивергенции популяций, впоследствии привели к возникновению единой популяции с высокой агрессивностью к обоим видам. Возможной причиной появления подобной популяции является половой процесс, о протекании которого в ряде популяций Европейской части России свидетельствуют выявленные в работе высокое генотипическое разнообразие, присутствие штаммов обоих типов спаривания и ооспор в пораженных фитофторозом образцах.

Исследования возбудителей альтернариоза выявили практически повсеместное в европейской части России преобладание мелкоспоровых *Alternaria* как на картофеле, так и на томате. Возможно, это связано с частым применением содержащих манкоцеб фунгицидов, более эффективных по отношению к крупноспоровым видам.

Практическое значение работы. В результате исследований собрана коллекция чистых культур возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата из разных регионов России, которая может быть использована при оценке сортов и селекционного материала на устойчивость к фитофторозу и альтернариозу. Изучена устойчивость возбудителей из разных регионов к некоторым зарегистрированным в России фунгицидам, что используется при планировании мероприятий по защите картофеля. Разработан метод ПЦР-идентификации видового состава возбудителей альтернариоза в пораженных образцах, не требующий выделения изолятов в чистую культуру. Метод имеет практическую ценность, т.к. виды *Alternaria* отличаются по устойчивости к некоторым применяемым фунгицидам и по агрессивности к сортам растений-хозяев. Материалы диссертации используются в лекциях по фитопатологии и спецкурсах кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. На территории России присутствуют популяции *P. infestans* разной клональной структуры. В Европейской части и на картофеле, и на томате встречаются как моно- и поликлональные, так и панмиксные популяции. В Сибири и на Дальнем Востоке преобладают моноклональные, иногда встречаются поликлональные популяции.
2. Отмечаемое практически повсеместно в популяциях Европейской части России высокое генотипическое разнообразие *P. infestans* может объясняться гибридизацией при половом процессе. В пользу прохождения

полового процесса свидетельствует одновременное присутствие в популяциях штаммов с разными типами спаривания и ооспор в пораженных фитопфторозом растительных образцах.

3. Исследованные изоляты *P. infestans* с картофеля и томата из разных регионов России и Беларуси были чувствительны к большинству используемых против них фунгицидов. В некоторых областях были обнаружены штаммы с высокой устойчивостью к металаксилу.
4. В пораженных листьях картофеля и томата с помощью молекулярно-генетического анализа выявлены виды *A. solani*, *A. infectoria* и комплекс мелкоспоровых видов. Мелкоспоровые виды, выделяемые по результатам морфологического анализа (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*), по структуре исследованных участков генома не разделяются.
5. Лабораторная оценка устойчивости к фунгицидам изолятов *Alternaria* sp., выделенных с картофеля и томата, показала, что наибольшим фунгицидным эффектом отличались дифеноконазол и флудиоксонил, хороший эффект также отмечен у манкоцеба и флуазинома. Манкоцеб значительно сильнее действовал на *A. solani*, чем на мелкоспоровые виды. Азоксистробин и хлороталонил проявили самую низкую эффективность.
6. Мутации G143A, обуславливающей устойчивость мелкоспоровых видов рода *Alternaria* к азоксистробину в странах Европы и в США, у российских мелкоспоровых устойчивых изолятов не было выявлено.

Личный вклад автора. В настоящей работе приведены результаты, полученные лично автором, при выполнении работ под его руководством или в рамках совместной деятельности. Автором осуществлялась постановка проблемы и методическая разработка путей ее решения, планирование и проведение исследований, обработка, систематизация и интерпретация полученных данных, апробация и публикация результатов. Доля личного участия в публикациях, выполненных в соавторстве, пропорциональна числу соавторов.

Апробация работы. Основные положения и материалы работы были представлены и обсуждены на региональных, всероссийских и международных конференциях, совещаниях и съездах, среди которых: Международная конференция «Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии» (Москва, 1998), Международная конференция «Микология и криптогамная ботаника в России» (С.-Петербург, 2000), Научно-практическая конференция «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы» (Москва, 2001), Первый съезд микологов России (Москва, 2002), The 7-th International Mycological Congress (Oslo, 2002), The 7th International Congress

on Aerobiology (Montreal, 2002), Первый всероссийский конгресс по медицинской микологии (Москва, 2003), Первая всероссийская конференция по иммунитету растений к болезням и вредителям (С.-Петербург, 2002), Международная научная конференция «Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах» (Минск, 2004), III съезд ВОГиС «Генетика в 21 веке: современное состояние и проблемы развития» (Москва, 2004), Международная конференция «Грибы в природных и антропогенных экосистемах» (С.-Петербург, 2005), Международная конференция «Грибы и водоросли в биоценозах – 2006» (Москва, 2006), Международный конгресс «Картофель. Россия. 2007» (Москва, 2007), XV Congress of European Mycologists (С.-Петербург, 2007), Второй съезд микологов России (Москва, 2008), Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» (С.-Петербург, 2008), Научно-практическая конференция «Актуальные проблемы современной индустрии производства картофеля (Картофель-2010)» (Чебоксары, 2010), Международная научно-практическая конференция «Теоретические и прикладные аспекты современной фитопатологии и иммунитета растений» (Минск, 2011), 13-th Euroblight workshop (С.-Петербург, 2011) и другие.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 109 печатных работ, из них 18 статей в журналах из перечня, рекомендованного ВАК, 28 – в других периодических изданиях и сборниках, 1 патент, 1 методические указания, 2 – соавторство в монографиях, 59 – тезисы и материалы конференций.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 325 страницах, содержит 46 рисунков и 76 таблиц и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и обсуждения собственных исследований, заключения, выводов, списка публикаций автора по теме диссертации и списка цитированной литературы. Библиография включает 238 литературных источников, из них 164 – иностранных.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность проф. Ю.Т.Дьякову за консультации, всестороннюю поддержку, помощь на всех этапах выполнения и написания работы, а также проф. А.Н.Лихачеву, проф. А.Н.Смирнову, проф. W.E.Fry и к.б.н. А.В.Филиппову за помощь в работе, организации исследований, освоении технологий и интерпретации данных. Отдельная благодарность сотрудникам, студентам и аспирантам биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова, РГАУ-МСХА им. К.А.Тимирязева, ВНИИ фитопатологии, ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г.Лорха, ВНИИ овощеводства и других организаций, в разное время принимавших

участие в совместных работах по теме диссертации: М.А.Побединской, Л.Ю.Кокаевой, Е.Д.Мыце, А.В.Долговой, С.Ф.Багировой, С.Smart, M.D.Coffey, А.В. Александровой, Ф.Б.Ганнибалу, О.И.Лавровой, А.С.Кравцову, Е.В.Морозовой, Б.Н.Козловскому, И.Н.Козловской, Т.И.Сметаниной, С.Ю.Спиглазовой, Т.А.Терешонковой, Н.В.Стацюк, М.А.Кузнецовой, М.К.Деревягиной, В.Н.Зейруку, К.А.Пшеченкову, С.А.Кузнецову, В.П.Апрышко, Ф.Х.Аматхановой, Д.И.Милютиной, Я.В.Петруниной, С.А.Шеину, П.Н.Плуталову. За помощь в сборе образцов автор благодарит А.В.Николаева, З.З.Салихову, З.Сташевски, Ш.Б.Байрамбекова, К.О.Бутенко, А.В.Биткова, Ю.А.Чикина, Л.М. и В.В.Водневых.

Глава 1. Обзор литературы.

В обзоре литературы представлено описание цикла развития возбудителя фитофтороза, проведен сравнительный анализ маркеров, применяемых для популяционных исследований, обобщены исследования динамики генотипического состава популяций *P.infestans*. Отдельный раздел главы 1 посвящен исследованиям возбудителя альтернариоза. В нем обсуждается систематика рода и проблемы, возникающие при классификации видов рода *Alternaria*, паразитирующих на картофеле и томате. Описано развитие заболевания на картофеле и томате и биологические особенности вызывающих его видов гриба. Проанализированы возможности использования молекулярных методов исследований в таксономии рода *Alternaria*. Особое внимание уделено методам борьбы с фитофторозом и альтернариозом, используемым для борьбы с ними химическим фунгицидам, механизмам возникновения устойчивости к препаратам.

Глава 2. Материалы и методы.

Сбор пораженных образцов и выделение изолятов в чистую культуру.

Пораженные фитофторозом и альтернариозом образцы собирали с растений (1-2 образца на одно растение), отстоящих друг от друга на расстояние не менее 1 (огороды) или 3 м (крупные поля). Выделение изолятов в чистую культуру проводили с использованием влажных камер. После появления спороношения на поверхности пораженного органа его просматривали под бинокулярным микроскопом и остро заточенной препаровальной иглой, смоченной в агаризованной среде, переносили конидии, отличающиеся по морфологии, на агаризованную овсяную среду (для выделения *Alternaria* использовали также сусло-агар) с добавлением пенициллина (1000 ед/мл) и инкубировали до тех пор, пока диаметр колонии не достигал 4-5 см, после чего кусочек мицелия с края колонии пересеивали на другую чашку со средой.

За период с 1991 по 2011 годы в чистую культуру были выделены 3358 изолятов *P. infestans* из 210 полевых популяций России и Беларуси. Изоляты из Сахалина, Ленинградской, Тульской, Новгородской, Мурманской, Брянской, Ярославской областей были переданы сотрудниками Лаборатории грибных болезней картофеля и овощных культур ВНИИ фитопатологии, Белорусские штаммы – Центром картофелеводства и плодоовощеводства республики Беларусь. В сборе пораженных образцов и выделении изолятов в чистую культуру принимали участие М.А. Побединская, А.В. Филиппов, А.В. Долгова, Т.И. Уланова, В.П. Апрышко, А.Н. Смирнов, А.С. Кравцов, Ф.Х. Ааматханова, С.А. Кузнецов, Я.В. Петрунина, Д.И. Милютин, С.Ф. Багирова, А.В. Николаев, Ш.Б. Байрамбеков, З. Сташевски, З.З. Салихова, Л.Ю. Кокаева и другие. Выделение изолятов в 1991 – 1994 годах было проведено А.Н. Смирновым.

Изоляты возбудителей альтернариоза были выделены из образцов, собранных в 2007–2010 годах в Ленинградской, Московской, Астраханской, Костромской, Смоленской областях, в Марий Эл и Татарстане. Изоляты из Ставропольского края были переданы сотрудниками Лаборатории грибных болезней картофеля и овощных культур ВНИИ фитопатологии; штаммы *A. solani*, собранные на Дальнем Востоке, часть штаммов из Ленинградской области, а также референтные штаммы, необходимые для уточнения идентификации видов, – сотрудниками Лаборатории микологии и фитопатологии ВНИИ защиты растений. Всего в работе использовано 311 изолятов *Alternaria* из разных регионов.

Оценка устойчивости к фунгицидам проводилась на агаризованной овсяной (сусло-агар – для *Alternaria*) среде с добавлением фунгицида в концентрациях 0,1; 1; 10; 100 и 1000 мкг/мл и на среде без фунгицида (контроль). Эксперименты проводили в трёх повторностях, результаты которых усредняли. Для каждого изолята определяли показатель ЕС₅₀ (50% эффективной концентрации), т.е. концентрацию фунгицида, необходимую для замедления скорости радиального прироста колонии в 2 раза относительно бесфунгицидного контроля.

Определение типов спаривания у *P. infestans* проводили методом попарного срачивания исследуемых изолятов на овсяной агаризованной среде с тестерными штаммами с известными типами спаривания. Чашки инкубировали в темноте при 18°C в течение 14 дней, после чего определяли наличие или отсутствие ооспор в месте контакта гиф между штаммами с помощью светового микроскопа. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры с тестером А2 и не образовывал их с тестером А1, то его относили к типу спаривания А1, если наоборот – то к А2. Штаммы, образующие ооспоры с обоими тестерами, относили к группе А1А2, а не образующие ни с одним – к группе 00.

Оценка вирулентности изолятов. Для идентификации генов вирулентности *P. infestans* использовали тест-набор, полученный из Международного картофельного центра (CIP, Перу). Листовые пластинки из среднего яруса помещали во влажные камеры нижней стороной вверх и инокулировали суспензией зооспорангиев с концентрацией $0,5-1,5 \times 10^5$ шт/мл, после чего листья инкубировали при температуре 18°C и фотопериодизме свет/темнота=16ч/8ч. Результаты учитывали через 5-6 дней после инокуляции. В каждом эксперименте в качестве контроля использовали не имеющую R-генов линию картофеля 702514. В качестве положительного результата учитывали только спорулирующие пятна диаметром более 5 мм. Если штамм давал на тестируемых листьях очень мелкие пятна или некрозы без спороношения, либо не проявлял видимых симптомов заражения, результат считали отрицательным. Все эксперименты проводили в 3-х повторностях. Эксперимент считали удачным только в том случае, если при заражении линии 702514 были также получены положительные результаты.

Морфологическое определение видовой принадлежности изолятов *Alternaria* проводили по методике, предложенной Симмонсом (Simmons, 1992, 2007). При определении учитывались следующие признаки: наличие и тип ветвления конидий (у апекса и у основания), поверхность спор и др. Изоляты выращивали в стеклянных чашках Петри на картофельно-морковном агаре (КМА) при 25°C и естественном фотопериодизме. На 7-10 день роста колонии микроскопировали, описывали особенности формирования конидиальных цепочек и морфологию спор.

В случае отсутствия конидиальных спороношений у *A. solani* колонии подвергали воздействию УФ-излучения в течение 180 сек. (лампа Mineralight (2x30 Вт), модель CS-215, производство Ultra-Violet Products, Inc.; длина волны 260 нм, расстояние от ламп до культуры 7 см.). После этого чашки инкубировали при комнатной температуре в течение 3–5 суток в условиях естественного освещения.

Исследование спектра изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы. Мицелий наращивали в чашках Петри с жидкой гороховой средой. Спектр изоферментов определяли на целлюлозоацетатных гелях согласно рекомендации производителя Helena Laboratories Inc. (Hebert, Beaton, 1993).

Выделение ДНК. Мицелий, выращенный в чашках с жидкой гороховой средой, растирали в жидком азоте, после чего лизировали в СТАВ–буфере. Очистку от белков проводили с использованием хлороформа. После выделения ДНК из пораженной растительной ткани проводили определение концентрации ДНК в растворе на спектрофотометре «Specord 50» (фирмы “Analyticjena”,

Германия), после чего ее доводили до 4 нг/мкл. Хранили выделенную ДНК в деионизованной воде при -20°C .

Гаплотипы митохондриальной ДНК идентифицировали согласно методике, разработанной Griffith и Shaw (1998). Продукты амплификации разделяли в 0,8% агарозном геле, продукты рестрикции – в 1,5%. Гели готовили на трис-боратном буфере с добавлением бромистого этидия.

Проведение ПЦР для амплификации региона, предназначенного для секвенирования. Амплификацию проводили в амплификаторе «Biometra T1» по следующей программе: 95°C , 3 мин.; 25 циклов: 94°C , 40 сек., температура отжига указанная в таблице 1, 40 сек., 72°C , 60 сек.; конечная элонгация 72°C , 3 мин. Для амплификации специфичных участков ДНК использовали праймеры, приведенные в таблице 1.

Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и содержал 2,5 мкл 10x PCR buffer (Helicon), 2 мкл 25mM MgCl_2 , 0,5 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 2 мкл dNTP mix (содержащей по 0,2 mM каждого dNTP), по 4пмоль каждого праймера, 1 мкл раствора ДНК. Объем смеси доводили деионизированной водой до 25 мкл.

Таблица 1.

Праймеры, использованные в работе.

Название	Последовательность ДНК	Ссылка	Температура отжига, $^{\circ}\text{C}$
Регион ядерных рибосомных генов (для <i>P. infestans</i>)			
ITS6	5'-GAGGGACTTTTGGGTAATCA	Cooke et al., 2000	55
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990	
Регион ядерных рибосомных генов (для <i>Alternaria sp.</i>)			
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White et al., 1990	58
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al., 1990	
Регион большой субъединицы (mt LSU) митохондриальных рибосомных генов (для <i>Alternaria sp.</i>)			
ML1	5'-GTACTTTTGCATAATGGGTCAGC	White et al., 1990	52
MLR1	5'-GCCCTCCGAGAGCAAATAC	Peever et al., 2004	

Секвенирование. После электрофоретического разделения ПЦР-продукт вырезали из геля (1,2% агарозы на TBE буфере) и выделяли его с использованием набора «Цитокин». Секвенирование ДНК проводилось компанией «Евроген» с помощью набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing, с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК Applied Biosystems 3730 xl. Для секвенирования использовались те же праймеры, по которым проводилась амплификация исследуемого участка. Чтение каждой последовательности проводили 2 раза – с прямого и обратного праймеров.

Проведение интер-SINE-ПЦР. Праймер (100 пмоль) метили с помощью [$\gamma^{32}\text{P}$]-АТФ (1МБк) и полинуклеотидкиназы. ПЦР проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси, содержащей стандартный *Taq*-буфер (50 mM KCl, 10 mM буфер Tris-HCl, pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂ и 0,001% желатин), 0,2 mM dNTP, 4 пмоль праймера, 1 ед. *Taq*-полимеразы и 25 нг геномной ДНК. Программа ПЦР: денатурация – 95°C, 1 мин.; отжиг – 48°C, 1 мин.; синтез – 72°C, 1 мин. Число циклов – 30. Предварительная денатурация продолжалась 5 мин. при 95°C; конечный синтез – 5 мин. при 72°C. Эксперименты выполняли на термоциклере Biometra T1. Продукты ПЦР денатурировали и разделяли с помощью электрофореза в 6%-ом полиакриламидном геле размером 50x28x0,4мм, содержащем 0,089 M трис-боратный буфер и 8 M мочевины. Электрофорез проводили в течение 7 часов при постоянной мощности тока 75 Вт. Радиоавтографию проводили, экспонируя высушенный гель с рентгеновской пленкой RETINA в течение 16 ч.

Глава 3. Систематическое положение возбудителя фитофтороза картофеля и томата.

Для уточнения видовой принадлежности российских изолятов возбудителей фитофтороза картофеля и томата совместно с профессором Калифорнийского университета M.D.Coffey было проведено секвенирование участка ДНК, амплифицируемого с помощью пары праймеров ITS6–ITS4. Этот участок включает внутренний транскрибируемый спейсер ITS1, участок, кодирующий 5,8S субъединицу рибосомы, а также регион ITS2. Были исследованы 57 изолятов из 17 регионов России. Результаты работы показали, что все исследованные изоляты имели практически идентичные последовательности нуклеотидов, совпадающие с типичными для *P. infestans* (Cooke et al., 2000). Некоторые штаммы имели незначительные отличия, вызванные ограниченным числом нуклеотидных замен. Таким образом, по данным анализа региона ITS6–ITS4 показано, что все исследованные изоляты принадлежат к виду *P. infestans*. В пользу этого свидетельствуют морфологические исследования и данные других проведенных анализов: изучения гаплотипов митохондриальной ДНК, анализа спектров изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы.

Глава 4. Анализ независимых маркерных признаков *P. infestans*.

4.1. Изучение типов спаривания

За период с 1991 по 2011 годы тип спаривания был определен у 3203 изолятов из 166 полевых популяций. По соотношению штаммов с разными типами спаривания популяции разделились на 2 группы: популяции сибирско-

дальневосточного типа, представленные штаммами какого-либо одного типа спаривания, и популяции европейские, в состав которых, как правило, входили штаммы с разными типами спаривания. Эта тенденция прослеживалась и на картофеле, и на томате.

Очень высоким генотипическим разнообразием и распределением типов спаривания близким к 1:1 отличались популяции Московской области, Северного Кавказа и Беларуси, а также многие популяции европейской части России. В некоторых популяциях были встречены отдельные изоляты, которые образовывали ооспоры с обоими тестерами (группа A1A2) или не образовывали ни с одним из тестеров.

Изучение соотношения штаммов *P. infestans* с разными типами спаривания на одном и том же поле в течение вегетационного сезона показало, что общей тенденцией был рост частоты типа спаривания, соответствующего преобладающему типу спаривания первичного инокулюма, в начальный период эпифитотии, и ее падение в более поздний период с приближением соотношения A1:A2 к 1:1.

Самофертильные штаммы. Существуют штаммы *P. infestans*, которые при анализе типа спаривания ведут себя как A1 или A2, но через некоторое время хранения на агаризованной среде в монокультуре (обычно около 2-х месяцев) начинают самопроизвольно образовывать ооспоры. Такие изоляты мы называли самофертильными (СФ). Доля таких штаммов различалась год от года; в 1997, 2003 и 2004 годах их доля в популяциях составляла от 21 до 34 %, в 1998, 1999, 2001 и 2006 годах – менее 10%. При сращивании с тестерными штаммами СФ в большинстве случаев вели себя как A2 (табл. 2). После хранения на косяках с овсяным агаром при +4°C и нескольких пересевов большая часть изолятов теряла способность образовывать ооспоры в монокультуре.

Таблица 2.

Доли самофертильных штаммов среди определенных как A1, A2 и A1A2 в пробах с тестерами.

Год	Проверено изолятов	Доля самофертильных штаммов среди, %:		
		A1	A2	A1A2
1997	183	6	80	-*
2003	387	9	56	100
2004	279	27	39	-*

Прим.:* «-» в 1997 и 2004 годах штаммов группы A1A2 не было.

4.2. Изоферментный анализ.

Традиционно используемые при анализе популяций изоферментные маркеры – локус 1 пептидазы и локус 1 глюкозо-6-фосфат изомеразы – оказались малопригодными для исследования российских популяций *P. infestans* из-за низкой вариабельности. Локус 1 глюкозо-6-фосфат изомеразы (GPI1), традиционно используемый в популяционных исследованиях, был исследован у 129 изолятов сборов 1997-1998 годов (Elansky et al, 2001) и у 38 изолятов 2000-2001 годов. Все исследованные штаммы имели один и тот же генотип 100/100 по этому локусу. Встречавшаяся ранее аллель 86, характерная для широко распространенного до начала 90-х годов 20 века клона US 1, после 1993 года не выявлялась.

С целью поиска новых изоферментных маркеров была проанализирована вариабельность малик-энзима, малатдегидрогеназы, супероксиддисмутазы (для каждого фермента проанализировали выборку из 20 изолятов из разных региональных популяций). Спектры изоферментов этих белков также были мономорфны, что совпадает и с результатами, полученными другими исследователями (Tooley et al., 1985). Достаточно высокий полиморфизм был отмечен у аллозимов второго локуса пептидазы. При электрофорезе на целлюлозоацетатных гелях локус 2 прокрашивается одновременно с локусом 1, что делает этот маркер удобным в работе и недорогим в применении.

Спектр изоферментов пептидазы был исследован у 1195 изолятов, представляющих 99 полевых популяций. В исследуемых популяциях локус пептидазы 1 (Per-1) был представлен двумя аллелями 92 и 100, локус 2 (Per-2) – аллелями 100 и 112. Генотип Per-1 92/92 был обнаружен за все время исследований только 2 раза: у изолята, выделенного в 1997 г из картофеля в Москве, и у изолята, выделенного в 2007 году в Беларуси. Чаше всего встречался генотип 100/100, 92/100 – значительно реже.

Большой полиморфизм отмечен у второго локуса пептидазы (Per-2). В полевых популяциях встречаются часто как гомозиготы 100/100, 112/112, так и гетерозиготы 100/112. Локус 2 пептидазы оказался существенно более информативным, чем локус 1. Так, многие популяции по спектру изоферментов Per-1 были мономорфны, тогда как анализ Per-2 позволил выделить в этих популяциях определенные группы. Гетерозигота 100/112 не была выявлена в Костромской области, хотя там были отмечены штаммы как типа спаривания A2 с генотипом 100/100, так и типа спаривания A1 с генотипом 112/112. Это может свидетельствовать об отсутствии полового процесса и гибридизации на исследуемых полях.

В Московской области популяции на картофеле были мономорфны по локусу Per-1 до 1996 года, а также в 2000 и 2001 годах. В остальные годы (1997,

1998, 2003, 2006, 2008) в подмосковных популяциях наблюдалось разнообразие, связанное с присутствием гетерозиготы 92/100. Усредненные данные за весь период наблюдений (1991 – 2008 годы) показывают, что и на картофеле, и на томате генотип 92/100 присутствовал в 11% образцов. Разнообразие популяций Московской области по локусу *Per-2* было отмечено во все годы наблюдений (1999-2008). Если обратиться к усредненным многолетним данным за все годы наблюдений, то заметны различия в соотношениях генотипов локуса *Per-2* на картофеле и томате. Соотношение генотипов *Per-2* 100/100:100/112:112/112 на картофеле было 69/24/7, а на томате – 24/68/8, соответственно.

Очень высоким разнообразием по всем исследованным маркерным признакам отличались популяции Северного Кавказа. По локусу *Per-2* обнаружены все три возможных аллельных состояния. Анализ соотношения частот аллелей локуса *Per-2* показал, что в популяциях из Кисловодска, Северной Осетии и Ингушетии они находятся в равновесном состоянии, удовлетворяющем уравнению Харди – Вайнберга, что свидетельствует в пользу панмиксной структуры этих популяций.

4.3. Анализ гаплотипов митохондриальной ДНК.

Гаплотипы мтДНК были исследованы у 899 изолятов из 86 полевых популяций. На территории России и Беларуси были выявлены штаммы с двумя гаплотипами мтДНК: Ia и IIa. Других гаплотипов не было выявлено, хотя на присутствие Ib и IIb были протестированы 120 штаммов из разных регионов, собранные в 1999-2007 годах. Гаплотип Ib, характерный для клональной линии US-1, последний раз обнаруживали в 1993 году на листьях томата (Малеева, 1996). Соотношение гаплотипов Ia и IIa в разных популяциях сильно варьировало. Были обнаружены как популяции, представленные штаммами с обоими гаплотипами в разных соотношениях (большинство), так и содержащие изоляты только с гаплотипом Ia, либо только с IIa. Усредненные данные за весь период наблюдений (1991 – 2008 годы) в Московской области показали, что соотношение Ia/IIa на картофеле составило 62/38, а на томате 61/39.

4.4. Изучение гетероплазмоза у *P. infestans*.

Основным отличием гаплотипа II мтДНК от I является присутствие вставки размером 1881 пн. К фрагменту этой вставки длиной 709 пн с помощью программы Oligo были сконструированы праймеры VSF_{or} (5'-GCAGCCCAAATATCTCGAAA) и VSRev (5' GCAATGGCGCATCAATTATT). Условия амплификации и состав реакционной смеси – как при определении гаплотипов мтДНК, температура отжига – 52°C. Если в геноме штамма, имеющего тип mtDNA Ia согласно пробе PCR-RFLP, обнаруживали фрагмент

вставки, то штамм считали гетероплазматическим, в противном случае – гомоплазматическим.

Для доказательства гетероплазматической природы штаммов, несущих вставку, изолят ЗМОБТЛ139, содержащий вставку и имеющий Ia тип mtDNA согласно пробе PCR-RFLP, был расклонирован на 4 монозооспоровых клон. Все они содержали вставку. Далее один из клонов был еще раз расклонирован на 16 изолятов (К1-К16). Все монозооспоровые клоны и родительский штамм показали тип Ia при тестировании методом PCR-RFLP. Анализ вставки выявил различия в количестве ПЦР-продукта (рис. 1), причем один клон (9) не содержал вставки. Вероятно, в процессе монозооспорового клонирования в этот изолят попали только митохондрии с геномом типа Ia.



Рис. 1. Амплификация вставки (709 пн) у монозооспорового потомства штамма ЗМОБТЛ139. Прим.: 1-16 – монозооспоровые потомки штамма ЗМОБТЛ139.

Наличие гетероплазмонов может затруднить интерпретацию результатов стандартных тестов, проводимых по методу PCR-RFLP. С другой стороны, митохондриальный геном выполняет ряд жизненно важных функций, гетероплазматическое состояние может иметь значение в адаптациях оомицетов.

Глава 5. Генотипический анализ популяций.

5.1. Анализ на основании независимых маркерных признаков (тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, тип митохондриальной ДНК).

Анализ взаимного влияния изучаемых маркеров (тип спаривания, Per 1, Per 2, тип MtDNA) методом χ^2 не выявил взаимосвязи между этими признаками ($p > 0,05$) (Пляхневич, Еланский, 2008). Независимость исследуемых маркерных признаков позволила провести генотипический анализ изучаемых изолятов.

Для оценки генотипического разнообразия использовали популяции, в которых достаточно большое число штаммов было одновременно исследовано по всем маркерным признакам. Мультилокусные генотипы были определены у 567 изолятов из 19 полевых популяций, выделенных в 2000-2009 годах из пораженных фитофторозом образцов, собранных в разных регионах

Европейской части России, а также 78 изолятов, выделенных в 2006-2007 годах в Беларуси.

В большинстве исследуемых популяций встречались штаммы обоих типов спаривания, разные генотипы по локусам Pcp-1 и Pcp-2, два гаплотипа митохондриальной ДНК Ia и IIa и было отмечено высокое генотипическое разнообразие. Наиболее высоким генотипическим разнообразием отличались популяции из Ставропольского края (13 генотипов), Марий Эл (12), Беларуси (12), Московской области (8), Северной Осетии (7). Генетически однородными и, по-видимому, моноклональными, были популяции из Тульской, Ленинградской и Астраханской областей. Остальные популяции (выделенные из образцов, собранных в Вологодской, Рязанской, Костромской, Смоленской областях, в республиках Мордовия и Ингушетия) были представлены штаммами 2-4 генотипов и, вероятно, поликлональны. Высокое число генотипов штаммов из Беларуси может объясняться тем, что белорусские штаммы были выделены из образцов, собранных в разных точках республики, в то время как все остальные региональные популяции состояли из штаммов, выделенных на одном поле или на нескольких соседствующих частных огородах. Наиболее часто встречающиеся генотипы включали A1 или A2 тип спаривания, Ia или IIa тип митохондриальной ДНК, генотипы 100/100 по локусу Pcp-1 и 100/100 или 100/112 по Pcp-2.

Максимальное число генотипов отмечалось в популяциях, в которых соотношение типов спаривания было близко к 1:1. Ранее проведенные исследования (Еланский и др., 1999) также показали увеличение в популяциях генетического разнообразия, вычисленного по изоферментным маркерам, с приближением соотношения A1:A2 к 1:1. Эти данные свидетельствуют о высокой вероятности скрещивания и гибридизации в полевых популяциях Европейской части России.

5.2. Оценка генотипического разнообразия с использованием INTER-SINE PCR.

Работами некоторых авторов была показана возможность использования коротких диспергированных ядерных элементов (Short Interspersed Nuclear Elements, SINEs) в качестве генетических маркеров (Банникова и др., 2002, Kaukinen, Varvio, 1992, Buntjer, 1997). Это возможно благодаря содержанию внутри SINEs консервативных участков ДНК, к которым можно подобрать ПЦР-праймер. При ПЦР такого типа происходит амплификация фрагментов, расположенных между копиями SINEs. Поскольку SINEs в геноме ориентированы в обоих направлениях, то для анализа достаточно одного праймера на консервативную часть.

В задачи предлагаемой работы, проводимой совместно с О.И.Лавровой, входило проведение интер-SINE-ПЦР с целью сравнительного анализа изолятов *P. infestans* из удаленных регионов: Тульская, Рязанская, Московская, Брянская области, республики Марий Эл, Ингушетия, Северная Осетия, о. Сахалин, Беларусь, а также из коллекции Scotland Crop Research Institute – из Аргентины, Эквадора, Мексики, Дании. В работе использовали праймер revSINE: 5' – GGGATCGAACCAGAAGTGACTACGG. ПЦР продукт амплификации тотальной ДНК *P. infestans* с праймером RevSINE был представлен большим числом полос разного размера. Кластерный анализ бинарных матриц, соответствующих фингерпринтам ДНК, не выявил групп изолятов ни по признаку географического происхождения, ни по растению-хозяину. Достоверно выделялся один изолят из Сахалина, который отличался и по другим характеристикам – имел самую высокую агрессивность к картофелю, максимально возможное число генов вирулентности к сортам картофеля, уникальный генотип по RG 57 (Elansky et al, 2001).

Аналогичные результаты были получены при применении этого метода для сравнительного анализа штаммов гриба *Stachybotrys chartarum* (Еланский и др., 2004). В результате исследований также не было показано кластеризации штаммов с одинаковых субстратов или из близких местообитаний и отмечены отдельные сильно выделяющиеся изоляты, отличающиеся и по другим маркерным признакам.

5.3. Исследования генотипического разнообразия в Московской области, в Сибири и на Дальнем Востоке с использованием гибридационной пробы RG57.

В 1997-1998 годах были исследованы изоляты *P. infestans*, выделенные из образцов, собранных А.В. Долговой и А.В. Филипповым вдоль Транссибирской железнодорожной магистрали (Екатеринбург, Омск, Красноярск, Иркутск, Улан-Уде, Чита, Биробиджан, Хабаровск, Владивосток), на острове Сахалин, а также выделенные нами изоляты из Московской области, г. Москва, и Томской области. Все изоляты были проанализированы на набор признаков, традиционно используемых при идентификации клональных линий: тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы, тип митохондриальной ДНК, фингерпринтинг с гибридационной пробой RG 57 (25 локусов, Goodwin et al., 1992). Анализ RG57 проводился совместно с С. Smart и W.E. Fry по протоколу, принятому в лаборатории W.E. Fry в Корнельском Университете, (<http://www.plantpath.cornell.edu/Fry/Protocols.html>).

Таблица 3.

Мультилокусные генотипы исследованных изолятов.

Клональная линия	Место сбора образцов	ТС	GPI	Rep 1	RG 57 фингерпринт	Mt DNA	Число изолятов
Изоляты, выделенные с картофеля							
SIB 1	* ¹	A1	100/100	100/100	1000100011001101000110011	Па	31
SIB 2	Хабаровск	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	Па	5
SIB 3	Владивосток	A1	100/100	100/100	1100101010001101000110011	Па	1
MO 1	M1* ² (97)	A2	100/100	100/100	1000100011001101000110011	Па	1
MO 2	M1 (97)	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	Ia	1
MO 3	M1 (97)	A1	100/100	100/100	1010100001001101000110011	Па	1
MO 4	M1 (97)	A1	100/100	92/100	1010111011001101000110011	Па	3
MO 5	M2 (97)	A1	100/100	100/100	1000101001001101010110011	Па	1
MO 6	M2 (97)	A1	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia	1
MO 7	M4 (97)	A1	100/100	92/100	1000100011001100000110011	Па	1
MO 8	M4 (97)	A1	100/100	92/92	1010110001001100000110011	Па	1
MO 9	M1 (98)	A1	100/100	92/100	1000100001001101000110011	Па	1
MO 10	M2 (98)	A1	100/100	100/100	1010110000001100000110011	Ia	1
MO 11	M3 (98)	A1	100/100	92/100	1010101001001100000110011	Ia	1
MO 12	M3 (98)	A2	100/100	100/100	1010101001001101000110011	Ia	1
Изоляты, выделенные с томата							
SIB 2	Биробиджан	A2	100/100	100/100	1000100001001101000110011	Па	3
MO 13	M2 (97)	A1	100/100	100/100	1010101000001101000110011	Ia	1
MO 14	M3 (98)	A1	100/100	100/100	0010101001001100000110011	Ia	1
MO 15	M3 (98)	A1	100/100	100/100	0110111001001100010110011	Ia	1
MO 16	M3 (98)	A1	100/100	100/100	1000100000001101000110011	Па	1
Изоляты из старых коллекций							
US 1	M3 (93)	A1	86/100	92/100	1010101011001101000110011	Ib	2
SIB 1	* ¹	A1	100/100	100/100	1000100011001101000110011	Па	5
MO 17	M3 (93)	A1	86/100	100/100	1010101011001101000110011	Ib	1
MO 18	M3 (93)	A1	100/100	100/100	1010111001001101000010011	Па	1
MO 19	M3 (93)	A1	100/100	100/100	1010101000001101010110011	Па	1
MO 20	M3 (93)	A2	100/100	100/100	1010101000001101000110011	Па	1
MO 21	M3 (93)	A2	100/100	100/100	1010101000001100010110011	Па	1

Прим.: *¹ – генотип Sib 1 был обнаружен у изолятов из окрестностей городов Омск, Красноярск, Иркутск, Чита, Екатеринбург, Владивосток, с острова Сахалин и из старых сборов (1993 г.) с картофеля в Московской области. *² – M1 – M4 – разные популяции Московской области, ТС – тип спаривания.

Анализ генотипов по всему комплексу независимых маркерных признаков был сделан у 70 изолятов. В результате проведенной работы были выявлены сильные различия в структуре популяций сибирско-дальневосточного региона и Московской области. Большинство популяций вдоль Транссибирской железнодорожной магистрали (Екатеринбург, Омск, Томск, Красноярск, Иркутск, Чита) и с острова Сахалин были представлены штаммами одной клональной линии Sib1 (табл. 3). Во Владивостоке популяция была

биклональной, сложенной из штаммов клональных линий Sib1 и Sib3. В окрестностях Биробиджана и Хабаровска популяции были также моноклональными, но представлены штаммами другой клональной линии, Sib2. Штаммы с генотипом Sib2 были отмечены как на картофеле, так и на томате. Все выявленные в азиатской части России штаммы имели гаплотип митохондриальной ДНК Па.

Популяции Московской области, напротив, отличались очень высоким генотипическим разнообразием. Из 27 протестированных изолятов, собранных в Московской области в 1993-1998 годах, 25 имели уникальные мультилокусные генотипы. Штаммы клональной линии US-1, ранее широко распространенные по всему Земному шару, последний раз были выявлены в 1993 году на листьях томата в Одинцовском р-не Московской области (Смирнов и др., 1996, Elansky et al., 2001). Интересна клональная линия MO17, мультилокусный генотип которой практически идентичен US1, но имеются отличия в структуре изоферментов первого локуса пептидазы. Вероятно, это объясняется произошедшей мутацией. Штаммы клональной линии Sib1 также выявлялись в значительном числе на полях Московской области в 1993 году, причем все они имели очень высокий уровень устойчивости к металаксилу.

Если сравнить фенотипические признаки штаммов (вирулентность к сортам картофеля и устойчивость к металаксилу), то заметны сильные вариации этих признаков у штаммов одной клональной линии. Так, среди изолятов с мультилокусным генотипом Sib1 наблюдалась вариабельность как средней вирулентности (от максимально возможной, равной 10, у штаммов Сахалинской популяции, до 6,2 в Омске и 6,4 в Чите), так и устойчивости к металаксилу. По-видимому, на проявления устойчивости и вирулентности сильно влияют применение на конкретных полях фунгицидов и наличие генов резистентности у возделываемых сортов картофеля.

Глава 6. Изучение ооспорообразования в природных популяциях *P. infestans*

Ооспоры имеют большое значение в инфекционном цикле *P. infestans* как на картофеле, так и на томате. Они могут служить источником первичной инфекции, способствовать повышению генетической изменчивости и появлению новых форм гриба, в том числе высокопатогенных. Целью настоящего исследования, в котором участвовали А.Н. Смирнов, С.А. Кузнецов, В.П. Апрышко, Ф.Х. Аमतханова, было изучение закономерностей образования ооспор в полевых популяциях *P. infestans*.

Всего на наличие ооспор исследованы 2695 фитофторозных образцов из 73 полевых популяции. Сборы проведены в 1997, 1999, 2000, 2001, 2003, 2006 и 2007 годах. Ооспоры были обнаружены в пораженных фитофторозом образцах

листьев, стеблей и клубней картофеля, листьев и плодов томата, собранных в Московской области, республиках Северного Кавказа, Ставропольском крае, Астраханской области и в Марий Эл. Максимальная доля содержащих ооспоры образцов была выявлена среди пораженных плодов томата, меньшая - среди листьев томата и минимальная – среди листьев картофеля (табл. 4).

Таблица 4.

Встречаемость ооспор в пораженных фитофторозом образцах разных органов растений-хозяев (суммарные данные за весь период исследований).

Орган растения	Общее число протестированных образцов за 1997-2006 годы	Число образцов с ооспорами.
Листья картофеля	1815	115 (6,3%)
Листья томата	255	49 (19,2%)
Плоды томата	360	119 (33%)

Исключительно благоприятные для развития фитофтороза погодные условия 2003 года позволили провести специальное исследование, посвященное изучению встречаемости ооспор в пораженных образцах с одним и несколькими очагами фитофтороза. Было показано, что 31% образцов листьев картофеля с двумя и более пятнами содержал ооспоры, в то время как среди образцов с 1 пятном содержали ооспоры лишь 12%. Это свидетельствует в пользу того, что при сильном развитии фитофтороза, когда на листовой пластинке образуется несколько пятен, значительная часть ооспор имеет гибридную природу.

Ооспоры в образцах листьев с одним очагом фитофтороза встречались как в тех полевых популяциях, в которых были выявлены изоляты только одного типа спаривания, так и в тех, из которых выделяли изоляты обоих типов спаривания. Ооспоры были отмечены как в образцах с мицелием *P. infestans* A1 типа спаривания (13% образцов содержали ооспоры), так и в образцах с мицелием A2 (15%). Преимущества в образовании ооспор мицелием какого-либо типа спаривания не было обнаружено. Это представляется интересным фактом, поскольку на агаризованной среде штаммы типа спаривания A2 значительно чаще образовывали ооспоры в монокультуре, чем штаммы A1 (см. раздел 4.1).

Глава 7. Устойчивость к фунгицидам.

В 2007-2009 годах была исследована устойчивость к некоторым фунгицидам штаммов *P. infestans*, выделенных с посадок картофеля и томата в разных регионах европейской части России и Беларуси (табл. 5). Изучение устойчивости к **манкоцебу** показало, что во всех изученных популяциях преобладали чувствительные штаммы. Штаммов с EC_{50} , превышающим 31 мкг/мл, не было выявлено, хотя в нескольких популяциях были представлены штаммы с близкими значениями этого показателя. Возможно, это пороговое значение, и штаммы с более высокой устойчивостью оказываются нежизнеспособны или неконкурентоспособны в агроценозах. К **хлороталонилу** все исследованные изоляты были чувствительны, показатель EC_{50} не превышал 10 мкг/мл (за исключением одного изолята из Минской области с EC_{50} равным 16,75 мкг/мл). Не было выявлено и изолятов, устойчивых к **флуазинаму**. Самый устойчивый штамм имел показатель EC_{50} равный 30,1 мкг/мл; в большинстве же популяций не выявлялись изоляты с EC_{50} более 7 мкг/мл. Все проверенные изоляты были высокочувствительны к **диметоморфу** (EC_{50} не более 0,1 мкг/мл) и **азоксистробину** (EC_{50} не превышал 0,1 мкг/мл).

Во всех протестированных популяциях были обнаружены только высокочувствительные к **азоксистробину** изоляты, хотя по литературным данным риск появления устойчивости к азоксистробину оценивается как высокий (Bartlett et al., 2002). Возможно, это связано с редким применением Квадриса в Европейской части России. Мы специально исследовали штаммы, выделенные с коммерческих полей томата в Астраханской области, где применяют азоксистробин и другой стробилуриновый фунгицид крезоксиметил. Однако и там были обнаружены только высокочувствительные изоляты. По-видимому, появление устойчивости к азоксистробину у *P. infestans* является крайне редким событием.

Исследование устойчивости к **металаксилу** показало, что в большинстве исследованных популяций преобладали чувствительные штаммы. Среди изолятов, выделенных из образцов, собранных в Астраханской, Ленинградской областях и в Марий Эл не было найдено ни одного с EC_{50} более 5 мкг/мл. Однако в некоторых областях были выявлены и высокоустойчивые изоляты. В популяции из Московской области из 31 исследованного изолята у 8 показатель EC_{50} превышал 100 мкг/мл, хотя образцы были собраны с необрабатываемого фунгицидами поля. Среди изолятов, выделенных из Белорусских образцов, таких штаммов было два. Наибольшей долей высокоустойчивых изолятов отличалась популяция из Смоленской области (32 изолята из 48 исследованных).

Таблица 5.

Устойчивости к фунгицидам штаммов из разных регионов России и Беларуси.

Фунгицид	Регион сбора образцов	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность ЕС ₅₀ , мкг/мл	Среднее ЕС ₅₀ , мкг/мл	Число штаммов с различными ЕС ₅₀ :			
					<1	1-10	10-100	>100
Манкоцеб	Московская	23	0,6 – 22,4	5,51	5	16	2	0
	Ленинградская	19	0,98 - 26	10,9	1	10	8	0
	Смоленская	—	—	—	—	—	—	—
	Костромская	25	0,5 – 25,6	6,48	3	20	2	0
	Астраханская	20	0,6 – 18,6	5,31	4	14	2	0
	Марий Эл	45	0,5 – 27	8,42	2	30	13	0
	Беларусь	57	0,64 – 30,8	10,2	6	31	20	0
Металаксил	Московская	31	0,52 - 398	100,0	14	4	5	8
	Ленинградская	12	0,54 – 4,7	2,0	7	5	0	0
	Смоленская	48	0,51 – 380,0	168,9	2	2	12	32
	Костромская	52	0,51 – 38,75	1,67	44	7	1	0
	Астраханская	25	0,51 – 2,85	0,85	22	3	0	0
	Марий Эл	47	0,5 – 4	0,76	42	5	0	0
	Беларусь	64	0,5 – 151,5	5,5	55	4	2	2
Азоксистробин	Московская	15	0,05 – 0,07	0,05	15	0	0	0
	Ленинградская	10	< 0,05	< 0,05	10	0	0	0
	Смоленская	10	< 0,05	< 0,05	10	0	0	0
	Костромская	14	0,05 – 0,07	0,05	14	0	0	0
	Астраханская	10	< 0,05	< 0,05	10	0	0	0
	Марий Эл	10	< 0,05	< 0,05	10	0	0	0
	Беларусь	27	< 0,05	< 0,05	27	0	0	0
Хлорогалолил	Московская	8	0,51 – 0,79	0,6	8	0	0	0
	Ленинградская	5	0,53 – 5,5	3,0	2	3	0	0
	Смоленская	8	0,64 – 4,95	2,17	4	4	0	0
	Костромская	6	0,81 – 11,5	4,48	3	2	1	0
	Астраханская	10	0,55 – 5,5	3,18	3	7	0	0
	Марий Эл	4	1,82 – 3,45	2,67	0	4	0	0
	Беларусь	23	0,69 – 16,75	4,85	3	19	1	0
Флуазинам	Московская	8	0,53 – 5,24	2,03	4	4	0	0
	Ленинградская	5	0,59 – 5,34	2,36	2	3	0	0
	Смоленская	7	0,52 – 6,83	2,48	4	3	0	0
	Костромская	8	0,53 – 5,99	1,7	6	2	0	0
	Астраханская	9	0,75 – 4,26	1,92	5	4	0	0
	Марий Эл	4	4,21 – 8,43	5,51	0	4	0	0
	Беларусь	21	0,5 – 30,12	6,98	3	14	4	0
Диметоморф	Московская	9	0,05 – 0,09	0,06	9	0	0	0
	Ленинградская	5	0,05 – 0,07	0,06	5	0	0	0
	Смоленская	7	< 0,05	< 0,05	7	0	0	0
	Костромская	7	0,05 – 0,06	0,05	7	0	0	0
	Астраханская	7	0,05 – 0,09	0,06	7	0	0	0
	Марий Эл	5	0,05 – 0,06	0,06	5	0	0	0
	Беларусь	34	< 0,05	< 0,05	34	0	0	0

Прим.:— исследования не проводились.

Устойчивость к **диметоморфу** была дополнительно исследована у 240 изолятов *P. infestans*, выделенных в 1993–2003 г.г. из пораженных фитофторозом растений картофеля и томата в 12 регионах России. В опыты были включены изоляты с картофельных полей на о. Сахалин и в Костромской области, где применяли содержащий диметоморф препарат Акробат-МЦ. Исследования проводились совместно с М.К. Деревягиной и Б.Е. Козловским. Все исследованные изоляты были высокочувствительны к диметоморфу, показатель EC_{50} не превышал 0,2 мкг/мл (Деревягина и др. 1999, Еланский и др., 2007, 2012).

В целом, как показывают полученные результаты, популяции возбудителя фитофтороза состоят преимущественно из чувствительных к наиболее популярным фунгицидам штаммов, и устойчивость даже самых резистентных изолятов будет с успехом преодолена рекомендованной концентрацией фунгицида в рабочей жидкости. Исключение составляют только изоляты, устойчивые к металаксилу, контроль которых с помощью фениламидных фунгицидов в некоторых регионах может не принести желаемых результатов.

Отдельная работа по изучению мутаций устойчивости к диметоморфу была проведена совместно с С.Ф. Багировой и А. Цзян Ли. С помощью обработки суспензии цистоспор 0,005% раствором нитрозометилмочевины (НММ) были получены мутанты с повышенной устойчивостью к диметоморфу. Летальная концентрация мутантных штаммов выросла с 2 мкг/мл у дикого типа до 6 мкг/мл, показатель EC_{50} – с 0,3 мкг/мл до 2,0 мкг/мл. Полученные мутанты по морфологии колоний, структур мицелия и скорости роста на агаризованной среде не отличались от дикого типа. После повторной обработки раствором НММ были получены 4 мутантных изолята, способных расти на среде с концентрацией диметоморфа до 8 мкг/мл. Приобретение устойчивости у этих штаммов сопровождалось нарушением частоты ветвления гиф и редким образованием зооспорангиев неправильной формы (Bagirova et al., 2001).

Через два года культивирования на среде без добавления диметоморфа изоляты с одним мутантным локусом полностью утратили устойчивость. Летальная концентрация двух из четырех двойных мутантов, первоначально способных расти на концентрации 8 мкг/мл, понизилась до 4 мкг/мл, одного – до 3 мкг/мл, а еще один полностью утратил устойчивость. Изучение скорости роста на овсяном агаре без фунгицида показало, что утративший резистентность мутант не отличался по скорости роста от чувствительного дикого типа, а сохранившие устойчивость мутанты росли значительно медленнее дикого типа.

Таким образом, было показано, что устойчивость к диметоморфу является полигенной и аддитивной и не отличается стабильностью. Вероятно,

устойчивые изоляты отличаются низкой конкурентоспособностью и после снижения фунгицидного пресса исчезают из популяции.

Глава 8. Вирулентность к сортам картофеля и томата.

8.1. Картофельные расы.

В 1991-2003 г. гены вирулентности были исследованы у 750 изолятов. В определении генов вирулентности в разные годы участвовали И.Н. Козловская, Т.И. Сметанина, Е.В. Морозова, А.Н. Смирнов, С.А. Кузнецов, Ф.Х. Аманханова, С.Ф. Багирова.

Популяция *P. infestans* на территории России представлена, в основном, сложными расами, содержащими 5–10 генов вирулентности. В разных популяциях их содержание составляло от 50 до 70 %, и выше. Чаще встречались гены вирулентности 1-4, 7, 8, 10, 11; редко – 5, 6, 9. Самая сложная раса 1.2.3.4.5.6.7.8.9.10.11, включающая 11 генов, была идентифицирована в 7 областях РФ (Брянская, Тульская, Тамбовская, Ленинградская, Мурманская области, Мордовия и Сахалин), при этом в Тульской и Брянской областях ее содержание достигало 50–57 %, на Сахалине – 100 %. Относительно простые расы идентифицированы только в двух областях – в Ярославской (раса 3.4) и в Костромской (раса 4.10). Исследование, проведенное на Сахалине позднее (2003 г) показало снижение числа генов вирулентности на изолят. Это совпало и с повышением генотипического разнообразия: популяция в 2003 году уже не была моноклональной.

8.2. Вирулентность к сортам томата

Вирулентность к тестерным сортам томата Талалихин (Ph0, заражается штаммами *P. infestans* без генов вирулентности и с геном T1), и Оттава (Ph1, штаммами без гена T1 не заражаются) определена у 521 изолята *P. infestans*, выделенных из картофеля и томата в 1991-2003 годах. В разные годы в тестировании томатных рас участвовали А.Н. Смирнов, Т.И. Уланова и Т.А. Терешонкова. Доля штаммов с геном T1 (усредненные по годам данные) среди выделенных из томата изменялась в промежутке от 34 до 95%, среди выделенных из картофеля – от 0 до 30%. В популяциях, выделенных с картофеля в других регионах, доля штаммов расы T1 тоже сильно варьировала – от 0 до 97%. Очень высокая доля T1 (более 90%) отмечена среди изолятов из Тульской области и с о. Сахалин, причем эти популяции были наиболее агрессивны к картофелю.

Глава 9. Оценка агрессивности при реципрокных заражениях картофеля и томата в лабораторных условиях.

В задачи наших опытов входило изучение селекции патогенных свойств изолятов *P. infestans* в течение нескольких вегетативных генераций на листьях картофеля и томата. Работа проводилась совместно с О.И. Лавровой (Лаврова и др., 2003). Для опыта использовали монозооспоровые штаммы двух изолятов, выделенных из картофеля (раса Т0) и томата (Т1) в Тульской и Московской областях. Суспензией цистоспор обоих изолятов одинакового титра опрыскивали газоны из листьев картофеля (сорт Санте) и томата (сорт Талалихин). После инкубации с одного из листьев производили смыв зооспорангиев, получали зооспоры, которые опять распыляли на листья растения того же вида (с картофельных – на картофельный газон, с томатных – на томатный). После 4-х пассажей из очагов фитофтороза на листьях были выделены в чистую культуру изоляты *P. infestans*. Их характеристики не отличались от характеристик соответствующих исходных изолятов, что показывает отсутствие перезаражения в процессе пассажей.

Таблица 6.

Число пятен некрозов после опрыскивания листьев споровой суспензией.

Номера пересевов	Т0 из картофеля		Т1 из томата	
	на картофеле	на томате	на картофеле	на томате
I	75	120	150	92
II	200	213	254	235
III	308	155	265	280
IV	310	245	275	335

Из таблицы 6 видно, что раса Т0 из картофеля исходно (в 1-м пассаже) образовала больше пятен на листьях томата, чем на листьях картофеля, а раса Т1 из томата исходно образовала больше пятен на листьях картофеля, чем на листьях томата. Однако в дальнейшем все стало на свои места: скорость роста агрессивности была значительно более высокой на своем хозяине, нежели на чужом. После 4-х пассажей раса из картофеля стала более агрессивной для картофеля, чем для томата, а раса из томата – более агрессивной для томата, чем для картофеля. Изоляты, полученные в результате пассажей «томатного» изолята на листьях томата и «картофельного» на листьях картофеля по агрессивности и скорости роста на искусственной среде значительно превышали результаты пассажей «томатного» на листьях картофеля и «картофельного» на листьях томата.

Глава 10. Развитие *P. infestans* на диких *Lycopersicon hirsutum* в Московской области

В 2000 году M.D.Coffey передал нам семена диких высокорослых *Lycopersicon hirsutum* из Южной Америки (Перу), используемых в качестве доноров устойчивости при селекции томата на фитофтороустойчивость в США. Благодаря этому нам представилась возможность изучить поражаемость диких *Lycopersicon* российскими штаммами возбудителя фитофтороза и, с другой стороны, исследовать штаммы, отселектированные на *L. hirsutum* в полевых условиях, когда он выращивался среди посадок картофеля и томата. Пораженные фитофторозом образцы *L. hirsutum*, *L. esculentum* и *Solanum tuberosum* с экспериментального поля были исследованы на присутствие ооспор. В работе, проведенной совместно с Т.И. Улановой, использовали 8 линий диких *L. hirsutum*.

Тестируемые образцы диких пасленовых показали высокий уровень устойчивости к фитофторозу, который, однако, сопровождался сильным запаздыванием фаз развития по сравнению с культурными томатами. Выделенные с них изоляты *P. infestans* уступали по агрессивности (к картофелю) «томатным», но превосходили картофельные. По вирулентности к сортам картофеля и томата, а также по встречаемости ооспор в листьях, изоляты, выделенные с разных растений-хозяев, не имели существенных отличий.

Глава 11. Возможные механизмы изменчивости популяций *P. infestans*

Практически все изученные популяции возбудителя фитофтороза в Европейской части России отличались более или менее значительным разнообразием. В этом разделе разобраны механизмы (мутационный процесс, миграции, половая и парасексуальная рекомбинации, интрогрессии генов), которые могли оказать влияние на сложившееся распределение генотипов в Российских популяциях.

Глава 12. Особенности развития фитофтороза в России.

В данной главе рассматривается ситуация с развитием фитофтороза в России, влияние на развитие заболевания первичного инокулюма, сортов растений-хозяев и химических обработок на приусадебных огородах и на полях крупных производителей. Отмечено, что частные огороды являются глобальным «плавильным котлом», в котором в результате обмена генетическим материалом перерабатываются существующие генотипы и появляются абсолютно новые. При этом их селекция проходит в условиях, сильно отличающихся от создаваемых для картофеля в крупных хозяйствах:

отсутствие фунгицидного пресса, сортовой выравненности посадок, преобладание растений, пораженных разными формами вирусной и бактериальной инфекции, соседство с томатами и дикими пасленовыми, активное скрещивание и ооспорообразование, возможность для ооспор вызывать возобновление заболевания на следующий год. Все это приводит к очень высокому генотипическому разнообразию приусадебных популяций *P. infestans*. В условиях эпифитотии на огородах происходит быстрое распространение фитофтороза и выброс огромных количеств спор, перелетающих на близлежащие коммерческие посадки. Однако, попав на коммерческие поля с правильной системой агротехники и химзащиты, прилетевшие споры практически не имеют возможности к инициации тяжелой эпидемии на поле, что связано с отсутствием устойчивых к фунгицидам и специализированных к выращиваемому сорту клональных линий патогена.

Глава 13. Видовой состав возбудителей альтернариоза картофеля и томата.

Для идентификации видового состава по структуре отдельных участков генома были взяты образцы ДНК 7 крупноспоровых и 25 мелкоспоровых штаммов, выделенные из картофеля и томата в разных регионах России. Для сравнительного изучения была отобрана последовательность ядерной рДНК, ограниченная праймерами ITS5 и ITS4 (рис. 2). Этот участок исследован у многих видов живых организмов и широко используется для анализа таксономических взаимоотношений.

В результате работы были определены нуклеотидные последовательности исследуемого участка (ITS5–ITS4) длиной 595 пн для мелкоспоровых, 605 пн для *A. solani* и 627 пн для *A. infectoria*.

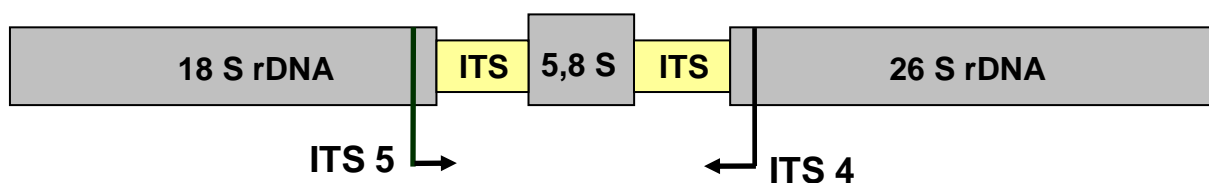


Рис. 2. Взаиморасположение генов и межгенных последовательностей участка ядерной рДНК и локализация внутри него праймеров ITS5 и ITS4 (табл. 1).

Исследуемые штаммы распределились на 3 группы (рис. 3).

В первую группу вошли представители всех исследованных мелкоспоровых изолятов, за исключением *A. infectoria*, включая типовые штаммы *A. arborescens* и *A. tenuissima* (их последовательности взяты из банка генов, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Вторая группа содержала все исследованные крупноспоровые изоляты, включая взятые из банка генов последовательности типовых штаммов *A. tomatophila* и *A. solani*. Однако штамм *A. tomatophila* заметно отличался от других штаммов своей группы. По-видимому, исследованные крупноспоровые штаммы, выделенные с томата, являются не *A. tomatophila*, а *A. solani* (что подтверждается и результатами морфологической диагностики), хотя это и противоречит мнению Симмонса (Simmons, 2007), утверждающего отсутствие вида *A. solani* на томате. Небольшие отличия имели штаммы *A. solani*, выделенные с картофеля и томата на Дальнем Востоке.

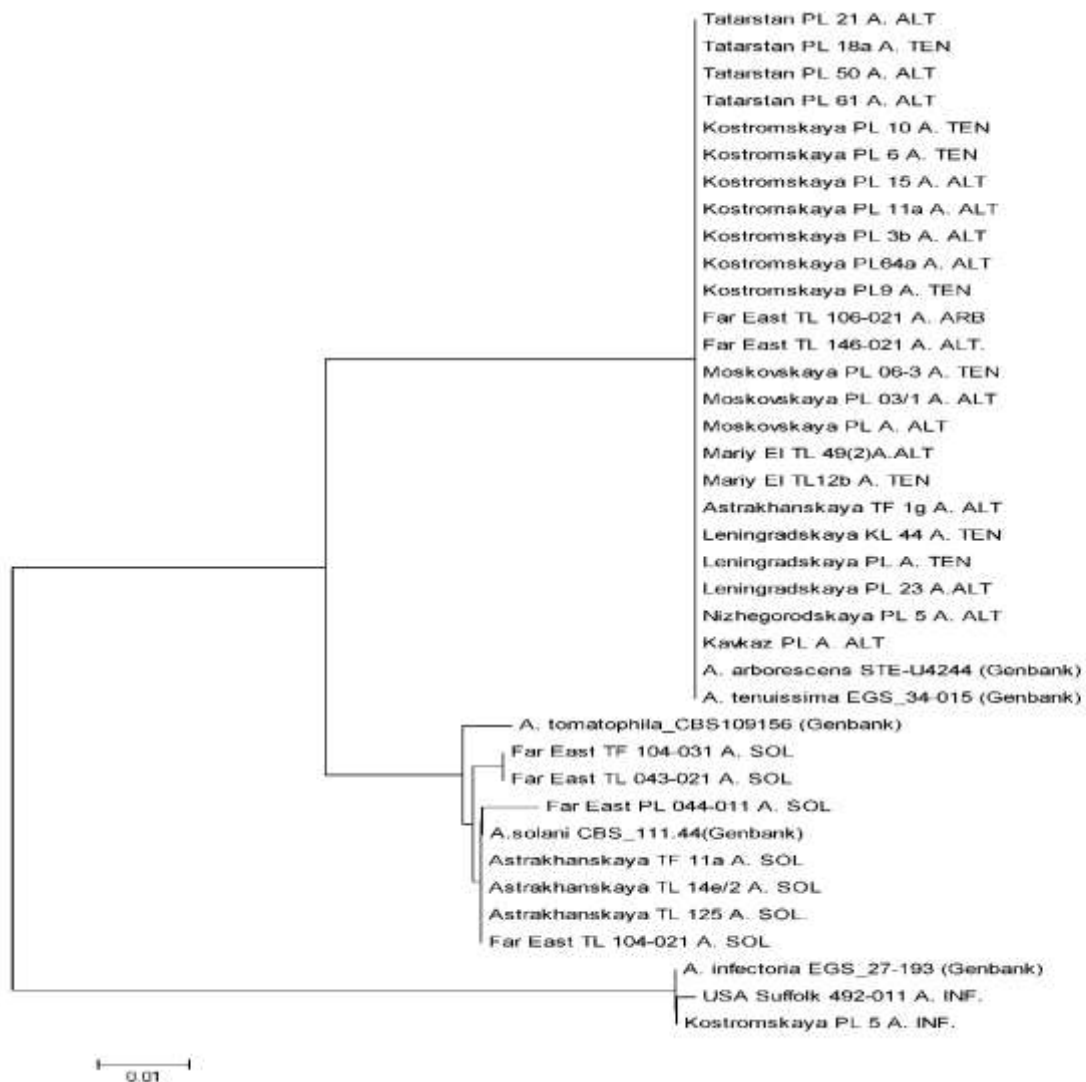


Рис. 3. Дендрограмма, построенная с помощью метода максимального правдоподобия по структуре участка ITS5-ITS4.

Обозначения: Видовая принадлежность по результатам морфологического изучения: A.ALT – *A. alternata*, A.TEN. – *A. tenuissima*, A.ARB – *A. arborescens*, A.SOL – *A. solani*, A.INF – *A. infectoria*. Органы растений, с которых проводилось выделение: PL – листья картофеля, TL – листья томата, TF – плоды томата.

В третью группу попали изолят *A. infectoria*, выделенный в Костромской области, типовой изолят из США, переданный сотрудниками лаборатории микологии и фитопатологии ВНИИ защиты растений, а также последовательность типового штамма из банка генов.

Видовая принадлежность используемых в работе изолятов была определена также и по морфологическим признакам. В результате проведенной работы были выявлены штаммы четырех мелкоспоровых видов: *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* и *A. infectoria*, и одного крупноспорового – *A. solani*. При исследовании последовательностей ДНК *A. solani* и *A. infectoria* попали в соответствующие отдельные группы. Морфологические виды *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* различий по структуре генома не имели, в результате чего все они попали в одну группу вместе с типовыми *A. arborescens* и *A. tenuissima*.

Сравнение штаммов проводили и по структуре последовательностей ДНК большой субъединицы митохондриальных рибосомальных генов (mtLSU). Дендрограмма, построенная по полученным данным, также позволила разделить проанализированные изоляты на две группы: первая группа – мелкоспоровые штаммы, включая *A. infectoria*; вторая группа – *A. solani*. Внутри групп штаммы были практически идентичны.

Таким образом, анализ отдельных участков генома *Alternaria* показал разделение исследуемых штаммов на три клады: *A. solani*, *A. infectoria* и мелкоспоровые. Объединение мелкоспоровых штаммов в одну кладу и их отличие от *A. infectoria* совпадает с результатами исследований, проведенных на других растениях-хозяевах (Pryor and Lichailides, 2002, Hoog and Horre, 2002).

Глава 14. Устойчивость возбудителей альтернариоза к фунгицидам

В работе изучены изоляты возбудителей альтернариоза картофеля и томата, выделенные в 2007–2010 годах в Ленинградской, Московской, Астраханской, Костромской, Смоленской областях, в Марий Эл и Татарстане. Всего было исследовано 285 изолятов.

Исследование устойчивости изолятов (табл. 7, 8) показало, что они наиболее чувствительны к фунгицидам флуазинам и дифеноконазол (показатель ЕС₅₀ менее 1 мкг/мл). Несколько менее эффективным оказался флудиоксонил (ЕС₅₀ не более 10 мкг/мл). Достаточно эффективным фунгицидом показал себя манкоцеб, устойчивость к которому варьировала для разных изолятов в пределах 6,7–604 мкг/мл. При этом уровни устойчивости к манкоцебу существенно различались для мелкоспоровых видов и *A. solani*. Согласно данным, представленным в таблицах 9 и 10, среднее значение ЕС₅₀ для мелкоспоровых видов равнялось 128,4 мкг/мл, в то время как для *A. solani* – 15,5

мкг/мл. Статистическая достоверность отличий подтверждается Т-тестом при уровне значимости 0,01 ($p=2,35 \times 10^{-6}$). Различия в эффективности воздействия других фунгицидов (кроме манкоцеба) на *A. solani* и мелкоспоровые виды были статистически недостоверны.

Таблица 7.

Устойчивость мелкоспоровых изолятов *Alternaria* к фунгицидам

Регион сбора образцов	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность ЕС ₅₀ , мкг/мл	Среднее ЕС ₅₀ , мкг/мл	Число штаммов с различными ЕС ₅₀ , мкг/мл				
				< 1	1–10	10–100	100–1000	> 1000
Манкоцеб								
Костромская	24	7,1 – 237,0	71,1	0	3	18	3	0
Марий Эл	35	7,3 – 604	80,4	0	4	27	4	0
Астраханская	43	6,7 – 596,2	145,4	0	3	24	16	0
Ленинградская	21	29,6 – 421,6	152,3	0	1	11	9	0
Татарстан	20	9,6 – 588,8	193,0	0	2	8	10	0
Все регионы	143	6,7 – 604	128,4	0	13	88	42	0
Азоксистробин								
Костромская	21	8 – 4600	1057,8	0	7	3	3	8
Марий Эл	24	9,3 – 2800	747,4	0	2	8	8	6
Астраханская	32	8,7 – 6175	1072,7	0	0	13	8	11
Ленинградская	17	7,9 – 2800	1106,4	0	2	4	5	6
Татарстан	18	9,5 – 2500	867,6	0	3	3	5	7
Все регионы	112	7,9 – 6175	970,4	0	14	31	29	38
Флудиоксонил								
Костромская	19	0,1 – 4,2	0,86	15	4	0	0	0
Марий Эл	18	0,5 – 1,3	0,7	16	2	0	0	0
Астраханская	28	0,5 – 45,3	2,3	26	1	1	0	0
Ленинградская	17	0,5 – 1,5	0,7	14	3	0	0	0
Татарстан	19	0,5 – 5,3	1,3	15	4	0	0	0
Все регионы	101	0,5 – 45,3	1,2	86	14	1	0	0
Хлороталонил								
Костромская	12	64 – 1900	864,8	0	0	2	6	4
Марий Эл	11	9,4 – 2050	632,8	0	2	3	3	3
Астраханская	12	9,7 – 2200	634,9	0	2	3	3	4
Ленинградская	11	25 – 1450	611,5	0	1	3	5	2
Татарстан	14	8,5 – 1250	396,9	0	2	5	5	2
Все регионы	60	6,4 – 2050	628,2	0	7	16	22	15
Дифеноконазол								
Все регионы	45	0,05 – 0,2	0,08	45	0	0	0	0
Флуазинам								
Все регионы	49	0,51 – 0,78	0,62	49	0	0	0	0

Выявленное отличие в уровнях устойчивости к манкоцебу имеет важное практическое значение, т.к. этот фунгицид является самым популярным в России и входит в состав многих смесевых препаратов. Возможно, именно применение содержащих манкоцеб препаратов привело к наблюдающемуся в настоящее время практически повсеместному преобладанию мелкоспоровых видов на картофеле и томате.

Слабым фунгицидным эффектом по отношению как к мелкоспоровым видам, так и к *A. solani*, отличались хлороталонил и азоксистробин. Среди всех исследованных видов из разных региональных популяций (за исключением *A. solani* из Марий Эл) были выявлены изоляты с EC_{50} более 1000 мкг/мл.

Таблица 8.

Устойчивость изолятов *A. solani* к фунгицидам

Регион сбора образцов	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность EC_{50} , мкг/мл	Среднее EC_{50} , мкг/мл	Число штаммов с различными EC_{50} , мкг/мл				
				< 1	1–10	10–100	100–1000	> 1000
Манкоцеб								
Марий Эл	16	6,9 – 20,1	8,7	0	15	1	0	0
Астраханская	14	5,9 – 85,3	28,9	0	5	9	0	0
Приморский край	9	6,7 – 9,2	7,5	0	9	0	0	0
Все регионы	39	5,9 – 85,3	15,5	0	29	10	0	0
Азоксистробин								
Марий Эл	10	6,4 – 700	103,2	0	3	6	1	0
Астраханская	10	5,5 – 3812	1075,4	0	2	3	1	4
Приморский край	9	8,2 – 2350	530,2	0	1	5	1	2
Все регионы	29	5,5 – 3812	562	0	6	14	3	6
Флудиоксонил								
Марий Эл	10	0,6 – 4,1	1,5	7	3	0	0	0
Астраханская	11	0,6 – 7	1,7	9	2	0	0	0
Приморский край	9	0,54 – 0,7	0,6	9	0	0	0	0
Все регионы	30	0,54 – 7	1,26	25	5	0	0	0
Дифеноконазол								
Все регионы	23	0,05 – 0,42	0,09	23	0	0	0	0
Хлороталонил								
Все регионы	17	5,8 – 1440	486,8	0	5	4	5	3
Флуазинам								
Все регионы	19	0,51 – 0,63	0,54	19	0	0	0	0

Азоксистробин, по оценке коллектива экспертов (Bradshaw, 2007), признан одним из лучших фунгицидов против альтернариоза. Однако при лабораторной

оценке он показал крайне низкую фунгицидную активность в отношении всех исследованных видов возбудителей альтернариоза картофеля и томата. Чем же может быть вызвано подобное несоответствие?

Мутации устойчивости к стробилуриновым фунгицидам хорошо известны и описаны в литературе (Bartlett et al., 2002, Pashe et al., 2005, Grasso et al., 2006, Peters et al, 2008, Ishii, 2009). В Европе и США выявлена мутация G143A гена цитохрома *b*, вызывающая устойчивость мелкоспоровых *Alternaria*. Генотипически она проявляется в виде однонуклеотидной замены (G у дикого штамма и C – у мутанта) в последовательности гена цитохрома *b*.

Проведенные нами эксперименты по аллель-специфичной ПЦР-идентификации этой мутации показали её отсутствие у 33 исследованных изолятов с разными уровнями устойчивости к азоксистробину, выделенными из пораженных образцов картофеля и томата в разных регионах России. Определение последовательности нуклеотидов гена цитохрома *b* (секвенирование) было проведено у 6 изолятов мелкоспоровых видов из Костромской, Астраханской, Ленинградской областей, Марий Эл и Татарстана. Показатель устойчивости EC₅₀ у этих штаммов варьировал от 10 до 6170 мкг/мл. Однако ни в одном случае мутации G143A выявлено не было. По-видимому, устойчивость российских штаммов обусловлена другими механизмами.

С другой стороны, устойчивость мицелия к азоксистробину может и не быть решающим фактором эффективного воздействия на патогена при полевом применении. Возможно, азоксистробин более эффективно воздействует на прорастающие конидии возбудителей, а не непосредственно на рост мицелия. Для проверки этого предположения мы (совместно с П.Н. Плуталовым) изучили прорастаемость конидий и ветвление ростковых гиф 39 изолятов разных видов мелкоспоровых возбудителей альтернариоза и 5 изолятов *A. solani* при разных концентрациях азоксистробина (табл. 9 и 10).

Таблица 9.

Прорастаемость конидий разных видов рода *Alternaria* при разных концентрациях азоксистробина.

Вид	Доля проросших конидий при разных концентрациях азоксистробина, %		
	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Мелкоспоровые виды	41/80*	27/66	21/63
<i>A. solani</i>	53/58	32/41	21/43

Прим.:* – данные приведены в виде x/y, где: x – процент проросших конидий относительно бесфунгицидного контроля через 5 часов инкубации, y – через 20 часов инкубации в темноте при 25°C.

В таблице 10 представлена доля ветвящихся ростковых гиф среди всех проросших конидий при учёте через 20 часов после нанесения суспензии конидий на среду. В присутствии азоксистробина интенсивность ветвления молодых гиф падала.

В присутствии азоксистробина прорастание конидий не было подавлено полностью, но было замедлено. Доля проросших конидий на среде с фунгицидом, измеренная через 20 часов, была в 2-3 раза выше, чем измеренная через 4 часа. Следует также отметить, что конидия считалась проросшей, если длина ростковых гиф превышала длину самой конидии. Через 20 часов экспозиции наблюдалась значительная доля конидий с меньшими проростками. Возможно, через некоторое время эти конидии тоже можно будет считать проросшими. Учета через 36 часов инкубации провести не удалось, т.к. гифы достигли значительной длины, переплелись между собой и затруднили просмотр.

Таблица 10.

Доля ветвящихся ростковых гиф разных видов рода *Alternaria* на среде с разными концентрациями азоксистробина

Вид	Доля ветвящихся ростковых гиф при разных концентрациях азоксистробина, %			
	0 мкг/мл	1 мкг/мл	10 мкг/мл	100 мкг/мл
Мелкоспоровые виды	45,3*	5,5	3,2	0,6
<i>A. solani</i>	45	3	0	0

Прим.:* – в таблице приведена доля (в %) ветвящихся ростковых гиф относительно общего числа проросших конидий через 20 часов инкубации в темноте при 25°C.

Защитные мероприятия могут быть эффективны только в том случае, если концентрация фунгицида в рабочей жидкости в несколько раз превосходит максимальные выявленные показатели устойчивости штаммов. Рекомендованная концентрация фунгицида в рабочей жидкости более чем в 100 раз превосходит максимальный выявленный показатель ЕС₅₀ для флуазинама, дифеноконазола и флудиоксонала и в 2-8 раз – для манкоцеба. Такая концентрация позволит успешно контролировать развитие альтернариоза с помощью этих препаратов. Концентрация хлороталонила в рабочей жидкости примерно равна максимально выявленному ЕС₅₀. В этом случае при использовании фунгицида для обработок во время вегетации устойчивые штаммы могут сохранить жизнеспособность и развиваться на растении даже после контакта с препаратом. Концентрация азоксистробина в рабочей

жидкости в 24–35 раз ниже, чем выявленный показатель EC_{50} наиболее устойчивых изолятов. Это будет препятствовать лечебному действию азоксистробина, но защитная активность может сохраниться за счет фунгистатического действия.

Глава 15. Разработка праймеров, позволяющих дифференцировать разные виды рода *Alternaria*.

Разделение групп мелко- и крупноспорных видов имеет высокую практическую значимость, т.к. виды из этих групп имеют разную устойчивость к фунгицидам (Побединская и др., 2011, Капса, 2008), вирулентность к сортам растений, разные температурные оптимумы роста (Иванюк и др., 2005).

Обнаруженные различия в секвенированных последовательностях ядерных рибосомных генов (ITS5–ITS4) (см. главу 13) позволили нам подобрать специфичные праймеры для избирательной амплификации участков генома мелкоспорных *Alternaria*, *A. solani* и *A. infectoria* (табл. 11, рис. 4).

Таблица 11.

Последовательности диагностических ПЦР-праймеров.

Название праймеров	Нуклеотидная последовательность
Прямой праймер (ITS5)	5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG
Обратный праймер для мелкоспорных (MR)	5' – GACCTTTGCTGATAGAGAGTG
Обратный для крупноспорных (SR)	5' – CTTGGGGCTGGAAGAGAGCGC
Обратный праймер для <i>A. infectoria</i> (Inf.Obr.)	5' – GACACCCCCCGCTGGGGCACTGC
Прямой праймер для <i>A. infectoria</i> (Inf.Pr)	5' – GGTTGGTCCTGAGGGCGGGCGA

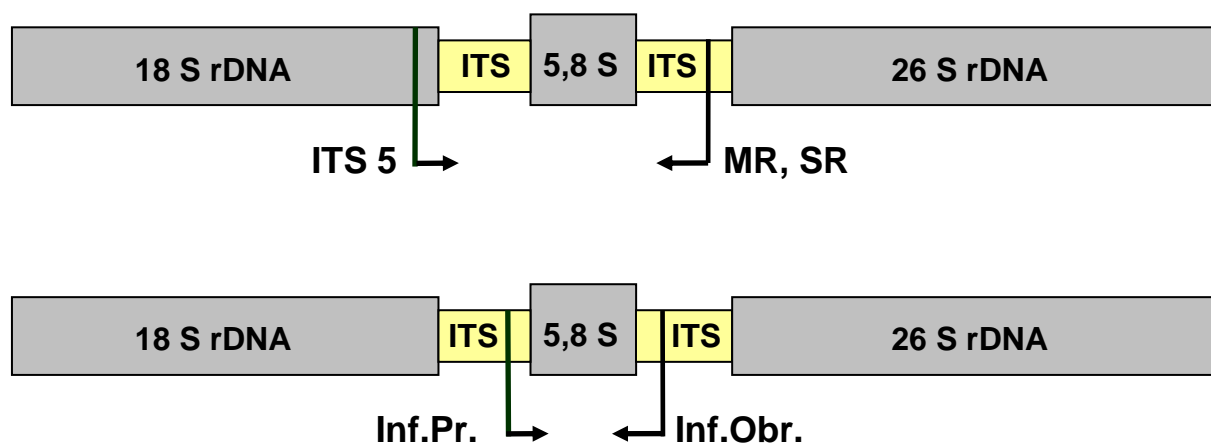


Рис. 4. Места посадки праймеров для амплификации *A. solani* (ITS5–SR), мелкоспорных видов (ITS 5 – MR) и *A. infectoria* (Inf.Pr – Inf.Obr).

После амплификации с подобранными парами праймеров *A. solani*, мелкоспоровым штаммам и *A. infectoria* соответствовали фрагменты длиной 505, 516 и 123 пн соответственно.

При практическом использовании метода наибольшие трудности вызывает выделение изолятов в чистую культуру. Провести выделение сразу после сбора образцов, как правило, невозможно. В практике часто используют засушивание собранных образцов после сбора, транспортировку в лабораторию, помещение во влажные камеры и последующее выделение изолятов в чистую культуру. Однако при подобном методе выделения высока вероятность контаминации вторичной микобиотой, в т.ч. и мелкоспоровыми видами *Alternaria*.

В нашей работе была предпринята попытка диагностики видового состава в образцах листьев, фиксированных сразу после сбора в 70% растворе этилового спирта. ДНК выделяли из целой листовой пластинки с несколькими некрозами.

Исследование образцов пораженных альтернариозом листьев картофеля из Московской и Костромской областей, а также из Монголии (всего исследовано 70 образцов) показало присутствие во всех исследованных регионах штаммов *A. solani*, *A. infectoria* и мелкоспоровых (табл. 12). Данные, полученные с помощью ПЦР-диагностики законсервированных в спирте образцов, отличались от результатов морфологической диагностики выделенных в чистую культуру штаммов. Во всех трех регионах в чистую культуру выделялись только мелкоспоровые изоляты, лишь в Костромской области был изолирован единственный штамм *A. infectoria*.

Таблица 12.

Идентификации видов в законсервированных образцах с помощью ПЦР.

Виды	Количество образцов, содержащих видоспецифичные участки ДНК		
	Московская обл	Костромская обл	Монголия
Только <i>A. solani</i>	15	2	1
Только мелкоспоровые	12	10	2
Только <i>A. infectoria</i>	4	3	1
<i>A. solani</i> + <i>A. infectoria</i>	2	2	-
<i>A. solani</i> + мелкоспоровые	6	1	1
Мелкоспоровые + <i>A. infectoria</i>	2	2	-
Все 3 группы	3	1	-
Всего образцов исследовано	44	21	5

Подобранные праймеры могут быть использованы для специфичной амплификации видов *Alternaria* и способствовать успешному определению

данных видов в случаях, когда их идентификация по морфологическим признакам вызывает затруднения.

Заключение

Проведенные исследования вывели Россию в ряд стран с наиболее исследованными популяциями *P. infestans*. На территории России выявлены самые разные типы популяций – от моно- и поликлональных до панмиксных. В большинстве популяций наблюдается высокое генотипическое разнообразие, присутствуют штаммы обоих типов спаривания, различающиеся по устойчивости к фунгицидам, в пораженных образцах часто образуются ооспоры. Высокое генотипическое разнообразие позволяет нам не опасаться завоза из-за рубежа особо опасных клональных линий, поскольку их генотипы будут вовлечены в половой процесс и переработаны на менее опасные комбинации генов. Половой процесс и образование ооспор идут, преимущественно, на участках без интенсивного применения фунгицидов, с плохой агротехникой, высоким разнообразием сортов и со слабым контролем семенного материала. В России такие условия создаются на частных огородах, где выращивается основная часть картофеля. Таким образом, частные огороды играют буферную роль, не позволяя массово развиваться высокоагрессивным и устойчивым к фунгицидам штаммам.

Длительный период исследований показал изменения, произошедшие в популяциях *P. infestans*. Прежде всего, это касается особенностей развития популяций на разных растениях-хозяевах: картофеле и томате. Если в конце 1980-х годов инициатором заражения томата всегда выступал картофель, то в последние годы стали нередки случаи, когда наоборот, пораженная рассада томата заражала картофель. Эпифитотии стали начинаться раньше, в посадках картофеля увеличилась доля расы T1, повысилось разнообразие популяций. Самые агрессивные популяции на картофеле состояли исключительно из штаммов расы T1, причем штаммы были одинаково агрессивны и к картофелю, и к томату. Штаммы, выделенные из томата, перестали отличаться от штаммов из картофеля по вирулентности и агрессивности к обоим растениям-хозяевам.

Изменения эти связаны, вероятно, с появлением в популяциях *P. infestans* штаммов разных типов спаривания, половым процессом, повышением роли ооспор как источника первичного инокулюма. В целом, по-видимому, произошла конвергенция популяций – возникновение единой популяции на двух растениях-хозяевах с одинаково высокой агрессивностью к обоим видам.

Изучение видового состава возбудителей альтернариоза показало, что и на картофеле, и на томате заболевание чаще вызывается мелкоспоровыми видами. Это указывает на изменения в популяциях возбудителей альтернариоза, т.к. в

1960-70-х годах многими авторами было показано преобладание *A. solani*, а мелкоспоровые виды встречались, преимущественно, как вторичная инфекция. Повышение роли мелкоспоровых видов связано, возможно, с повсеместным применением фунгицида манкоцеб, обладающего значительно более высокой эффективностью против *A. solani*, а также с массовым возделыванием восприимчивых к альтернариозу сортов.

В ближайшем будущем следует, видимо, ожидать дальнейшего роста агрессивности мелкоспоровых видов по отношению к возделываемым сортам картофеля и томата, появления устойчивых к фунгицидам штаммов. Существенную роль в этом может сыграть завоз штаммов из Европы вместе с партиями семенного и продовольственного картофеля.

Роль полового процесса у возбудителей альтернариоза до сих пор не ясна, поэтому судьба завозных генотипов не очень понятна. По-видимому, они продолжают существовать в виде клональных линий, которые будут претерпевать изменения и приспосабливаться к выращиваемым сортам и используемым фунгицидам благодаря мутациям и парасексуальному процессу.

Исследования популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза необходимо продолжать, т.к. только постоянный мониторинг популяционной структуры может помочь в разработке оптимальных способов борьбы с этими заболеваниями.

Выводы.

1. На территории Европейской части России преобладают популяции *P. infestans* с высоким генотипическим разнообразием, в Сибири и на Дальнем Востоке – моно- или биклональные.

2. Широко распространенная в прошлом клональная линия US-1 к середине 90-х годов 20 века полностью исчезла из российских популяций. Последний раз штаммы линии US-1 были выявлены в 1993 году на листьях томата в Московской области.

3. Присутствие в популяциях штаммов с разными типами спаривания и ооспор в пораженных фитофторозом растительных образцах свидетельствует в пользу прохождения полового процесса в популяциях. Отмечаемое практически повсеместно в Европейской части России высокое генотипическое разнообразие популяций может объясняться гибридизацией при половом процессе.

4. Практически все исследованные в работе штаммы имели близкое к максимальному число генов вирулентности к сортам картофеля. В конце 90-х годов 20 века отмечено резкое возрастание агрессивности и вирулентности штаммов, выделенных из томата, что, возможно, обусловлено повышением роли ооспор как источника первичной инфекции томата.

5. Исследованные изоляты *P. infestans* с картофеля и томата из разных регионов России и Беларуси чувствительны к большинству применяемых против них фунгицидов, из которых наиболее эффективны азоксистробин и диметоморф.

6. В Московской, Смоленской, Тульской областях, в Сибири и на Дальнем Востоке выявлены штаммы с высокой устойчивостью к металаксилу. Изоляты со средним уровнем устойчивости были обнаружены в большинстве популяций Европейской части России и Беларуси.

7. Исследование возбудителей альтернариоза показало присутствие в пораженных листьях картофеля и томата видов *A. solani*, *A. infectoria* и комплекса мелкоспоровых видов. Мелкоспоровые виды, выделяемые по результатам морфологического анализа (*A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens*), по структуре исследованных участков генома не разделяются.

8. На основании полученных данных по строению участков генома *A. solani*, *A. infectoria* и комплекса мелкоспоровых видов были созданы наборы для их диагностики с помощью ПЦР. ПЦР-идентификация показала, что заражение листовых пластинок может быть вызвано разными видами, которые могут присутствовать одновременно в одном простом листе. Морфологических различий в симптомах поражения разными видами не обнаружено.

9. Оценка устойчивости изолятов рода *Alternaria*, выделенных с картофеля и томата, к фунгицидам, показала, что наиболее эффективны были дифеноконазол и флудиоксонил. Хороший фунгицидный эффект был также отмечен у манкоцеба и флуазинама, причем манкоцеб действовал значительно лучше в отношении *A. solani*, чем мелкоспоровых видов. Слабой эффективностью отличались азоксистробин и хлороталонил.

10. Мутации G143A, обуславливающей устойчивость мелкоспоровых видов *Alternaria* к азоксистробину в странах Европы и в США, у российских мелкоспоровых устойчивых изолятов не выявлено.

Список публикаций автора по теме диссертации.

Публикации в журналах из перечня ВАК

1. Смирнов А.Н., Еланский С.Н., Долгова А.В. Ооспоры *Phytophthora infestans* в плодах томатов в Московской области//Защита и карантин растений. – 1998. –№5. – С. 41.

2. Еланский С.Н., Лекомцева С.Н. Встречаемость спор грибов различных систематических групп в приземном слое атмосферы средних широт России// Микология и фитопатология. – 1998. – Т.32. – В.1. – С. 37-43.

3. **Еланский С.Н.**, Рыжкин Д.В. Концентрация спор грибов в атмосфере Москвы в связи с метеопараметрами // Микология и фитопатология. – 1999. – Т.33. – В.3. – С. 188-192.
4. Деревягина М.К., **Еланский С.Н.**, Дьяков Ю.Т. Резистентность *Phytophthora infestans* к фунгициду диметоморфу// Микология и фитопатология. – 1999. –Т.33. – В.3. – С. 208-213.
5. **Еланский С.Н.**, Долгова А.В., Смирнов А.Н., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. 1. Системы размножения. //Микология и фитопатология. – 1999. – Т.33. – В.5. – С. 346-352.
6. **Еланский С.Н.**, Багирова С.Ф., Смирнов А.Н., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. 2. Сравнение популяций, паразитирующих на картофеле и томатах// Микология и фитопатология. – 1999. – Т.33. – В.5. – С. 353-359.
7. Смирнов А.Н., **Еланский С.Н.** Образование ооспор в полевых популяциях *Phytophthora infestans* в Московской области // Микология и фитопатология. – 1999. – Т.33. – В.6. – С. 421-425.
8. Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., **Еланский С.Н.** Изучение биологии возбудителя фитофтороза картофеля// Доклады ТСХА. – 2001. – В.273. – Ч.1. – С. 226-232.
9. Апрышко В.П., Лихачев А.Н., **Еланский С.Н.** Биология и культурально-морфологические признаки российских штаммов *Stachybotrys chartarum*//Доклады ТСХА. – 2001. – В. 273. – Ч.1. – С. 215-221.
10. **Еланский С.Н.**, Петрунина Я.В., Лаврова О.И., Лихачев А.Н. Сравнительный анализ российских штаммов *Stachybotrys chartarum*// Микробиология. – 2004. – Т.73. – В.1. – С. 73-79.
11. Аманханова 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// Микология и фитопатология. – 2004. – Т.38. – В.3. – С. 71-78.
12. **Еланский С.Н.**, Апрышко В.П., Милютин Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к фунгицидам металаксил и диметоморф// Вестник московского университета. Серия 16. Биология. – 2007. – №1. – С. 14-18.
13. **Еланский С.Н.**, Милютин Д.И. Гетероплазмоз у *Phytophthora infestans* //Генетика. – 2007. – Т. 43. – №3. – С. 333-336.
14. С. А. Шеин, Д. И. Милютин, И. Н. Козловская, Е. В. Морозова, М. А. Побединская, **С. Н. Еланский**. Генотипическое разнообразие *Phytophthora infestans* в республике Марий Эл// Микология и фитопатология. – 2009. – Т.43. – В.4. – С. 358-363.

15. **Еланский С.Н.**, Побединская М.А., Романова С.С., Александрова А.В., Пляхневич М.П. Устойчивость возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата к некоторым фунгицидам // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2010. – №1. – С. 234-235.

16. **С.Н. Еланский**, М.А. Побединская, Е.Д. Мыца, М.П. Пляхневич Устойчивость возбудителя фитофтороза картофеля и томата к фунгицидам// Микология и фитопатология. – 2012. – Т.46. – В.5. – С. 340-344.

17. М.А. Побединская, П.Н. Плуталов, С.С. Романова, Л.Ю. Кокаева, А.В. Николаев, А.В. Александрова, **С.Н. Еланский** Устойчивость возбудителей альтернариоза картофеля и томата к фунгицидам// Микология и фитопатология. – 2012. – Т.46. – В.6. – С. 401-408.

18. **S. Elansky**, A. Smirnov, Y. Dyakov, A. Dolgova, A. Filippov, B. Kozlovsky, I. Kozlovskaya, P. Russo, C. Smart, W. Fry Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East//J. Phytopathology. – 2001. – V. 149 (10). – P. 605-611.

Патенты

19. Шевелев С.А., Дутов М.Д., Попков С.В., **Еланский С.Н.**, Кокуркина Г.В., Побединская М.А. Замещенные 2-фенилиндолы, способ их получения и фунгицидные композиции на их основе// Патент РФ № 2440339. 2012 г.

Методические указания

20. Г.Г. Онищенко, М.П. Кирпичников, К.Г. Скрыбин, В.А. Тутельян, **С.Н. Еланский** и др. Порядок биологической оценки действия наноматериалов на растения по морфологическим признакам: Методические указания. // М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора. – 2012. – 39 с.

Соавторство в монографиях

21. Пшеченков К.А., Зейрук В.Н., **Еланский С.Н.**, Мальцев С.В. Технологии хранения картофеля // М.: Картофелевод, 2007. – 192 с.

22. Б. В. Анисимов, Г. Л. Белов, Ю. А. Варицев, **С. Н. Еланский**, Г. К. Журомский, С. К. Завриев, В. Н. Зейрук, В. Г. Иванюк, М. А. Кузнецова, М. П. Пляхневич, К. А. Пшеченков, Е. А. Симаков, Н. П. Склярова, З. Сташевски, А. И. Усков, И. М. Яшина. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. // М.: Картофелевод, 2009. – 272 с.

23. N.F. Elansky, I.V. Belikov, C.A.M. Brenninkmeijer, P.J. Crutzen, **S.N. Elansky**, et al. Atmospheric composition observations over Northern Eurasia using the mobile laboratory. TROICA experiments// М.:Agrospas, 2009.– 72p.

Статьи в других периодических изданиях и сборниках

24. Рыжкин Д.В., **Еланский С.Н.**, Желтикова Т.М. Мониторинг концентрации спор грибов *Cladosporium* и *Alternaria* в атмосферном воздухе г. Москвы//Атмосфера. Пульманология и аллергология. – 2002. – №2. – С.30-31.
25. **Еланский С.Н.**, Рыжкин Д.В. Распределение основных групп грибных спор в приземном воздухе Москвы. 1999 г.// Летопись погоды, климата и экологии Москвы. М.: Издательство МГУ, 2000. – В.1. – С. 65-67.
26. **Еланский С.Н.**, Рыжкин Д.В. Распределение основных групп грибных спор в приземном воздухе Москвы. 2000 г.//Летопись климата, погоды и экологии Москвы, Вып. 2. М.: Издательство МГУ, 2002. – В.2. – С. 86-89.
27. Лаврова О.И., **С.Н. Еланский**, Ю.Т. Дьяков Селекция штаммов *Phytophthora infestans* в бесполой генерации// Журнал российского фитопатологического общества. – 2003. – Т.4. – С. 1-7.
28. Уланова Т.И., **Еланский С.Н.**, Филиппов А.В., Козловский Б.Е., Дьяков Ю.Т., Апрышко В.П., Смирнов А.Н., Коффей М.Д. Устойчивость к фитофторозу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum*// Журнал Российского фитопатологического общества. – 2003. – Т.4. – С. 9-15.
29. Лаврова О.И., **С.Н. Еланский** Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и оценка возможности их применения для сравнительного анализа штаммов// Журнал Российского фитопатологического общества. – 2004. – Т.4. – С. 39-45.
30. Дьяков Ю.Т., **Еланский С.Н.** Популяционная генетика *Phytophthora infestans*. В кн.: Микология сегодня. Т.1. / Под ред. Дьякова Ю.Т., Сергеева Ю.В. М.: Национальная академия микологии, 2007. – С. 107-139.
31. Кокаева Л.Ю., Кокаева З.Г., Березов Ю.И., **Еланский С.Н.** Молекулярно – генетические подходы к исследованию фитопатогенного оомицета *Phytophthora infestans* // Защита картофеля. – 2011. – В. 2(3). – С. 2-9.
32. **С.Н. Еланский**, М.А. Побединская, П.Н. Плуталов, С.С. Романова, Л.Ю. Кокаева, А.В. Александрова. Устойчивость российских штаммов возбудителей альтернариоза картофеля и томата к азоксиistrobinу// Защита картофеля. – 2011. – В. 2(3). – С. 14-19.
33. Зейрук В. М., Пшеченков К. А., **Еланский С. Н.**, Давыденкова О. Н., Мальцев С. В. Пути повышения качества свежего столового картофеля и картофелепродуктов в Центральном регионе России. // Картофелеводство. – 2007. – Т.13. – С. 197-205.
34. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Склярова Н.П., Яшина И.М., **Еланский С.Н.** Сорта картофеля, возделываемые в России. Каталог 2005 г.// М.: Картофелевод, 2005. – 112 с.

35. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., **Еланский С.Н.** Сорты картофеля, возделываемые в России. Каталог 2007 г.// М.: Картофелевод. 2007. – 80 с.
36. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., **Еланский С.Н.** Сорты картофеля, возделываемые в России. Каталог 2008 г.// М.: Картофелевод. 2008. – 88 с.
37. Симаков Е.А., Анисимов Б.В., Склярова Н.П., Яшина И.М., Еланский С.Н. Сорты картофеля, возделываемые в России. Каталог 2009 г.// М.: Агроспас, 2009. – 92 с.
38. **С.Н. Еланский**, М.А. Побединская П.Н. Плуталов, С.С. Романова, А.В. Николаев, Л.Ю. Кокаева, А.В. Александрова. Устойчивость возбудителей альтернариоза картофеля и томата к азоксистробину // Картофелеводство. – 2011. – Т.19. – С. 277-286.
39. Л.Ю. Кокаева, М.А. Побединская, А.В. Николаев, А.В. Александрова, **С.Н. Еланский**. Видовой состав возбудителей альтернариоза картофеля и томата // Картофелеводство. – 2011. – Т.19. – С. 333-342.
40. Bagirova S.F., An Zsan Li, Dolgova A.V., **Elansky S.N.**, Shaw D.S., Dyakov Y.T. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to dimethomorph fungicide//J. Russian Phytopathol. Soc. – 2001. – V.2. – P. 19-25.
41. **Elansky S.N.** Analysis of *Phytophthora infestans* isolates from Siberian, Far Eastern and the Moscow Regions populations / in: Cornell-Eastern Europe-Mexico International Collaborative project in Potato Late Blight Control. Progress report, July 1999.
42. **Elansky S.N.**, Petrunina Ya.V., Likhachev A.N. Growth of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb.) Hughes strains on natural and artificial substrates //Botanica Lithuanica. – 2003. – V.9(2). – P.171–177.
43. **Elansky S. N.**, Smirnov A. N. Second locus of Peptidase as a marker for genetic investigations of *Phytophthora infestans* //Botanica Lithuanica. – 2003. – V.9(3). – P. 275-283.
44. **S.N. Elansky**, Yu.T. Dyakov, D.I. Milyutina, V.P. Apryshko, M.A. Pobedinskaya, A.V. Filippov, B.E. Kozlovsky, M.A. Kuznetsova, A.N. Rogozhin, N.V. Statsyuk Late blight of potato in Russia// Potato production and innovative technologies. Ed. A.J. Havenkort, B.V. Anisimov. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2007. – P. 262-273.
45. Zeyruk V.N., Pshechenkov K.A., **Elansky S.N.**, Davydenkova O.N., Maltsev S.V. Influence of potato growth and storage conditions on the quality of fresh table potato and potato products in the central part of Russia// Potato production and innovative technologies. Ed. A.J. Havenkort, B.V. Anisimov. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. – 2007. – P. 130-134.
46. N.V. Statsyuk, M.A. Kuznetsova, I.N. Kozlovskaya, B.E. Kozlovsky, **S.N. Elansky**, E.V. Morozova, E.V. Valeva, and A.V. Filippov Characteristics of the

Phytophthora infestans population in Russia// PPO-Special Report no. 14. – 2010. – P. 247-254.

47. **Elansky S.**, Pobedinskaya M., Kokaeva L., Statsyuk N., Alexandrova A. Molecular identification of the species composition of Russian isolates of pathogens, causing early blight of potato and tomato// PPO-Special Report no. 15. – 2012. – P. 151-156.

48. M. Pobedinskaya, **S. Elansky**, N. Statsyuk, M. Plyakhnevich Fungicide Resistance of Russian *Phytophthora infestans* strains// PPO-Special Report no. 15. – 2012. – P. 243-247.

Избранные тезисы и материалы конференций

49. Долгова А.В., Смирнов А.Н., **Еланский С.Н.**, Багирова С.Ф., Малеева Ю.В., Дьяков Ю.Т. Структура и динамика генотипического состава популяций *Phytophthora infestans* на территории бывшего СССР // Сборник трудов международной конференции «Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии». М.: Муравей, 1998. – С. 35-37.

50. Смирнов А.Н., **Еланский С.Н.**, Дьяков Ю.Т. Роль ооспорообразования в изменчивости подмосковных популяций *Phytophthora infestans* // Сборник трудов международной конференции «Современные проблемы микологии, альгологии и фитопатологии». М.: Муравей, 1998. – С. 109-111.

51. **Еланский С.Н.** Изменения в подмосковной популяции *Phytophthora infestans* в 1991-1999 годах// Тезисы международной конференции «Микология и криптогамная ботаника в России». С.-Пб., 2000. – С. 118.

52. М.К. Деревягина, С.Ф. Багирова, **С.Н. Еланский**, Ю.Т. Дьяков Влияние фунгицидов на популяции фитопатогенных грибов // Материалы докладов международной научно-практической конференции "Биологизация защиты растений: состояние и перспективы. Краснодар, 2001. – С. 95-96.

53. Смирнов А.Н., Кравцов А.С., Кузнецов С.А., Апрышко В.П., **Еланский С.Н.** Встречаемость и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской обл. в 1999 г. // Материалы научной конференции «Памяти Грегора Менделя». М.: Изд. МСХА, 2001. – С. 122-123.

54. А.Н. Смирнов, С.А. Кузнецов, А.С. Кравцов, В.П. Апрышко, **С.Н. Еланский** Распространение и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской области//Материалы научно-практической конференции «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы». М., ВНИИКХ 2001. – С. 313-324.

55. **Еланский С.Н.**, Смирнов А.Н., Кравцов А.С., Апрышко В.П., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области // Тезисы докладов первого съезда микологов. М., 2002. – С. 179.

56. Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., Побединская М.А., Кравцов А.С., **Еланский С.Н.** Встречаемость, морфологические особенности и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской области// Тезисы докладов первого съезда микологов. М.: Национальная академия микологии, 2002. – С. 207.

57. **Еланский С.Н.**, Смирнов А.Н., Кравцов А.С., Дьяков Ю.Т., Козловская И.Н., Козловский Б.Е., Морозова Е.В., Ааматханова Ф.Х. Популяции *Phytophthora infestans* в европейской части России// Первая всероссийская конференция по иммунитету растений к болезням и вредителям. Научные материалы. С-Пб., 2002. – С. 81-82.

58. Апрышко В.П., Петрунина Я.В., Побединская М.А., **Еланский С.Н.** Ооспоры *Phytophthora infestans* в природных очагах фитофтороза в Московской области в 2003 году// Сб. материалов юбилейной конференции Микология и альгология 2004. М.: Прометей, 2004. – С. 21-22.

59. Лаврова О.И., **Еланский С.Н.** Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и оценка возможности применения INTER-SINE-ПЦР для сравнительного анализа штаммов// Сб. материалов конференции Микология и альгология 2004. М.: Прометей, 2004. – С. 85-86.

60. **Еланский С.Н.**, Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., Апрышко В.П., Дьяков Ю.Т. Возможные причины изменения структуры популяций *Phytophthora infestans* в европейской части России на рубеже 20-21 веков// Материалы международной научной конференции «Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах». Минск, 2004. – С. 96-100.

61. Лаврова О.И., **Еланский С.Н.** Идентификация SINE-подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и применение INTER-SINE-ПЦР для сравнительного анализа штаммов грибов// Сб. материалов III съезда ВОГиС «Генетика в 21 веке: современное состояние и проблемы развития». М., 2004. – С. 359.

62. **Еланский С.Н.**, Апрышко В.П. Самофертильные штаммы *Phytophthora infestans* в природных популяциях// Труды международной конференции «Грибы в природных и антропогенных экосистемах». С.-Пб. 2005. С. 189-189.

63. **Еланский С.Н.**, Апрышко В.П., Милютин Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к системным фунгицидам // Материалы международной конференции «Грибы и водоросли в биоценозах – 2006». М.: МАКСпресс, 2006. – С. 56-58.

64. **Еланский С.Н.**, Дьяков Ю.Т., Милютина Д.И., Апрышко В.П., Побединская М.А., Филиппов А.В., Козловский Б.Е., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Стацюк Н.В. Популяции возбудителя фитофтороза в России// Материалы Международного конгресса «Картофель. Россия. 2007» М., 2007. – С. 211-222.
65. **Еланский С.Н.**, Пляхневич М.П., Романова С.С., Шеин С.А., Александрова А.В., Милютина Д.И. Устойчивость к манкоцебу штаммов *Phytophthora infestans* и *Alternaria* sp. из России и Беларуси// Материалы 2-го съезда микологов России. Том 2. М.: Нац. Акад. микологии, 2008. – С. 290-291.
66. Милютина Д.И., Шеин С. А., Апрышко В.П., **Еланский С.Н.** Популяции *Phytophthora infestans* в республике Марий Эл// Том 2. Материалы 2-го съезда микологов России. М.: Нац. академия микологии, 2008. – С. 193-194.
67. Пляхневич М.П., **Еланский С.Н.** Генотипический анализ белорусских штаммов возбудителя фитофтороза картофеля// Вторая Всероссийская конференция «Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам» С.-Пб., 2008. – С. 79-83.
68. **С.Н. Еланский**, М.П. Пляхневич Генотипический анализ штаммов возбудителя фитофтороза картофеля из Беларуси и Марий Эл// Сборник материалов научно-практической конференции «Перспективы инновационного развития картофелеводства». Чебоксары, 2009. – С. 74-76.
69. **С.Н. Еланский**, М.А. Побединская, Л.Ю. Кокаева, Ю.Т. Дьяков, М.П. Пляхневич Устойчивость *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза картофеля и томата, к некоторым фунгицидам. // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной индустрии производства картофеля». Чебоксары, 2011. С. 157-162.
70. Кузнецова М.А., Стацюк Н.В., Филиппов А.В., **Еланский С.Н.** и др. Популяции возбудителя фитофтороза картофеля на европейской территории РФ // Материалы международной конференции «Имуногенетическая защита сельско-хозяйственных культур от болезней: теория и практика». Московская обл., Большие Вяземы, 2012. – С. 89-100.
71. Smirnov A.N., Kuznetsov S.A., **Elansky S.N.** Investigations of *Phytophthora infestans* oospores in Moscow region// The 7-th International Mycological Congress, Book of abstracts. Oslo, 2002. – P.268.
72. **Elansky, S.**, Ryzhkin D. Airborne fungal spores in the atmosphere of Moscow city// The 7th International Congress on Aerobiology. Abstracts. Canada, Montreal, 2002. – P. 169.
73. **S.N. Elansky**, D.I. Milyutina Mitochondrial haplotypes of Russian *Phytophthora infestans* strains // XV Congress of European Mycologists. Book of Abstracts. S.-Pb., 2007. – P. 245.