Защита картофеля

№3, 2017

ISSN 2221-2396

Научно-практический журнал,
выходит с 2010 года

Главный редактор:
С.Н. Еланский, *д.б.н., МГУ им. М.В. Ломоносова*

Редколлегия:
Б.В. Анисимов, *к.б.н., ВНИИКХ*
В.Н. Зейрук, *д.с.-х. н., ВНИИКХ*
А.Н. Игнатов, *д.б.н., ООО "ИЦ Фитоинженерия"*
Л.Ю. Кокаева, *к.б.н., МГУ им. М.В. Ломоносова*
М.А. Кузнецова, *к.б.н., ВНИИ фитопатологии*
А.В. Николаев, *к.с.-х.н., Костромской НИИСХ*
К.А. Пшеченков, *д.с.-х. н., ВНИИКХ*
Е.А. Симаков, *д.с.-х. н., ВНИИКХ*
А.Н. Смирнов, *д.б.н., РГАУ-МСХА*
З.А. Сташевски, *к.б.н., Татарский НИИСХ*
М.Э. Тальянский, *professor, The James Hutton Institute, Dundee, United Kingdom*
А.В. Филиппов, *к.б.н., ВНИИ фитопатологии*

Выпускающий редактор:
Е.М. Чудинова, *к.б.н., РУДН*

Содержание

Введение 3

Жизненный цикл *P. infestans* 4

Происхождение *P. infestans* 5

Геном *P. infestans* 6

Методы, применяемые при изучении структуры популяций 7

Структура популяций 16

Механизмы изменчивости 24

Динамика генотипического состава популяций 30

Внутривидовая специализация и ее эволюция 33

Заключение 36

Список цитированной литературы 37

E-mail: *zakartofel@gmail.com*
Сайт: *http://www.kartofel.org*
РИНЦ: *http://elibrary.ru/title_about.asp?id=51602*

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (свидетельство ПИ № ФС 77-67959 от 13.12.2016). При перепечатке ссылка обязательна.
Тираж 300 экз. Подписано в печать: 15.11.2017 г.
Фотографии на обложке: А.Н. Рогожин, С.Н. Еланский

© Редакция журнала "Защита картофеля", 2017

Выходит 4 раза в год

Структура и динамика популяций *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза картофеля и томата

С.Н. Еланский[1,2], Л.Ю. Кокаева[1,4], Н.В. Стацюк[3], Ю.Т. Дьяков[1]

1 – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. 119991, г. Москва, Ленинские горы, д.1.
2 – Российский университет дружбы народов. 117198, Россия, ул. Миклухо-Маклая, 6.
3 – Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии. 143050, Московская обл., Большие Вяземы.
4 – Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. 145023, Россия, Московская обл., пос. Красково, ул. Лорха, д.23.

Аннотация

Оомицет Phytophthora infestans (Mont.) de Bary – возбудитель фитофтороза, одной из самых опасных болезней картофеля и томата. Борьба с этим заболеванием и потери из-за его развития на растениях приводят к затратам, измеряющимся миллиардами долларов. Актуальность фитофтороза способствовала тому, что его возбудитель стал самым изучаемым фитопатогенным микроорганизмом в мире. Благодаря всестороннему изучению удалось повысить эффективность защитных мероприятий, ускорить селекцию устойчивых сортов, снизить потери продукции при хранении.

В обзоре обобщены исследования, касающиеся популяционной биологии P. infestans, структуры и динамики популяций в разных странах мира. Приведена оценка методов, использующихся для сравнительного анализа штаммов и популяций. Настоящий обзор является расширенной и дополненной версией статьи «Популяционная генетика Phytophthora infestans», изданной в 2007 году в сборнике «Микология сегодня» (Дьяков, Еланский, 2007). За прошедшие 10 лет опубликовано много новых работ, касающихся изучения возбудителя фитофтороза. Исследован полный геном P. infestans. Использование микросателлитных маркеров позволило провести масштабные исследования популяций в разных странах мира, в т.ч. и в России. Работа написана специалистами, много лет работающими с возбудителем фитофтороза.

Ключевые слова: *фитофтороз, Phytophthora infestans, болезни картофеля, болезни томата структура популяций*

Для ссылки: *С.Н. Еланский, Л.Ю. Кокаева, Н.В. Стацюк, Ю.Т. Дьяков Структура и динамика популяций Phytophthora infestans - возбудителя фитофтороза картофеля и томата // Защита картофеля. – 2017. – №3. – С. 3-44.*

ВВЕДЕНИЕ

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

Автор для переписки: С.Н. Еланский
E-mail: snelansky@gmail.ru

Неудачи с использованием моногенной (вертикальной) устойчивости заставили селекционеров искать более сложные пути эксплуатации неспецифической полигенной (горизонтальной) устойчивости. В последние годы в отдельных популяциях паразита стали накапливаться высокоагрессивные расы, вызывающие эрозию даже неспецифической устойчивости. Появление устойчивых к фунгицидам штаммов вызвало проблемы при использовании химических средств защиты картофеля.

Вследствие значительных отличий оомицетов от грибов по химическому составу, ультраструктуре и метаболизму фунгициды, особенно системные, применяющиеся для защиты растений от многих грибных болезней, против оомицетов неэффективны. Поэтому в химической защите от фитофтороза использовали многократные (до 12 раз за сезон и более) опрыскивания контактными препаратами широкого спектра действия. Революционным шагом стало применение фениламидов, токсичных для оомицетов и системно распространяющихся в растениях. Однако повсеместное их применение быстро привело к

накоплению в грибных популяциях резистентных штаммов (Davidse et al., 1981), что существенно усложнило защиту растений. *P. infestans* является практически единственным паразитом умеренного пояса, вред от которого в условиях органического земледелия невозможно нейтрализовать без применения химических средств защиты (Van Bruggen, 1995).

Вышесказанное объясняет то огромное внимание, которое уделяют исследователи из разных стран изучению популяций *P. infestans*, динамике их численности и генетического состава, а также генетическим механизмам изменчивости.

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ *P. INFESTANS*

Оомицет *Phytophthora infestans* развивает внутри листьев картофеля межклеточную грибницу с гаусториями. Питаясь тканями листа, он вызывает образование темных пятен, которые во влажную погоду чернеют и загнивают. При сильном поражении погибает весь лист. После периода питания на грибнице образуются выросты – спорангиеносцы – которые прорастают наружу через устьица. Во влажную погоду они образуют налет белого цвета вокруг пятен с нижней стороны листьев. На концах спорангиеносцев формируются лимоновидные зооспорангии, которые отрываются и разносятся брызгами дождя (рис. 1). Попадая в капли воды на поверхности листа картофеля, спорангии прорастают 6-8 зооспорами, которые после периода движения округляются, покрываются оболочкой и прорастают ростковой трубкой. Росток через устьице проникает в ткань листа. При определенных условиях спорангий может прорастать ростковой трубкой напрямую в ткань листа. При благоприятных условиях время от заражения до образования нового спороношения составляет всего 3-4 дня.

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

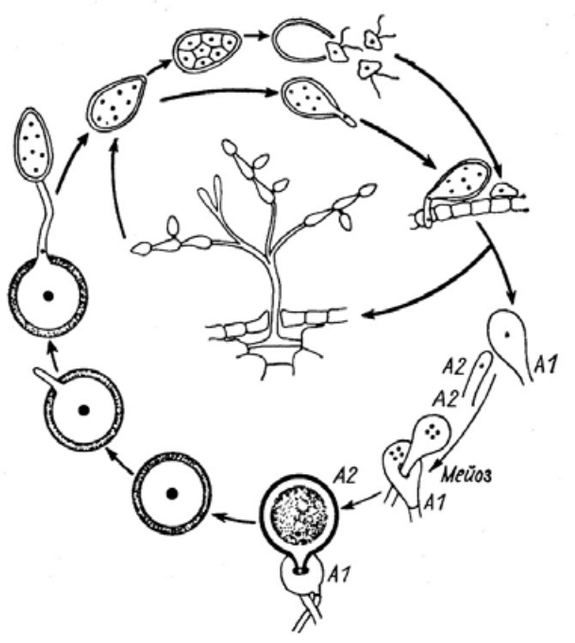

Рис. 1. Жизненный цикл *Phytophthora infestans.* Объяснения в тексте

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

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

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

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

Таким образом, в одних регионах может быть чередование полового и бесполого циклов, а в других – только бесполый цикл.

ПРОИСХОЖДЕНИЕ *P. INFESTANS*

P. infestans появился в Европе в конце первой половины XIX в. Поскольку родиной картофеля является Северо-Восточная часть Южной Америки, предполагалось, что паразит был привезен оттуда в Европу во время бума чилийской селитры. Однако исследования, выполненные на картофельной станции Рокфеллеровского центра в долине Толука (Мексика), заставили пересмотреть эту точку зрения (Niederhauser, 1991, 1993).

1. В долине Толука местные клубненосные виды картофеля (*Solanum demissum, S. bulbocastanum* и др.) обладают различными наборами генов вертикальной устойчивости в сочетании с высоким уровнем неспецифической устойчивости, что свидетельствует о длительной коэволюции с паразитом. Южноамериканские виды, включая культурный картофель, не имеют генов устойчивости.

2. В долине Толука встречаются изоляты с типами спаривания A1 и A2, вследствие чего распространена интербредная популяция *P. infestans*; в то время как на родине культурного картофеля, в Южной Америке, паразит распространяется клонально.

3. В долине Толука наблюдаются ежегодные жестокие эпидемии фитофтороза. Поэтому среди североамериканских исследователей (Корнельский университет) устоялось мнение о Мезоамерике (Центральной Америке), как родине картофельной фитофторы (Goodwin et al., 1994).

Южноамериканские исследователи не разделяют это мнение. Они считают, что культурный картофель и его паразит *P. infestans* имеют общую родину – южноамериканские Анды. Свою точку зрения они подкрепили молекулярными исследованиями по анализу ДНК-полиморфизмов митохондриального генома (мтДНК) и ядерных генов *RAS* и *β-тубулина* (Gomez-Alpizar et al., 2007). Они показали, что штаммы, собранные в разных местах мира, произошли от трех дивергентных анцестральных линий, которые (все три) найдены в Южно-американских Андах. Андские гаплотипы – потомки двух линий: изоляты самой старой линии мтДНК встречаются на дикорастущих пасленовых из секции *Anarrhicomenum* в Эквадоре, изоляты второй линии распространены на картофеле, томате и диких пасленовых. В Толуке даже редкие гаплотипы происходят только от одной линии, причем генетическая вариабельность штаммов из Толуки (низкая аллельная частота некоторых вариабельных сайтов) свидетельствует о сильном эффекте основателя вследствие недавнего дрейфа. Кроме того, в Андах найден новый вид *P. andina*, морфологически и генетически сходный с *P. infestans*, что, по мнению авторов, указывает на Анды, как на горячую точку видообразования в роде *Phytophthora*. Наконец, в Европе и в США популяции *P. infestans* включают обе андские лини, в то время как в Толуке – только одну.

Эта публикация вызвала ответную реакцию группы исследователей из разных стран, которые провели большую экспериментальную работу по ревизии ранее выполненного исследования (Goss et al., 2014). В этой работе, во-первых, для исследования полиморфизмов ДНК были использованы более информативные микросателлитные последовательности ДНК; во-вторых, для анализа кластеризации, путей миграции времени расхождения популяций и проч. были использованы более совершенные модели (F-статистика, аппроксимации Bayesian'а и др.) и, в-третьих, использовано сравнение не только с андским видом *P. andina*, у которого была установлена гибридная природа (*P. infestans x Phytophthora* sp.), но и с мексиканскими эндемиками *P. mirabilis, P. ipomoeae* и *Phytophthora phaseoli* – генетически близкими *P. infestans*, входящими в одну кладу (Kroon et al., 2012). В результате этих анализов было однозначно показано, что корневая часть филогенетического дерева всех взятых в исследование видов рода *Phytophthora*, кроме гибридного *P. andina*, принадлежит мексиканским штаммам, а миграционный поток имеет направление Мексика – Анды, а не наоборот, и его начало совпадает с европейской колонизацией Нового Света (300-600 лет назад). Таким образом, возникновение вида *P. infestans*, специализированного к поражению картофеля, произошло во вторичном генетическом центре формирования клубненосных пасленовых, т.е. в Центральной Америке.

ГЕНОМ *P. INFESTANS*

В 2009 году международной группой ученых был секвенирован полный геном *P infestans* (Haas et al, 2009), размер которого составил 240 Мб. Это в несколько раз больше, чем у близких видов *P. sojae* (95 Мб), вызывающих корневую гниль сои, и *P. ramorum* (65 Мб), поражающих такие ценные породы деревьев, как дуб, бук и некоторые другие. Полученные данные показали, что геном содержит большое число копий повторяющихся последовательностей – 74%. В геноме определены 17797 белок-кодирующих генов, основную часть которых составляют гены, участвующие в клеточных процессах, включая репликацию ДНК, транскрипцию и трансляцию белков.

Сравнение геномов рода *Phytophthora* выявило необычную организацию генома, состоящего из блоков последовательностей консервативных генов, в которых плотность генов относительно высока, а содержание повторяющихся последовательностей относительно низко, и отдельных областей с неконсервативными последовательностями генов, с низкой плотностью генов и высоким содержанием повторяющихся участков. Консервативные блоки составляют 70% (12440) всех кодирующих белок генов *P. infestans*. В пределах консервативных блоков гены, как правило, расположены тесно со средним межгенным расстоянием 604 п.н. В районах между консервативными блоками межгенное расстояние больше (3700 п.н.) вследствие увеличения плотности повторяющихся элементов. Быстро эволюционирующие эффекторные секреторные гены расположены в районах с низким содержанием генов.

Анализ последовательностей генома *P. infestans* показал, что приблизительно одна треть генома принадлежит к мобильным элементам. В геноме *P. infestans* содержится значительно больше различных семейств транспозонов, чем в других известных геномах. Большая часть транспозонов *P. infestans* принадлежит семейству Gypsy.

В геноме *P. infestans* выявлено большое количество специфических семейств генов, участвующим в патогенезе. Значительная их часть кодирует эффекторные белки, изменяющие физиологию растения-хозяина и способствующие его инфицированию. Они относятся к двум большим категориям: апопластические эффекторы, которые действуют в межклеточных пространствах (апопластах) и цитоплазматические эффекторы, которые попадают в клетки с помощью гаусторий. Апопластические эффекторы включают в себя секретируемые гидролитические энзимы, такие как протеазы, липазы и гликозилазы, которые разрушают клетки растений; ингибиторы энзимов защитной системы растения-хозяина и некротизирующие токсины, такие как Nep1 подобные белки (NPLs) и Pcf-подобные небольшие белки, богатые цистеином (SCRs).

Эффекторные гены *P. infestans* многочисленны и обычно большего размера по сравнению с непатогенными генами. Наиболее известны цитоплазматические эффекторы RXLR и Crinkler (CNR). Типичными для оомицетов цитоплазматическими эффекторами являются RXLR белки. Все открытые до сих пор гены RXLR эффекторов содержат амино-терминальную группу Arg-X-Leu-Arg, где X представляет собой аминокислоту. В результате исследования было высказано предположение о наличии 563 RXLR генов в геноме *P. infestans*, что на 60% больше, чем у *P. sojae* и *P. ramorum*. Приблизительно половина RXLR генов в геноме *P. infestans* являются видоспецифичными. RXLR эффекторы отличаются большим разнообразием последовательностей. Среди них выявлены одно большое и 150 небольших семейств. В отличие от основного протеома, гены RXLR эффекторов обычно располагаются в областях генома, бедных генами и богатых повторами. Мобильные элементы, обуславливающие динамичность этих регионов, способствуют рекомбинации в этих генах.

Цитоплазматические CRN эффекторы были первоначально определены в транскриптах *P. infestans*, кодирующих пептиды, вызывающие некроз тканей растения. С момента их открытия было мало известно о семействе этих эффекторов. Анализ генома *P. infestans* выявил огромное семейство из 196 CRN генов, что значительно больше, чем у *P. sojae* (100 CRN) и *P. ramorum* (19 CRN). Как и RXLR, CRN являются модульными белками и состоят из высоко консервативного N-терминального LFLAK домена (50 аминокислот) и рядом расположенного домена DWL, содержащего разные гены. Большинство CRN (60%) обладают сигнальным пептидом.

Была изучена возможность различных CRN нарушать клеточные процессы растения-хозяина. При анализе некрозов растения удаление CRN2 белков позволило идентифицировать С-концевой регион, состоящий из 234 аминокислот (позиции 173-407, домен DXG) и вызывающий гибель клеток. Анализ CRN-генов *P. infestans* позволил выявить четыре различных С-концевых региона, которые также вызывают гибель клеток внутри растения. К ним относятся впервые определенные DC домены (у *P. infestans* 18 генов и 49 псевдогенов), а также D2 (14 и 43) и DBF (2 и 1) домены, обладающие сходством с белками киназами. Белки CRN-доменов, экспрессируемые в растении, сохраняются (в отсутствие сигнальных пептидов) в растительной клетке и стимулируют гибель клеток по внутриклеточному механизму. Еще 255 содержащих CRN-доменов последовательностей скорее всего не функционируют как гены.

Увеличение числа и размера семейств эффекторных генов RXLR и CRN было, предположительно, обусловлено, неаллельной гомологичной рекомбинацией и дублированием генов. Несмотря на то, что в геноме содержится большое число активных мобильных элементов, до сих пор нет прямых доказательств переноса эффекторных генов.

МЕТОДЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ

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

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

— быть дешевыми, несложными в исполнении, не требовать значительных временных затрат, базироваться на общедоступных технологиях (например, ПЦР);

— должны генерировать достаточно большое число независимых кодоминантных маркерных признаков;

— иметь высокую воспроизводимость;

— использовать минимальное количество исследуемой ткани;

— быть специфичными к субстрату (имеющееся в культуре загрязнение не должно влиять на результаты);

— не требовать применения опасных процедур и сильно токсичных химикатов.

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

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

Фенотипические маркерные признаки

“Картофельные” расы

“Картофельные” расы представляют собой часто исследуемый и используемый маркер. “Простые картофельные” расы имеют один ген вирулентности к картофелю, “сложные” – не менее двух. Black с соавторами (1953), обобщив все имеющиеся у них данные, установили, что раса фитофторы способна поражать растения с геном/генами устойчивости, соответствующие гену/генам вирулентности *P. infestans*, и обнаружили расы 1, 2, 3 и 4, поражающие растения с генами R1, R2, R3 и R4, соответственно, т.е. взаимодействие между паразитом и хозяином происходит по принципу “ген на ген”. Далее Black при участии Gallegly и Malcolmson открыли гены устойчивости R5, R6, R7, R8, R9, R10 и R11 а также соответствующие им расы (Black, 1954; Black & Gallegly, 1957; Malcolmson & Black, 1966; Malcolmson, 1970).

По расовому составу возбудителя из различных регионов существует обширный массив данных. Не анализируя эти данные подробно, укажем лишь общую тенденцию: там, где использовали сорта с новыми генами устойчивости или их комбинациями, сначала имело место некоторое ослабление фитофтороза, но затем появлялись и отбирались расы с соответствующими генами вирулентности и вспышки фитофтороза возобновлялись вновь. Специфическая вирулентность против первых 4 генов устойчивости (R1-R4) редко отмечалась в коллекциях, собранных до введения в культуру сортов с этими генами, но количество вирулентных штаммов резко увеличивалось при паразитировании патогена на сортах, несущих эти гены. Гены 5-11, напротив, встречались в коллекциях достаточно часто (Shaw, 1991).

Исследование соотношения различных рас на протяжении вегетационного сезона, проведенное в конце 1980-х годов, показало, что в начале развития заболевания в популяции преобладают клоны с низкой агрессивностью и 1-2 генами вирулентности. Далее, по мере развития фитофтороза, концентрация исходных клонов уменьшается и увеличивается число “сложных” рас с высокой агрессивностью. Встречаемость последних к концу сезона достигает 100%. При хранении клубней происходит уменьшение агрессивности и потеря отдельных генов вирулентности. Динамика замещения клонов может происходить на разных сортах по-разному (Рыбакова & Дьяков, 1990). Однако проведенные нами в 2000-2010 годах исследования показали, что сложные расы встречаются с самого начала эпифитотии среди штаммов, выделенных как с картофеля, так и с томата,. Вероятно, это связано с изменением популяций *P. infestans* в России.

К 1988-1995 годам встречаемость “суперрас”, имеющих все или почти все гены вирулентности, в различных регионах достигала 70-100%. Такая ситуация отмечалась, например, в Белоруссии, в Ленинградской, Московской областях, в Северной Осетии и в Германии (Иванюк и др., 2002a, 2002b; Политыко, 1994; Schober-Butin et al., 1995).

“Томатные” расы

У сортов томата удалось обнаружить только 2 гена устойчивости к фитофторозу – Ph1 (Gallegly & Marvell, 1955) и Ph2 (Al-Kherb, 1988). Как и в случае с картофельными расами, взаимодействие между томатами и *P. infestans* происходит по принципу “ген на ген”. Раса T0 заражает сорта, у которых нет генов устойчивости (большинство промышленно используемых сортов), раса T1 заражает сорта с геном Ph1 (Оттава), раса T2 - сорта с геном Ph2.

В России на картофеле обнаруживали почти исключительно T0; на томатах в начале сезона преобладала T0, но позднее она замещалась расой T1 (Дьяков и др., 1975, 1994). После 2000 года T1 на картофеле во многих популяциях стала встречаться в самом начале эпифитотии. В США на картофеле встречались штаммы, непатогенные к томату, а также расы T0, T1 и T2, а на томатах преобладали T1 и T2 (Vartanian & Endo, 1985; Goodwin et al., 1995).

Тип спаривания

Для проведения исследования необходимы тестерные (референтные) штаммы с известными типами спаривания – A1 и A2. Исследуемый изолят высевается с ними попарно в чашки Петри с овсяной агаризованной средой. После инкубации в течение 10 дней чашки изучают на наличие или отсутствие ооспор в среде в зоне контакта штаммов. Возможны 4 варианта: штамм относится к типу спаривания A1, если он образует ооспоры с тестером A2, к A2, если образует ооспоры с тестером A1, к A1A2, если образует ооспоры с обоими тестерами, или является стерильным (00), если не образует ооспор ни с одним тестером (последние две группы встречаются редко).

Для более быстрого определения типов спаривания предпринимались попытки выявления участков генома, связанных с типом спаривания, с целью их дальнейшего использования для определения типа спаривания методом ПЦР. Одними из первых успешный эксперимент по выявлению подобного участка провели американские исследователи (Judelson et al., 1995). С использованием метода RAPD они смогли идентифицировать регион W16, связанный с типом спаривания у потомков двух скрещиваемых изолятов, и сконструировать пару 24-нуклеотидных праймеров для его амплификации (W16-1 (5’-AACACGCACAAGGCATATAAATGTA-3’) и W16-2 (5’-GCGTAATGTAGCGTAACAGCTCTC-3’). После рестрикции ПЦР-продукта с помощью рестриктазы HaeIII удавалось разделить изоляты с типами спаривания A1 и A2.

Другая попытка получить ПЦР-маркеры для определения типов спаривания была предпринята корейскими исследователями (Kim, Lee, 2002). Идентификацию специфических продуктов они проводили с использованием метода AFLP. В результате была разработана пара праймеров PHYB-1 (forward) (5’-GATCGGATTAGTCAGACGAG-3’) и PHYB-2 (5’-GCGTCTGCAAGGCGCATTTT-3’), позволяющие избирательно амплифицировать участок генома, связанный с A2 типом спаривания. В дальнейшем они продолжили эту работу и сконструировали праймеры 5’-AAGCTATACTGGGACAGGGT-3’ (INF-1, forward) и 5’-GCGTTCTTTCGTATTACCAC-3’ (INF-2), позволяющие избирательно амплифицировать участок Mat-A1, характерный для штаммов с типом спаривания A1. Использование ПЦР-диагностики типов спаривания показало хорошие результаты при исследовании популяций *P. infestans* в Чехии (Mazakova et al., 2006), Тунисе (Jmour, Hamada, 2006) и других регионах. В нашей лаборатории (Мыца, Еланский, неопубликовано) были проанализированы 34 штамма *P. infestans*, выделенные из пораженных органов картофеля и томата в разных регионах России (Костромская, Рязанская, Астраханская, Московская области). Результаты ПЦР-анализа с помощью специфичных праймеров более, чем на 90% совпали с результатами анализа типа спаривания традиционным способом на питательной среде.

Таблица 1. Вариабельность устойчивости внутри клона Sib 1 (Elansky et al., 2001)

Место сбора образцов	Количество проанализированных изолятов	Количество чувствительных (S), слабоустойчивых (SR) и устойчивых (R) штаммов, шт (%)		
		S	SR	R
Г. Владивосток	10	1(10)	4(40)	5(50)
Г. Чита	5	0	0	5(100)
Г. Иркутск	9	9(100)	0	0
Г. Красноярск	13	12(92)	1(8)	0
Г. Екатеринбург	15	8(53)	1(7)	6(40)
О. Сахалин	66	0	0	66(100)
Омская обл.	18	0	0	18(100)

Устойчивость к металаксилу как популяционный маркер

В начале 1980-х годов в самых различных регионах были отмечены мощные вспышки фитофтороза, вызываемые устойчивыми к металаксилу штаммами *P.infestans*. Картофелеводческие хозяйства многих стран понесли ощутимые потери (Dowley & O'Sullivan, 1981; Davidse et al., 1983; Деревягина, 1991). С тех пор во многих странах мира ведется постоянный мониторинг встречаемости устойчивых к фениламидным препаратам штаммов в популяциях *P. infestans.* Кроме практической оценки перспектив применения фениламидсодержащих препаратов, построения системы защитных мероприятий и прогнозирования эпифитотий, устойчивость к этим препаратам стала одним из маркерных признаков, широко используемых для сравнительного анализа популяций этого патогена. Однако использование устойчивости к металаксилу в сравнительных популяционных исследованиях следует проводить с учетом того, что:

1 – генетические основы устойчивости еще точно не определены,

2 – устойчивость к металаксилу – признак селективно зависимый, способный изменяться в зависимости от применения фениламидов,

3 – зафиксированы разные по степени чувствительности к металаксилу штаммы внутри одной клональной линии (табл. 1).

Спектры изоферментов

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

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

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

Исследование изоферментов пептидазы проводится на целлюлозо-ацетатных, крахмальных или полиакриламидных гелях. Наиболее удобным является метод, основанный на использовании целлюлозо-ацетатных гелей, производимых фирмой Helena Laboratories Inc. Он не требует больших количеств исследуемых материалов, позволяет получать контрастные полосы на геле после электрофореза для обоих локусов фермента, его проведение не требует больших временных и материальных затрат (рис. 2).

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

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

Таблица 2. Состав раствора, применяемого для окраски целлюлозо-ацетатного геля при анализе изоферментов пептидазы

TRIS HCl, 0,05M, Ph 8,0	2 мл
Peroxidase, 1000 U/ml	5 капель
o-dianisidine, 4 mg/ml	8 капель
MgCl2, 20 mg/ml	2 капли
Gly-Leu, 15 mg/ml	10 капель
L-amino-acid oxidase, 20 u/ml	2 капли

В российских популяциях локус Pep 1 представлен генотипами 100/100 и 92/100. Гомозигота 92/92 встречается крайне редко (около 0,1%). Локус Pep 2 представлен тремя генотипами 100/100, 100/112 и 112/112, причем все 3 варианта встречаются достаточно часто (Elanky, Smirnov, 2003, рис. 2).

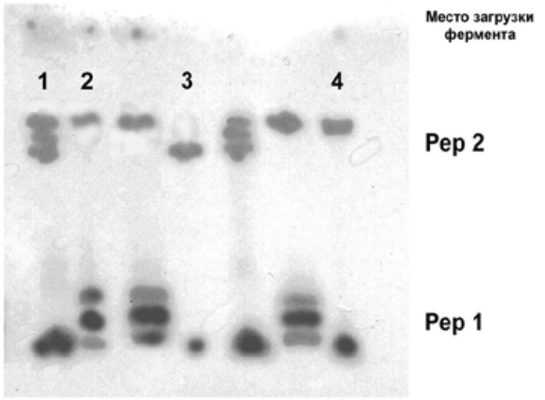

Рис. 2. Спектр изоферментов пептидазы после электрофоретического разделения
Генотипы (Pep1#Pep2): 1 – 100/100#100/112; 2 – 92/100#100/100; 3 – 100/100#112/112; 4 – 100/100#100/100.

Исследования генома

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

Тотальную ДНК обрабатывают рестриктазой EcoR1, фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в агарозном геле. Ядерная ДНК очень большая и имеет много повторяющихся последовательностей, в связи с чем непосредственный анализ многочисленных фрагментов, полученных под действием рестриктаз, проводить сложно. Поэтому разделенные в геле фрагменты ДНК переносят на специальную мембрану и используют для гибридизации с зондом RG 57, в состав которого входят нуклеотиды, меченые радиоактивными или флюоресцентными метками. Этот зонд гибридизуется с многократно повторяющимися последовательностями генома (Goodwin et al., 1992, Forbes et al., 1998). После визуализации результатов гибридизации на свето- или радиоактивночувствительном материале получается многолокусный профиль гибридизации (fingerprinting), представленный 25-29 фрагментами (Forbes et al., 1998). Бесполое (клоновое) потомство будет иметь одинаковые профили. По расположению полос на электрофореграмме судят о сходстве и различиях сравниваемых организмов.

Гаплотипы митохондриальной ДНК

В большинстве эукариотических клеток мтДНК представлена в виде двуцепочечной кольцевой молекулы ДНК, которая в отличие от ядерных хромосом эукариотических клеток реплицируется полуконсервативно и не связана с белковыми молекулами.

Митохондриальный геном *P. infestans* был секвенирован, ряд работ был посвящен анализу длин рестрикционных фрагментов (Carter et al, 1990, Goodwin, 1991, Gavino, Fry, 2002). После того как Griffith и Shaw (1998) разработали несложный и быстрый метод определения гаплотипов mtDNA, этот маркер стал одним из самых популярных в исследованиях *P. infestans*. Суть метода заключается в последовательной амплификации двух фрагментов митохондриальной ДНК (из общего генома) праймерами F2-R2 и F4-R4 (табл. 3) и их последующей рестрикции с помощью рестриктаз MspI (1-й фрагмент) и EcoR1 (2-й фрагмент). Метод позволяет выделить 4 гаплотипа: Ia, IIa, Ib, IIb. Тип II отличается от типа I присутствием вставки размером 1881 пн и другим расположением сайтов рестрикции в регионах P2 и P4 (рис. 3).

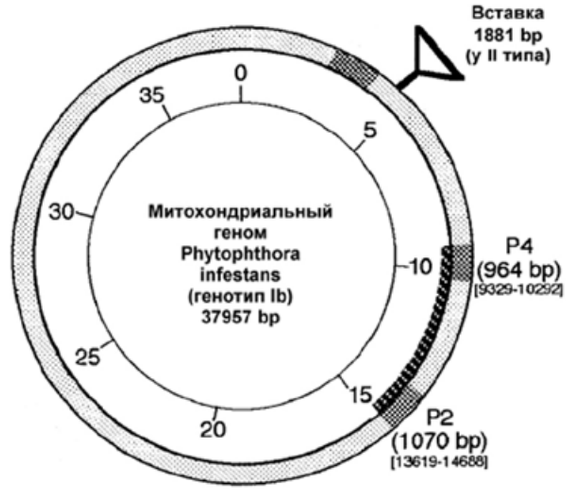

Рис. 3. Диаграмма, показывающая расположение локусов P2, P4 и вставки у 2-го типа. Темным (регион P2-P4) показана локализация длинного ПЦР-продукта, получающегося при амплификации с праймерами F4-R2

Начиная с 1996 года среди штаммов, собранных на территории России, отмечались только гаплотипы Ia и IIa (Elansky et al., 2001, 2015). Их можно идентифицировать после разделения продуктов рестрикции с праймером F2-R2 в электрическом поле (рис. 4, 5). Типы мтДНК используются при

Таблица 3. Праймеры, используемые для амплификации полиморфных регионов mtDNA

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

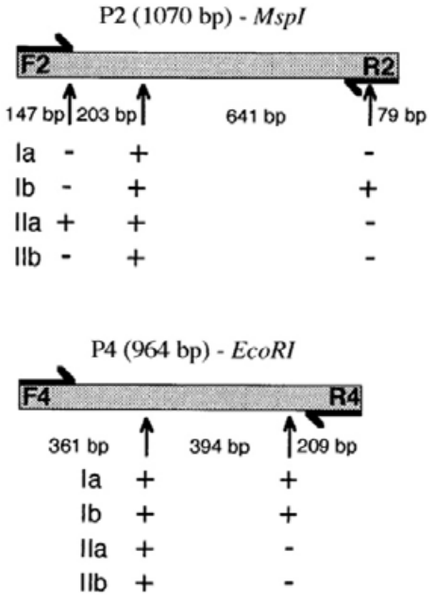

Рис.4. Продукты, получающиеся после рестрикции ПЦР-продуктов регионов P2 и P4 (Griffith, Shaw, 1998)

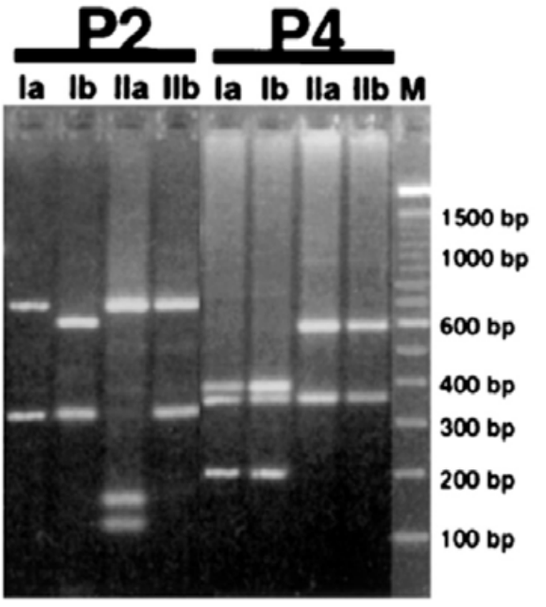

Рис. 5. Вид продуктов рестрикции после электрофоретического разделения (Griffith, Shaw, 1998)

сравнительном анализе штаммов и популяций. В ряде работ типы митохондриальной ДНК были использованы для выделения клональных линий и паспортизации изолятов *P. infestans* (Botez et al., 2007; Шеин и др., 2009). Используя PCR-RFLP метод был сделан вывод о гетерогенности мтДНК в одном и том же штамме *P. infestans* (Еланский, Милютина, 2007).

Условия амплификации: 1х (500 сек. 94°С), 40х (30 сек. 90°С, 30 сек. 52°С, 90 сек. 72°С); 1х (5 мин. 72°С). Реакционная смесь: (20 мкл): 0,2U Taq ДНК полимеразы, 1х 2,5 мМ MgCl2-Taq-буфер, 0,2 мМ каждого dNTP, 30 пМ праймера и 5 нг исследуемой ДНК, деионизованная вода – до 20 мкл.

Рестрикция ПЦР-продукта проводится в течение 4-6 часов при температуре 37°С. Смесь для рестрикции (20 мкл): 10х MspI (2 мкл), 10х буфер для рестрикции (2 мкл), деионизованная вода (6 мкл), ПЦР- продукт (10 мкл).

Амплификация со случайными праймерами (RAPD).

При проведении RAPD используют один праймер (иногда – несколько праймеров одновременно) с произвольной последовательностью нуклеотидов, длиной, как правило, 10 нуклеотидов, с высоким содержанием (от 50%) GC-нуклеотидов и низкой температурой отжига (порядка 35ºС). Такие праймеры «садятся» на многочисленные комплиментарные сайты в геноме. После амплификации получается большое число ампликонов. Их число зависит от используемого праймера (праймеров) и условий реакции (концентрации MgCl2 и температуры отжига). Визуализацию ампликонов проводят разгонкой в полиакриламидном или агарозном геле. При проведении RAPD анализа необходимо тщательно следить за чистотой анализируемого материала, т.к. контаминация другими живыми объектами может вызвать значительное увеличение числа артефактов, которых и при анализе чистого материала довольно много (Perez et al, 1998). Использование этого метода при исследовании генома *P. infestans* отражено во многих работах (Judelson, Roberts, 1999, Ghimire et al., 2002, Carlisle et al., 2001). Подбор условий реакции и праймеров (исследован 51 10-нуклеотидный праймер) приведен в статье Abu-El Samen et al., (2003).

Анализ микросателлитных повторов (SSR)

Микросателлитные повторы (simple sequence repeats, SSR) представляют собой тандемно повторяющиеся короткие последовательности из 1-3 (иногда до 6) нуклеотидов, присутствующие в ядерных геномах всех эукариот. Количество следующих друг за другом повторов может варьировать от 10 до 100. Микросателлитные локусы встречаются с достаточно высокой частотой и более-менее равномерно распределены по всему геному (Lagercrantz et al., 1993). Полиморфизм микросателлитных последовательностей связан с различиями в числе повторов базового мотива. Микросателлитные маркеры относятся к кодоминантным, что позволяет использовать их для анализа структуры популяции, определения родства, путей миграции генотипов и т.п. Среди прочих достоинств этих маркеров следует отметить их высокий полиморфизм, хорошую воспроизводимость, нейтральность и возможность проведения автоматического анализа и оценки

Анализ полиморфизма микросателлитных повторов осуществляется методом ПЦР-амплификации с использованием праймеров, комплементарных уникальным последовательностям, фланкирующим микросателлитные локусы. Изначально анализ проводили с разделением продуктов реакции на полиакриламидном геле. Позднее сотрудниками

компании Applied Biosystems было предложено использовать флуоресцентно меченые праймеры с детекцией продуктов реакции при помощи автоматического лазерного детектора (Diehl et al., 1990), а затем и стандартных автоматических ДНК-секвенаторов (Ziegle et al., 1992). Мечение праймеров различными флуоресцентными красителями позволяет анализировать сразу несколько маркеров на одной дорожке и, соответственно, существенно увеличить производительность метода и повысить точность анализа.

Первые публикации, посвященные использованию SSR анализа для исследования *P. infestans*, появились в начале 2000 гг. (Knapova, Gisi, 2002). Не все предложенные авторами маркеры показали достаточную степень полиморфизма, однако два из них (4B и G11), были включены в набор из 12 SSR-маркеров, предложенный в работе Lees и др. (2006) и впоследствии принятый в исследовательской сети Eucablight (www.eucablight.org) в качестве стандарта для *P. infestans*. Через несколько лет было опубликовано исследование, посвященное созданию системы мультиплексного анализа ДНК *P. infestans* на основе восьми SSR-маркеров (Li et al., 2010). Наконец, после проведения оценки всех предложенных ранее маркеров и отбора наиболее информативных из них, а также осуществления оптимизации праймеров, флуоресцентных меток и условий амплификации, этот же коллектив авторов представил систему одностадийного мультиплексного анализа, включающую 12 маркеров (табл. 4; Li et al., 2013a). Используемые в этой системе праймеры были подобраны и помечены одним из четырех флуоресцентных маркеров (FAM, VIC, NED, PET) таким образом, чтобы диапазоны размеров аллелей праймеров с одинаковыми метками не перекрывались.

Авторы проводили анализ на амплификаторе PTC200 (MJ Research, США) с использованием наборов QIAGEN multiplex PCR или QIAGEN Type-it Microsatellite PCR. Объем реакционной смеси составлял 12.5 мкл. Условия амплификации были следующими:

для QIAGEN multiplex PCR: 95ºC (15 мин), 30x (95ºC (20 с), 58ºC (90 с), 72ºC (60 с), 72ºC (20 мин);

для QIAGEN Type-it Microsatellite PCR: 95ºC (5 мин), 28x (95ºC (30 с), 58ºC (90 с), 72ºC (20 с), 60ºC (30 мин).

Разделение и визуализацию ПЦР-продуктов осуществляли с использованием автоматического капиллярного ДНК-анализатора ABI3730 (Applied Biosystems). Пример визуализации результатов

Таблица 4. Характеристики 12 стандартных SSR-маркеров, используемых для генотипирования *P. infestans* (Li et al., 2013a)

Название	Кол-во аллелей	Диапазон размера аллелей (п.н.)	Праймеры
PiG11	13	130-180	F: NED-TGCTATTTATCAAGCGTGGG R: GTTTCAATCTGCAGCCGTAAGA
Pi02	4	255-275	F: NED-ACTTGCAGAACTACCGCCC R: GTTTGACCACTTTCCTCGGTTC
PinfSSR11	4	325-360	F: NED-TTAAGCCACGACATGAGCTG R: GTTTAGACAATTGTTTTGTGGTCGC
D13	16	100-185	F: FAM-TGCCCCCTGCTCACTC R: GCTCGAATTCATTTTACAGACTTG
PinfSSR8	4	250-275	F: FAM-AATCTGATCGCAACTGAGGG R: GTTTACAAGATACACACGTCGCTCC
PinfSSR4	7	280-305	F: FAM-TCTTGTTCGAGTATGCGACG R: GTTTCACTTCGGGAGAAAGGCTTC
Pi04	4	160-175	F: VIC-AGCGGCTTACCGATGG R: GTTTCAGCGGCTGTTTCGAC
Pi70	3	185-205	F: VIC-ATGAAAATACGTCAATGCTCG R: CGTTGGATATTTCTATTTCTTCG
PinfSSR6	3	230-250	F: GTTTTGGTGGGGCTGAAGTTTT R: VIC-TCGCCACAAGATTTATTCCG
Pi63	3	265-280	F: VIC-ATGACGAAGATGAAAGTGAGG R: CGTATTTTCCTGTTTATCTAACACC
PinfSSR2	3	165-180	F: PET-CGACTTCTACATCAACCGGC R: GTTTGCTTGGACTGCGTCTTTAGC
Pi4B	5	200-295	F: PET-AAAATAAAGCCTTTGGTTCA R: GCAAGCGAGGTTTGTAGATT

анализа показан на рис. 6. Результаты анализировали при помощи программы GeneMapper 3.7 путем сравнения полученных данных с данными известных изолятов. Для облегчения интерпретации результатов анализа в каждое исследование необходимо включать 1-2 референтных изолята с известным генотипом.

Предложенный метод исследования был протестирован на значительном количестве полевых образцов, после чего авторы осуществили стандартизацию протоколов между лабораториями двух организаций, The James Hutton Institute (Великобритания) и Wageningen University & Research (Нидерланды), что, наряду с возможностью использования стандартных FTA-карт для упрощенного сбора и пересылки образцов ДНК *P. infestans*, позволило говорить о возможности коммерческого использования этой разработки. Кроме того, быстрый и точный метод генотипирования изолятов *P. infestans* с использованием мультиплексного SSR-анализа обеспечил возможность проведения стандартизированных исследований популяций данного патогена в глобальных масштабах, а создание мировой базы данных по фитофторе в рамках проекта Eucablight (www.eucablight.org), включающей, в том числе, результаты микросателлитного анализа, позволило отслеживать появление и распространение новых генотипов во всем мире.

Полиморфизм длин амплифицированных рестрикционных фрагментов (AFLP).

AFLP (amplified fragment length polymorphism) – технология получения случайных молекулярных маркеров с использованием специфических праймеров. При AFLP ДНК обрабатывают комбинацией из двух рестриктаз. Специфические адаптеры лигируют с “липкими” концами рестрикционных фрагментов. Затем эти фрагменты амплифицируют, используя праймеры, комплементарные последовательности адаптера и сайту рестрикции, и несущие дополнительно одно или более случайно выбранных оснований на их 3’-концах. Набор полученных фрагментов зависит от рестриктаз и случайно выбранных нуклеотидов на 3’-концах праймеров (Vos et al., 1995). AFLP – генотипирование применяют для быстрого изучения генетической изменчивости различных организмов. Подробное описание метода приведено в работах Mueller, Wolfenbarger, 1999, Savelkoul et al., 1999. Большая работа, позволяющая сравнить разрешение методов AFLP и SSR, была проведена китайскими исследователяими. Были изучены фенотипические и генотипические особенности 48 изолятов *P. infestans*, собранные в пяти областях Северного Китая. По AFLP- спектрам было выявлено восемь различных генотипов ДНК, в отличие от SSR– генотипов, по которым разнообразия выявлено не было (Guo et al., 2008).

Амплификация с праймерами, гомологичными последовательностям мобильных элементов

Маркеры, полученные на основе последовательностей ретротранспозонов, очень удобны для генетического картирования, изучения генетического разнообразия и процессов эволюции (Schulman, 2006). Если сделать праймеры, комплиментарные стабильным последовательностям тех или иных мобильных элементов, можно амплифицировать

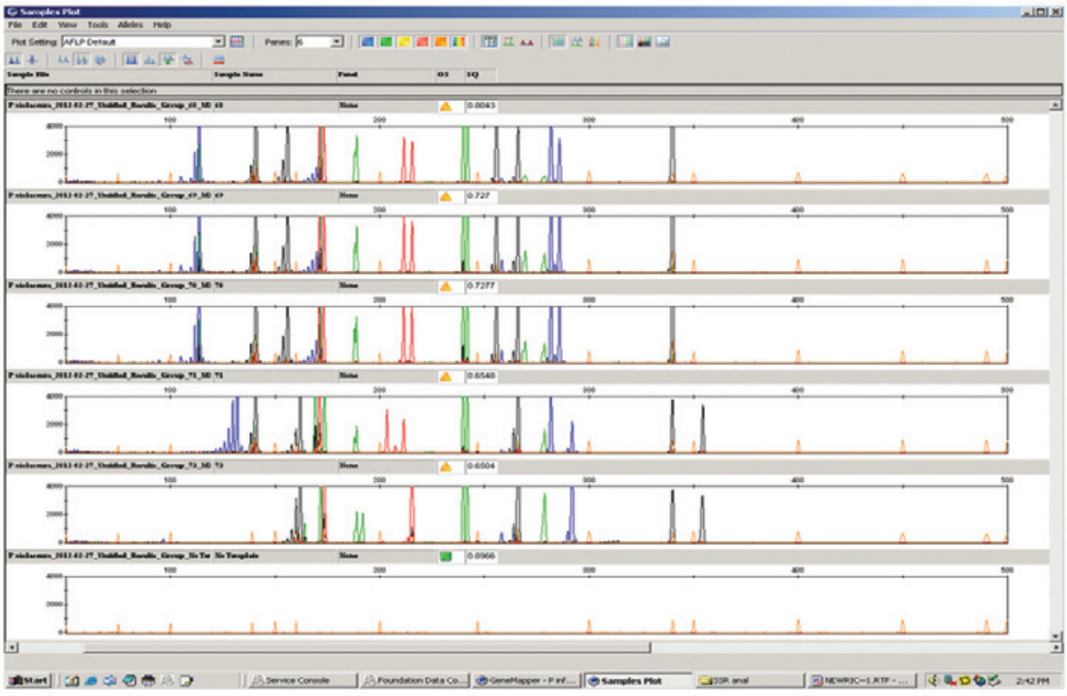

Рис. 6. Пример визуализации результатов микросателлитного анализа образцов *P. infestans* с использованием капиллярного ДНК-анализатора (нижняя строка без пиков – отрицательный контроль).

участки генома, находящиеся между ними. В исследованиях возбудителя фитофтороза успешно применялся метод амплификации участков генома с помощью праймера, комплиментарного коровой последовательности ретропазона SINE (Short Interspersed Nuclear Elements) (Лаврова, Еланский, 2003). С помощью данного метода выявлялись различия даже в бесполом потомстве одного изолята. В связи с этим был сделан вывод о высокой специфичности метода интер – SINE – ПЦР и высокой скорости перемещения SINE – элементов в геноме Phytophthora.

В геноме *P. infestans* выявлено 12 семейств коротких ретротранспозонов (SINEs); исследовано видовое распределение коротких ретротранспозонов, выявлены элементы (SINEs), которые встречаются в геноме только *P. infestans* (Лаврова, 2004).

Особенности применения методов сравнительного исследования штаммов в популяционных исследованиях

При планировании исследования надо четко представлять цели, которые оно преследует, и использовать соответствующие методы. Так, некоторые методы позволяют генерировать большое число независимых маркерных признаков, но при этом имеют низкую воспроизводимость и сильно зависят от используемых реактивов, условий реакции, загрязненности исследуемого материала. Поэтому в каждом исследовании группы штаммов необходимо использовать несколько стандартных (референтных) изолятов, но даже и в этом случае результаты нескольких экспериментов очень сложно объединить. К этой группе методов можно отнести RAPD, AFLP, InterSSR, InterSINE PCR. После амплификации получается большое число фрагментов ДНК разного размера. Подобные методики целесообразно использовать в случае необходимости установления различий между близкородственными штаммами (родители-потомки, дикий тип–мутанты, и т.д), либо в случаях, когда необходим детальный анализ небольшой выборки. Так, метод AFLP широко используется при генетическом картировании *P. infestans* (van der Lee et al., 1997) и при внутрипопуляционных исследованиях (Knapova, Gisi, 2002, Cooke et al, 2003, Flier et al, 2003). Такие методы нецелесообразно использовать при создании баз данных штаммов, т.к. практически невозможно унифицировать учет результатов при проведении анализов в разных лабораториях. При кажущейся простоте и быстроте исполнения (выделение ДНК без хорошей очистки, амплификация, визуализация результатов) эта группа методов требует применения специального метода документирования результатов: разгонки в полиакриламидном геле с мечеными (радиоактивно или люминисцентно) праймерами и последующей засветки свето- или радиоактивночувствительного материала. Обычный метод визуализации в агарозном геле с бромистым этидием для этих методов, как правило, непригоден, т.к. большое число фрагментов ДНК разного размера может сливаться.

Другие методы, напротив, позволяют генерировать малое число признаков при их очень высокой воспроизводимости. К этой группе можно отнести исследование гаплотипов митохондриальной ДНК (в России отмечены только два гаплотипа Ia и IIa), типа спаривания (большинство изолятов подразделяются на 2 типа: A1 и A2, редко встречаются самофертильные SF) и спектров изоферментов пептидазы (два локуса Pep1 и Pep2, состоящие из двух изозимов каждый) и глюкозо-6-фосфат изомеразы (в России вариабельности по этому признаку нет, хотя в других странах мира отмечается значительный полиморфизм). Эти признаки целесообразно использовать при анализе коллекций, составлении баз данных регионального и мирового масштаба. В случае анализа изоферментов и гаплотипов митохондриальной ДНК можно обойтись вообще без стандартных штаммов, в то время как при анализе типов спаривания необходимо два тестерных изолята с известными типами спаривания. Условия реакции и реактивы могут влиять только на контрастность продукта на электрофореграмме, проявление артефактов в этих видах исследований маловероятно.

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

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

Разработка RFLP-RG57 в начале 90-х годов прошлого века существенно активизировала популяционные исследования возбудителя фитофтороза. Он стал основой метода, основанного на выделении и анализе «Клональных линий» (см. ниже). Наряду с RFLP-RG57 для идентификации клональных линий применяют тип спаривания, фингерпринтинг ДНК (метод RFLP-RG57), спектры изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфатизомеразы и тип митохондриальной ДНК. Благодаря ему было показано

глобальное распространение клона US-1 (Goodwin et al., 1994), смена старых популяций новыми (Drenth et al, 1993, Sujkowski et al, 1994, Goodwin et al, 1995a), выявлены клональные линии, преобладающие во многих странах мира. Исследования российских штаммов с использованием этого метода показало высокий генотипический полиморфизм штаммов Европейской части и мономорфизм популяций Азиатской и Дальневосточной частей России (Elansky et al, 2001). И сейчас этот метод остается основным при проведении популяционных исследований *P. infestans*. Однако широкому его распространению препятствуют довольно высокая стоимость и трудоемкость в исполнении.

Другим перспективным методом, широко редко используемым в исследованиях *P. infestans*, является анализ микросателлитных повторов (SSR). В настоящее время этот метод щироко используется для выделения клональных линий. Для анализа штаммов широко использовались (и продолжают использоваться) такие фенотипические маркерные признаки, как наличие генов вирулентности к сортам картофеля (Авдей, 1995, Иванюк и др., 2002, Уланова и др., 2003) и томата. К настоящему времени гены вирулентности к сортам картофеля утратили свою ценность как маркерные признаки для популяционных исследований в связи с появлением максимального (или близкого к нему) числа генов вирулентности у подавляющего большинства изолятов. В то же время ген вирулентности T1 к сортам томата, несущим соответствующий ген Ph1, до сих пор успешно используется в качестве маркерного признака (Лаврова и др., 2003, Уланова и др., 2003).

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

Таким образом, предпочтительными маркерными признаками для создания банков данных и маркирования штаммов в коллекциях являются тип спаривания, спектр изоферментов пептидазы, тип митохондриальной ДНК, RFLP-RG57, SSR. Для сравнения ограниченных выборок, при необходимости применения максимального числа маркерных признаков, можно использовать AFLP, RAPD, InterSSR, Inter-SINE PCR (табл. 5). Однако следует помнить, что эти методы слабовоспроизводимы, и в каждом отдельном эксперименте (цикле амплификация – электрофорез) необходимо использовать несколько референтных изолятов.

Таблица 5. Сравнение различных методов исследования штаммов *P. infestans*

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

Прим.: *Н – низкая, С – средняя, В – высокая; НС* - трудоемкость низкая при использовании агарозного геля или автоматического генотайпера, средняя – при разгонке в полиакриламидном геле с мечеными праймерами,*
*** - не считая затрат времени на наращивание мицелия для выделения ДНК.*

СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ

Клональные линии

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

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

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

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

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

SIB-1 – клон, преобладавший в России на огромной территории от Московской области до Сахалина. В Московской области он был обнаружен в 1993 г., причем некоторые полевые популяции состояли преимущественно из штаммов этой клональной линии, высокоустойчивых к металаксилу. После 1993 г. распространенность этого клона существенно снизилась. За Уралом в 1997-1998 годах SIB-1 встречался повсеместно за исключением Хабаровского края (там распространен клон SIB-2). Пространственное разделение клонов, имеющих разные типы спаривания, исключает половой процесс на территории Сибири и Дальнего Востока. В Московской области, в отличие от Сибири, популяция представлена множеством клонов; почти каждый изолят имеет уникальный мультилокусный генотип (Elansky et al., 2001, 2015). Это разнообразие нельзя объяснить только завозом штаммов гриба из разных районов мира с импортируемым семенным материалом. Поскольку в популяции встречаются оба типа спаривания, возможно, ее разнообразие обусловлено также рекомбинацией. Так, в Британской Колумбии предполагается возникновение генотипов BC-2, BC-3 и BC-4 вследствие гибридизации клонов BC-1 и US-6 (Goodwin et al., 1995b). Возможно, и в Московских популяциях встречаются гибридные штаммы. Например, гетерозиготные по PEP-локусу штаммы MO-4, MO-8 и MO-11 могут быть гибридами между штаммами MO-12, MO-21, MO-22, имеющими тип спаривания A2 и гомозиготными по одной аллели PEP-локуса и штаммом MO-8, имеющим тип спаривания A1 и гомозиготным по другой аллели локуса. А если это так, и в современных популяциях *P. infestans* имеется тенденция к усилению роли полового процесса, то информационное значение анализа мультилокусных клонов будет падать (Elansky et al., 2001, 2015).

Изменчивость в клональных линиях

До 90-х годов 20 века в мире была широко распространена клональная линия US-1. Большинство полевых и региональных популяций состояли исключительно из штаммов с генотипом US-1. Однако при этом наблюдались и различия между изолятами, вызванные, вероятнее всего, мутационным процессом. Мутации происходили как в ядерной, так и в митохондриальной ДНК и затрагивали в том числе уровень устойчивости к фениламидным препаратам и число генов вирулентности. Линии, отличающиеся от исходных генотипов мутациями, обозначаются дополнительными цифрами после точки, следующей за названием исходного генотипа (например, мутантная линия US-1.1 клональной линии US-1). Фингерпринтинги ДНК линии US-1.5 и US-1.6 содержат добавочные линии разного размера (Goodwin et al., 1995a, 1995b); клональная линия US-6.3 также отличается от US-6 одной добавочной линией (Goodwin, 1997, табл. 7).

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

Таблица 6. Мультилокусные генотипы некоторых клональных линий *P. infestans*

Название	Тип спари-вания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК	Тип MtDNA
		GPI	PEP		
US-1	A1	86/100	92/100	101110101100110100011001 1	Ib
US-2	A1	86/100	92/100	101110100100110101111001 1	—
US-3	A1	86/100	92/100	101110000000110100011001 1	—
US-4	A1	100/100	92/92	101110100100110110011001 1	—
US-5	A1	100/100	92/100	101110100100110101111001 1	—
US-6	A1	100/100	92/100	101111100100110001011001 1	IIb
US-7	A2	100/111	100/100	100110000100110101011001 1	Ia
US-8	A2	100/111/122	100/100	10011000010011010001101 11	Ia
US-9	A1	100/100	83/100	—*	—
US-10	A2	111/122	100/100	—	—
US-11	A1	100/111	92/100	101011100100110101011001 1	IIb
US-12	A1	100/111	92/100	100010000100110001011001 1	—
US-14	A2	100/122	100/100	100000000000110001011001 1	—
US-15	A2	100/100	92/100	100010000100111001011001 1	Ia
US-16	A1	100/111	100/100	100011000100110101011001 1	—
US-17	A1	100/122	100/100	101000100000110101011001 1	—
US-18	A2	100/100	92/100	100010000100110100011001 1	Ia
US-19	A2	100/100	92/100	101010100000110100011001 1	Ia
EC-1	A1	90/100	96/100	11111010010011010001110 11	IIa
SIB-1	A1	100/100	100/100	100010001100110100011001 1	IIa
SIB-2	A2	100/100	100/100	100010000100110100011001 1	IIa
SIB-3	A1	100/100	100/100	110010101000110100011001 1	IIa
MO-1	A2	100/100	100/100	100010001100110100011001 1	IIa
MO-2	A2	100/100	100/100	100010000100110100011001 1	Ia
MO-3	A1	100/100	100/100	101010000100110100011001 1	IIa
MO-4	A1	100/100	92/100	10101110110011010001100 11	IIa
MO-5	A1	100/100	100/100	100010100100110101011001 1	IIa
MO-6	A1	100/100	100/100	101010100100110100011001 1	Ia
MO-7	A1	100/100	92/100	100010001100110000011001 1	IIa
MO-8	A1	100/100	92/92	101011000100110000011001 1	IIa
MO-9	A1	100/100	92/100	100010000100110100011001 1	IIa
MO-10	A1	100/100	100/100	101011000000110000011001 1	Ia
MO-11	A1	100/100	92/100	101010100100110000011001 1	Ia
MO-12	A2	100/100	100/100	101010100100110100011001 1	Ia
MO-13	A1	100/100	100/100	101010100000110100011001 1	Ia
MO-14	A1	100/100	100/100	001010100100110000011001 1	Ia
MO-15	A1	100/100	100/100	01101110010011000101100 11	Ia
MO-16	A1	100/100	100/100	100010000000110100011001 1	IIa
MO-17	A1	86/100	100/100	101010101100110100011001 1	Ib
MO-18	A1	100/100	100/100	10101110010011010000100 11	IIa
MO-19	A1	100/100	100/100	101010100000110101011001 1	IIa
MO-20	A2	100/100	100/100	101010100000110100011001 1	IIa
MO-21	A2	100/100	100/100	101010100000110001011001 1	IIa

Прим.: * – *нет данных.*

Таблица 7. Мультилокусные генотипы и их мутантные линии

Название	Тип спаривания	Изоферменты		Фингерпринты ДНК (RG57)	Примечания
		GPI	PEP-1		
US-1	**A1**	**86/100**	**92/100**	**1011101011001101000110011**	Исходный генотип 1
US-1.1	A1	86/100	**100**/100	1011101011001101000110011	Мутация в PEP
US-1.2	A1	86/100	92/100	1011101010001101000110011	Мутация в RG57
US-1.3	A1	86/100	92/100	1011101001001101000110011	Мутация в RG57
US-1.4	A1	86/100	**100**/100	1011101010001101000110011	Мутация в RG57 и PEP
US-1.5	A1	86/100	92/100	1011101011001101010110011	Мутация в RG57
US-6	**A1**	**100/100**	**92/100**	**1011111001001100010110011**	Исходный генотип 2
US-6.1	A1	100/100	92/**92**	1011111001001100010110011	Мутация в PEP
US-6.2	A1	100/100	92/100	1011110100100110001011 0011	Мутация в RG57
US-6.3	A1	100/100	92/100	1011111001011100010110011	Мутация в RG57
US-6.4	A1	100/100	**100**/100	1011011100100110001011 0011	Мутация в RG57 и PEP
US-6.5	A1	100/100	92/100	1011111001001100010010011	Мутация в RG57
BR-1	**A2**	**100/100**	**100/100**	**1011101000001100001111011**	Исходный генотип 3
BR-1.1	A2	100/100	100/100	1010101000001100001110011	Мутация в RG57

Также встречаются изменения в спектрах изоферментов. Как правило, они вызваны распадом исходно гетерозиготного по этому ферменту организма на гомозиготные. В 1993 году на плодах томата нами был идентифицирован штамм с характерными для US-1 признаками: фингерпринтингом RG57, типом митохондриальной ДНК и генотипом 86/100 по глюкозо-6-фосфатизомеразе, но он был гомозиготен (100/100) по первому локусу пептидазы вместо типичной для этой клональной линии гетерозиготы 92/100. Генотип этого штамма мы назвали MO-17 (табл. 6). Мутантные линии US-1.1 и US-1.4 также отличаются от US-1 мутациями в первом локусе пептидазы (табл. 7).

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

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

Современные популяции *P. infestans*

Центральная Америка (Мексика)

Популяция *P. infestans* в Мексике заметно отличается от прочих мировых популяций, что связано, в первую очередь, с ее историческим положением. Многочисленные исследования этой популяции и родственных *P. infestans* видов клады *Phytophthora*, а также местных видов рода *Solanum*, позволили сделать вывод о том, что эволюция патогена в центральной части Мексики происходила совместно с эволюцией растений-хозяев и была связана с половой рекомбинацией (Grünwald, Flier, 2005). В популяции представлены оба типа спаривания, причем в равном соотношении, а присутствие ооспор в почве, на растениях и клубнях картофеля и дикорастущих родственных видов *Solanum* подтверждает наличие в популяции полового процесса (Fernández-Pavía et al., 2002). Недавно проведенные исследования долины Толука и ее окрестностей (предположительный центр происхождения патогена) подтвердили высокое генетическое разнообразие местной популяции *P. infestans* (134 мультилокусных генотипа в выборке из 176 образцов) и наличие в регионе нескольких дифференцированных субпопуляций (Wang et al., 2017). Факторами, способствующими такой дифференциации, являются пространственное разделение субпопуляций, характерное для гористой местности центральной Мексики, различия в условиях культивации и сортах картофеля, используемых в долинах и горах, а также наличие дикорастущих клубненосных видов Solanum, способных выступать в качестве альтернативных хозяев (Fry et al., 2009). Следует, однако, отметить, что популяции *P. infestans* в Северной Мексике носят скорее клональный характер и больше похожи на североамериканские популяции, что, возможно, говорит о том, что именно

они являются источником мигрирующих в США новых генотипов (Fry et al., 2009).

Северная Америка

Североамериканские популяции *P. infestans* всегда отличались очень простой структурой и их клональный характер был установлен задолго до начала применения микросателлитного анализа. Вплоть до 1987 г. на территории США и Канады доминировала клональная линия US-1 (Goodwin et al., 1995). В середине 70-х гг, когда появились фунгициды на основе металаксила, этот клон начал вытесняться другими, более устойчивыми генотипами, мигрировавшими из Мексики (Goodwin et al., 1998). К концу 90-х гг. генотип US-8 полностью вытеснил в США генотип US-1 и стал доминирующей клональной линией на картофеле (Fry et al., 2009; Fry et al., 2015). Иная ситуация сложилась с томатами, на которых постоянно присутствовало несколько клональных линий, причем их состав год от года менялся (Fry et al., 2009).

В 2009 г. в США разразилась масштабная эпидемия фитофтороза на томатах. Особенностью этой пандемии стало практически одновременное ее начало во многих местах северо-восточной части США, причем она оказалась связана с массовыми продажами зараженной рассады томатов в крупных садовых центрах (Fry et al., 2013). Потери урожая оказались огромными. Микросателлитный анализ пораженных образцов позволил установить, что пандемичный штамм принадлежал к клональной линии US-22 A2-типа спаривания. В 2009 г. доля этого генотипа в американской популяции P. infestans достигла 80% (Fry et al., 2013). В последующие годы в популяции неуклонно увеличивалась доля агрессивных генотипов US-23 (преимущественно на томатах) и US-24 (на картофеле), однако после 2011 г. частота выявления US-24 существенно снизилась, и к настоящему времени около 90% популяции патогена в США представлено генотипом US-23 (Fry et al., 2015).

В Канаде, как и в США, в конце 90-х гг. доминировавший генотип US-1 был вытеснен US-8, доминирующие позиции которого оставались незыблемыми до 2008 г. В 2009-2010 гг. в Канаде случились серьезные эпидемии фитофтороза, связанные с продажами зараженной рассады томата, но вызваны они были генотипами US-23 и US-8 (Kalischuk et al., 2012). Примечательным оказалось четкое географическое разграничение этих генотипов: US-23 доминировал в западных провинциях Канады (68%), в то время как US-8 господствовал в восточных провинциях (83%). В последующие годы US-23 распространился в восточные регионы, однако в целом его доля в популяции несколько снизилась на фоне появления в стране генотипов US-22 и US-24 (Peters et al., 2014). К настоящему времени US-23 сохраняет доминирующие позиции на территории всей Канады; US-8 присутствует в Британской Колумбии, а US-23 и US-24 – в Онтарио (Peters, 2017).

Таким образом, североамериканские популяции *P. infestans* представляют собой, в-основном, клональные линии. За последние 40 лет число обнаруженных клональных генотипов достигло 24. Несмотря на то, что в популяции присутствуют штаммы обоих типов спаривания, вероятность появления новых генотипов в результате половой рекомбинации остается достаточно низкой. Тем не менее, в последние 20 лет было зафиксировано несколько случаев появления эфемерных рекомбинантных популяций (Gavino et al., 2000; Danies et al., 2014; Peters et al., 2014), причем в одном случае результатом скрещивания стал генотип US-11, на долгие годы закрепившийся в Северной Америке (Gavino et al., 2000). До 2009 г. изменения в структуре популяций были связаны с появлением новых, более агрессивных генотипов с их последующей миграцией и вытеснением ранее доминировавших предшественников. Случившиеся в 2009-2010 гг. в США и Канаде эпифитотии впервые показали, что в эпоху глобализации вспышки болезни могут быть связаны и с активным распространением новых генотипов при продажах зараженного посадочного материала.

Южная Америка

Вплоть до последнего времени исследования южноамериканских популяций *P. infestans* не отличались ни регулярностью, ни масштабностью. Известно, что структура этих популяций достаточно проста и включает 1-5 клональных линий на страну (Forbes et al., 1998). Так, к 1998 г. на картофеле были обнаружены генотипы US-1 (Бразилия, Чили) BR-1 (Бразилия, Боливия, Уругвай, Парагвай), EC-1 (Эквадор, Колумбия, Перу и Венесуэла), AR-1, AR-2, AR-3, AR-4 и AR-5 (Аргентина), PE-3 и PE-7 (южная часть Перу). Тип спаривания A2 присутствовал в Бразилии, Боливии и Аргентине и не обнаруживался далее боливийско-перуанской границы в районе озера Титикака, за которой в Андах доминировал генотип EC-1 A1-типа. На томатах доминирующим генотипом во всей Южной Америке оставался US-1. Ситуация более-менее сохранялась и в 2000-х гг. Важным моментом стало обнаружение в Северных Андах на дикорастущих родственниках картофеля (*S. brevifolium* и *S. tetrapetalum*) новой клональной линии EC-2 A2-типа (Oliva et al., 2010). Филогенетические исследования показали, что эта линия не является полностью идентичной *P. infestans*, хотя и близкородственна ей, в связи с чем было предложено считать ее, а также еще одну линию, EC-3, выделенную с произрастающего в Андах томатного дерева *S. betaceum*, новым видом, получившим название *P. andina*; однако статус этого вида (самостоятельный вид или гибрид *P. infestans* с какой-то еще неизвестной линией) пока все же остается неясен (Delgado et al., 2013).

В настоящее время все южноамериканские популяции *P. infestans* являются клональными. Несмотря на присутствие обоих типов спаривания рекомбинантных популяций выявлено не было. На томатах повсеместно присутствует генотип US-1, по-видимому, вытесненный с картофеля локальными штаммами, точное происхождение которых пока неизвестно. В Бразилии, Боливии и Уругвае присутствует генотип BR-1; в Перу, наряду с US-1 и EC-1, существует несколько других локальных генотипов. В Андах доминирующую

позицию сохраняет клональная линия EC-1, взаимоотношения которой с недавно обнаруженной *P. andina* пока остаются неизученными. Единственным «нестабильным» местом, где за период 2003-2013 гг. происходили существенные изменения популяции, стал Чили (Acuña et al., 2012), где в 2004-2005 гг. популяция патогена стала характеризоваться устойчивостью к металаксилу и новым гаплотипом митохондриальной ДНК (Ia вместо ранее присутствовавшего Ib). С 2006 по 2011 гг. в популяции доминировал генотип 21 (по SSR), доля которого достигала 90%, после чего пальма первенства перешла к генотипу 20, частота встречаемости которого в последующие два года удерживалась на уровне около 67% (Acuña, 2015).

Европа

В истории Европы было, как минимум, две волны миграции *P. infestans* из Северной Америки: в XIX в. (HERB-1) и начале XX века (US-1). Повсеместное распространение металаксилсодержащих фунгицидов в 70-х гг. привело к вытеснению доминировавшего генотипа US-1 и замене его новыми генотипами. В результате в большинстве стран Западной Европы популяции патогена были представлены, в основном, несколькими клональными линиями.

Использование микросателлитного анализа для анализа популяций патогена позволило выявить серьезные изменения, произошедшие на территории Западной Европы в 2005-2008 г. В 2005 г. в Великобритании была обнаружена новая клональная линия, получившая название 13_A2 (или “Blue 13”) и характеризовавшаяся типом спаривания A2, высокой агрессивностью и устойчивостью к фениламидам (Shaw et al., 2007). Этот же генотип был обнаружен в образцах, собранных в 2004 г. в Нидерландах и Северной Франции, что дало основания предположить его миграцию в Великобританию с территории континентальной Европы, возможно, с семенным картофелем (Cooke et al., 2007). Исследование генома представителей этой клональной линии показало высокую степень полиморфизма его последовательности (к 2016 г. число его субклональных вариаций достигло 340) и значительную степень вариации уровня экспрессии генов, в т.ч. генов-эффекторов, в процессе инфицирования растений (Cooke et al., 2012; Cooke, 2017). Эти особенности, наряду с увеличенной продолжительностью биотрофной фазы, могли стать причиной повышенной агрессивности 13_A2 и его способности поражать даже устойчивые к фитофторозу сорта картофеля.

В последующие несколько лет генотип стремительно распространился по странам северо-западной Европы (Великобритания, Ирландия, Франция, Бельгия, Нидерланды, Германия) с одновременным вытеснением ранее доминировавших там генотипов 1_A1, 2_A1, 8_A1 (Montarry et al., 2010; Gisi et al., 2011; Van den Bosch et al., 2011; Cooke, 2015; Cooke, 2017). По данным сайта www.euroblight.net, доля 13_A2 в популяциях упомянутых стран достигала 60-80% и выше; присутствие этого генотипа было также зафиксировано в некоторых странах Восточной и Южной Европы. Однако в 2009-2012 гг. 13_A2 потерял доминирующие позиции в Великобритании и Франции, уступив линии 6_A1 (в Ирландии – 8_A1), а в Нидерландах и Бельгии был частично замещен генотипами 1_A1, 6_A1 и 33_A2 (Cooke et al., 2012; Cooke, 2017; Stellingwerf, 2017).

К настоящему времени около 70% западноевропейской популяции *P. infestans* является моноклональной. Согласно данным сайта www.euroblight.net, доминирующими генотипами в странах Северо-западной Европы (Великобритания, Франция, Нидерланды, Бельгия) остаются, примерно в равном соотношении, 13_A2 и 6_A1, причем последний практически не встречается за пределами указанного региона (за исключением Ирландии), но насчитывает уже не менее 58 субклонов (Cooke, 2017). Вариации 13_A2 в заметном количестве присутствуют в Германии, а также спорадически отмечаются в странах Центральной и Южной Европы. Генотип 1_A1 составляет существенную часть популяций Бельгии и частично Нидерландов и Франции. Генотип 8_A1 стабилизировался в европейской популяции на уровне 3-6%, за исключением Ирландии, где он сохраняет лидирующие позиции и разделился на два субклона (Stellingwerf, 2017). Наконец, в 2016 г. отмечено увеличение частоты встречаемости новых генотипов 36_A2 и 37_A2, впервые зарегистрированных в 2013-2014 гг.; к настоящему времени эти генотипы встречаются на территории Нидерландов и Бельгии и частично Франции и Германии, а также в южной части Великобритании (Cooke, 2017). Примерно 20-30% западноевропейской популяции ежегодно представлено уникальными генотипами.

В отличие от Западной Европы, к моменту появления генотипа 13_A2, популяции Северной Европы (Швеция, Норвегия, Дания, Финляндия) были представлены не клональными линиями, а большим количеством уникальных генотипов (Brurberg et al., 2011). В период активного распространения 13_A2 по странам Западной Европы присутствие этого генотипа в Скандинавии не было отмечено вплоть до 2011 г., когда он впервые был обнаружен в Северной Ютландии (Дания), где выращивают, в основном, промышленные сорта картофеля с активным использованием металаксил-содержащих фунгицидов (Nielsen et al., 2014). Согласно данным сайта www.euroblight.net, генотип 13_A2 был также обнаружен в нескольких образцах из Норвегии и Дании в 2014 г. и в нескольких норвежских образцах в 2016 г.; кроме того, в 2013 г. в Финляндии было отмечено присутствие в незначительном количестве генотипа 6_A1. Основной причиной неудачи 13_A2 и других клональных линий в завоевании Скандинавии считаются климатические отличия этого региона от стран Западной Европы. Помимо того, что прохладное лето и холодная зима способствуют выживанию не столько вегетативного мицелия, сколько ооспор (Sjöholm et al., 2013), замерзание почвы в зимний период (чего обычно не происходит в более теплых странах Западной Европы) способствует синхронизации прорастания ооспор и посадки картофеля, что усиливает их роль как источника первичной инфекции (Brurberg et

al., 2011). Следует также отметить, что в условиях севера развитие инфекции из ооспор опережает развитие клубневой инфекции, что, в конечном итоге, предотвращает доминирование пусть даже более агрессивных, но позднее развившихся клональных линий (Yuen, 2012).

Структура наиболее исследованных популяций *P. infestans* в странах Восточной Европы (Польша, Прибалтика) весьма сходна с таковой в Скандинавии. Здесь также присутствуют оба типа спаривания и подавляющее большинство генотипов, определенных при помощи SSR анализа, являются уникальными (Chmielarz et al., 2014; Runno-Paurson et al., 2016). Как и в Северной Европе, распространение клональных линий (в первую очередь генотипа 13_A2) практически не затронуло локальные популяции патогена, сохраняющие высокий уровень разнообразия с отсутствием выраженных доминантных линий. Присутствие 13_A2 эпизодически отмечается на полях с коммерческими сортами картофеля. В России ситуация складывается аналогичным образом. Микросателлитный анализ изолятов *P. infestans*, собранных в 2008-2011 гг. в 10 различных регионах европейской части России, показал высокую степень генотипического разнообразия и полное отсутствие совпадений с европейскими клональными линиями (Statsyuk et al., 2014). Проведенное спустя несколько лет исследование образцов *P. infestans*, собранных в Ленинградской области в 2013-2014 гг., показало существенные различия между ними и выявленными в предыдущем исследовании генотипами из этой области. В обоих исследованиях западноевропейских генотипов обнаружено не было (Beketova et al., 2014; Кузнецова и др., 2016).

Высокое генетическое разнообразие восточноевропейских популяций *P. infestans* и отсутствие в них доминирующих клональных линий может быть связано с несколькими причинами. Во-первых, как и в Северной Европе, климатические условия рассмотренных стран способствуют формированию ооспор в качестве первичного источника инфекции (Уланова и др., 2010; Chmielarz et al., 2014). Во-вторых, существенная доля картофеля, производимая в данных странах, выращивается в мелких частных хозяйствах, зачастую окруженных лесами или иными препятствиями для свободного перемещению инфекционного материала (Chmielarz et al., 2014). Как правило, картофель, выращиваемый в таких условиях, практически не обрабатывается химическими препаратами, а выбор сортов основывается на их фитофтороустойчивости, т.е. отсутствует селективное давление по агрессивности и устойчивости к металаксилу, что лишает устойчивые генотипы, такие как 13_A2, преимущества перед остальными генотипами (Chmielarz et al., 2014). Наконец, из-за небольших размеров земельных участков, их собственники обычно не практикуют севооборот, годами выращивая картофель на одном и том же месте, что способствует накоплению генетически разнообразного инокулюма (Runno-Paurson et al., 2016; Еланский, 2015; Elansky et al., 2015).

Азия

Вплоть до последнего времени структура популяций *P. infestans* в Азии оставалась относительно малоизученной. Было известно, что она представлена преимущественно клональными линиями, а влияние половой рекомбинации на появление новых генотипов весьма мало. Так, например, в 1997-1998 гг. в азиатской части России (Сибирь и Дальний Восток) популяция патогена была представлена лишь тремя генотипами с преобладанием генотипа SIB-1 (Elansky et al., 2001). Присутствие клональных линий патогена было показано в таких странах как Китай, Япония, Корея, Филиппины и Тайвань (Koh et al., 1994; Chen et al., 2009). Доминировавшая на большой территории Азии клональная линия US-1 в конце 90-х – начале 2000-х гг. практически повсеместно начала вытесняться другими генотипами, которые, в свою очередь, уступали место новым. В большинстве случаев изменения в структуре и составе популяций в азиатских странах были связаны с миграцией новых генотипов извне. Так, в Японии за исключением генотипа JP-3, все остальные японские генотипы, появившиеся после US-1 (JP-1, JP-2, JP-3), имеют более или менее доказанное внешнее происхождение (Akino et al., 2011). В Китае к настоящему моменту существует три основных популяции патогена, имеющих четкое географическое разделение; переток генов между этими популяциями отсутствует или очень слаб (Guo et al., 2010; Li et al., 2013b). Генотип 13_A2 появился на территории Китая в его южных провинциях (Юннань и Сычуань) в 2005-2007 гг., а в 2012-1014 гг. был также замечен на северо-востоке страны (Li et al., 2013b). В Индии 13_A2 появился предположительно в то же время, что и в Китае, скорее всего, с зараженным семенным картофелем (Chowdappa et al., 2015), и в 2009-2010 гг. вызвал серьезную эпифитотию фитофтороза на томате на юге страны, после чего распространился на картофель и в 2014 г. стал причиной вспышки фитофтороза в Западной Бенгалии, приведшей к разорению и самоубийствам многих местных фермеров (Fry, 2016).

Африка

Вплоть до 2008-2010 гг. систематические исследования *P. infestans* в странах Африки не проводились. В настоящий момент африканские популяции *P. infestans* могут быть разделены на две группы, причем это разделение четко ассоциировано с фактом импорта семенного картофеля из Европы. В Северной Африке, активно импортирующей семенной картофель из Европы, практически во всех регионах широко представлен тип спаривания A2, что обеспечивает теоретическую возможность появления новых генотипов в результате половой рекомбинации (Corbière et al., 2010; Rekad et al., 2017). Кроме того, в Алжире отмечается присутствие генотипов 13_A2, 2_A1 и 23_A1 с выраженным доминированием первого из них, а также постепенное снижение до полного исчезновения доли уникальных генотипов (Rekad et al., 2017). В отличие от остальной части региона, в Тунисе (за исключением северо-востока страны) популяция патогена представлена преимущественно

типом спаривания A1 (Harbaoui et al., 2014). Доминирующей здесь является клональная линия NA-01. В целом доля клональных линий в популяции составляет лишь 43%. В Восточной и Южной Африке, где объемы импорта семенного материала исчезающе малы (Fry et al., 2009), *P. infestans* представлена лишь двумя клональными линиями A1-типа, US-1 и KE-1, причем последняя активно вытесняет первую на картофеле (Pule et al., 2012; Njoroge et al., 2016). К настоящему времени оба этих генотипа имеют заметное количество субклональных вариаций.

Австралия

Первое сообщение о проявлении фитофтороза на картофеле в Австралии датируется 1907 г., а первая эпифитотия, предположительно вызванная сильными дождями в летние месяцы, случилась в 1909-1911 гг. (Drenth et al., 2002). В целом, однако, фитофтороз не имеет существенного экономического значения для страны. Спорадические вспышки фитофтороза, спровоцированные погодными условиями, обеспечивающими повышенную влажность, случаются не чаще раза в 5-7 лет и локализованы преимущественно в северной Тасмании и центральной части провинции Виктория. В связи с вышеизложенным, публикации, посвященные изучению структуры австралийской популяции *P. infestans*, практически отсутствуют. Последняя доступная информация относится к 1998-2000 гг. (Drenth et al., 2002). Согласно данным авторов, популяция штата Виктория представляла собой клональную линию US-1.3, что косвенно подтверждало миграцию этого генотипа из США. Тасманийские же образцы были выделены в тип AU-3, отличный от генотипов, присутствовавших на тот момент в других частях света.

Особенности развития фитофтороза в России

В Европе в качестве первичного инокулюма на картофеле рассматривают инфекцию, привнесенную с больными семенными клубнями, перезимовавшие в почве ооспоры, а также зооспорангии, принесенные ветром с растений, выросших из перезимовавших клубней на прошлогодних полях («волонтерные» растения), либо на кучах отбракованных при закладке на хранение клубней. Из них наиболее опасным источником инфекции считаются растения, выросшие на кучах отбракованных клубней, т.к. там количество проросших клубней часто значительно, и зооспорангии могут с них разноситься на большие расстояния. Остальные источники (ооспоры, «волонтерные» растения) не столь опасны, т.к. растения не принято выращивать на одних и тех же полях чаще, чем один раз в 3-4 года. Инфекция от больных семенных клубней также минимальна в связи с хорошей системой контроля качества семенного материала.

В целом, количество инокулюма в европейских популяциях ограничено, в связи с чем нарастание эпидемии происходит достаточно медленно и поддается успешному контролю с помощью химических фунгицидных препаратов. Основной задачей в европейских условиях становится борьба с инфекцией в той фазе, когда начинается массовый разлет зооспорангиев с пораженных растений.

В России ситуация кардинально другая. Большая часть урожая картофеля и томата выращивается на небольших частных огородах; защитные мероприятия на них либо вообще не проводятся, либо фунгицидные обработки проводятся в недостаточном числе и начинаются уже после появления фитофтороза на ботве. В результате частные огороды выступают как основной источник инфекции, с них зооспорангии ветром переносятся на коммерческие посадки. Это подтверждается нашими прямыми наблюдениями в Московской, Брянской, Костромской, Рязанской областях: поражение растений на частных огородах наблюдается еще до начала обработок фунгицидами коммерческих посадок. Впоследствии эпидемия на крупных полях сдерживается применением фунгицидных препаратов, в то время как на частных огородах наблюдается бурное развитие фитофтороза. В случае неправильных или «бюджетных» обработок коммерческих посадок очаги фитофтороза появляются и на полях; в дальнейшем они активно развиваются, захватывая все большие площади (Еланский, 2015).

Инфекция, развивающаяся на частных огородах, оказывает существенное влияние на эпидемии на коммерческих полях. Во всех картофелеводческих регионах России площадь, занятая картофелем на частных огородах, в разы превосходит суммарную площадь полей крупных производителей. В таких условиях частные огороды можно рассматривать как глобальный ресурс инокулюма для коммерческих полей. Попробуем выявить те свойства, которые характерны для генотипов штаммов на частных огородах.

Посадка не прошедшего семенной и карантинный контроль продовольственного картофеля, семян томата, полученных от сомнительных зарубежных производителей, многолетнее выращивание картофеля и томата на одних и тех же площадях, неправильные обработки фунгицидами или их полное отсутствие приводят к тяжелым эпифитотиям в частном секторе, следствием которых является свободное скрещивание, гибридизация и образование ооспор на частных огородах. В результате наблюдается очень высокое генотипическое разнообразие патгена, когда практически каждый штамм уникален по своему генотипу (Elansky et al., 2001, 2015). Посадка семенного картофеля различного генетического происхождения делает маловероятным появление клональных линий, специализированных к поражению какого-либо сорта. Штаммы, селектирующиеся в подобном случае, отличаются универсальностью по отношению к поражаемым сортам, большинство из них имеют близкое к максимальному число генов вирулентности. Это сильно отличается от системы «клональных линий», типичных для крупных полей сельхозорганизаций с правильно поставленной системой защиты от фитофтороза. «Клональные линии» (когда все штаммы возбудителя фитофтороза на поле представлены одним или несколькими генотипами) повсеместно распространены в странах, где картофелеводство ведется исключительно крупными хозяйствами: США, Нидерланды,

Дания и др. В Англии, Ирландии, Польше, где также традиционно распространено приусадебное картофелеводство, тоже отмечается более высокое генотипическое разнообразие на частных огородах. «Клональные линии» в конце 20 века были широко распространены в Азиатской и Дальневосточной частях России (Elansky et al., 2001), что, по-видимому, связано с использованием для посадки исключительно картофеля собственного производства одних и тех же сортов. Последнее время ситуация в этих регионах также начала меняться в сторону повышения генотипического разнообразия популяций.

Отсутствие интенсивных обработок фунгицидными препаратами имеет и другое, прямое следствие – на огородах не происходит накопления устойчивых штаммов. Действительно, наши результаты показывают, что на частных огородах значительно реже, чем на коммерческих посадках, выявляются устойчивые к металаксилу штаммы.

Типичное для частных огородов близкое соседство посадок картофеля и томата облегчает миграцию штаммов между этими культурами, в результате чего в последнее десятилетие среди штаммов, выделяемых с картофеля, повысилась доля штаммов, несущих ген устойчивости к сортам вишневидного томата (T1), ранее характерный только для «томатных» штаммов. Штаммы с геном T1 в большинстве случаев оказываются высокоагрессивными по отношению как к картофелю, так и к томату.

В последние годы фитофтороз на томате стал проявляться во многих случаях раньше, чем на картофеле. Источником заражения рассады томата могут быть ооспоры, находящиеся в почве, либо ооспоры, присутствующие в семенах томата, или прилипшие к ним (Rubin et al., 2001). В последние 15 лет в магазинах появилось большое количество недорогих фасованных семян, преимущественно импортного производства, на использование которых и перешла большая часть мелких производителей. С семенами могут приходить штаммы с генотипами, типичными для регионов их выращивания. В дальнейшем эти генотипы включаются в половой процесс на частных огородах, что ведет к появлению совершенно новых генотипов.

Таким образом, можно констатировать, 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 выступать источником инфекции на следующий год. Все это приводит к очень высокому генотипическому разнообразию приусадебных популяций. В условиях эпифитотии на огородах происходит очень 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 инициировать эпифитотию на поле, что связано с отсутствием устойчивых к фунгицидам и специализированных к выращиваемому сорту клональных линий.

Другим источником первичного инокулюма могут быть пораженные клубни, попавшие в коммерческие посадки с семенным материалом. Эти клубни были выращены, как правило, на полях с хорошей агротехникой и интенсивной химзащитой. Генотипы изолятов, поразивших клубни, адаптированы к развитию на своём сорте. Эти штаммы значительно опаснее для коммерческих посадок чем инокулюм, происходящий с частных огородов. В пользу этого предположения говорят и результаты наших исследований. Популяции, выделенные с крупных полей с правильно проводимой химзащитой и хорошей агротехникой не отличаются высоким генотипическим разнообразием. Часто это несколько клональных линий, отличающихся высокой агрессивностью.

Штаммы с коммерческого семенного материала могут попасть в популяции на огородах и включиться в процессы, идущие в них. Однако в условиях огорода их конкурентоспособность будет значительно ниже, чем на коммерческом поле, и вскоре они перестанут существовать в виде клональной линии, но их гены могут быть использованы в «огородной» популяции.

Инфекция, развивающаяся на «волонтерных» растениях и на кучах отбракованных при уборке клубней для России не столь актуальна, т.к. в основных картофелеводческих регионах России наблюдается глубокое зимнее промерзание почвы, и растения из перезимовавших в почве клубней развиваются редко. Более того, как показывают наши эксперименты, возбудитель фитофтороза не выживает при отрицательных температурах даже на сохранивших жизнеспособность клубнях. В аридной зоне, где практикуется выращивание раннего картофеля, фитофтороз встречается достаточно редко из-за сухого и жаркого сезона вегетации.

Таким образом, в настоящее время мы наблюдаем разделение популяций *P. infestans* на «полевые» и «огородные». Однако последние годы наблюдаются процессы, ведущие к сближению и взаимопроникновению генотипов из этих популяций. Среди них можно отметить общее повышение грамотности мелких производителей, появление доступных мелких фасовок семенного картофеля, распространение фунгицидных препаратов в мелкой фасовке, утрата населением страха перед «химией». Возникают ситуации, когда благодаря активной деятельности одного поставщика целые поселки оказываются засаженными семенными клубнями одного сорта и обеспечены мелкими фасовками одних и тех же пестицидов. Вполне можно предположить, что картофель того же сорта окажется и на коммерческих посадках поблизости.

С другой стороны, некоторые торгующие пестицидами компании продвигают «бюджетные»

схемы химобработок. В этом случае количество рекомендуемых обработок занижается и предлагаются самые дешевые фунгициды, причем упор делается не на недопущение развития фитофтороза вплоть до скашивания ботвы, а на некоторую задержку эпифитотии с целью увеличения выхода урожая. Такие схемы экономически обоснованы при выращивании продовольственного картофеля из низкосортного семенного материала, когда о получении высокого урожая речь в принципе не идет. Однако в этом случае, в отличие от огородных популяций, выровненный генетический фон картофеля способствует отбору специфических физиологических рас, очень опасным для данного сорта.

В целом, тенденции к сближению «огородного» и «полевого» способов производства картофеля представляются нам довольно опасными. Для предотвращения их негативных последствий как в приусадебном, так и в коммерческом секторе потребуется как контроль сортимента семенного картофеля и ассортимента фунгицидов, предлагаемых частникам в мелкой фасовке, так и отслеживание схем защиты картофеля и применения фунгицидных препаратов в коммерческом секторе.

На участках частного сектора наблюдается интенсивное развитие не только фитофтороза, но и альтернариоза. Большинство владельцев ЛПХ специальных мер для защиты от альтернариоза не предпринимают, принимая развитие альтернариоза за естественное увядание ботвы или развитие фитофтороза. Поэтому при массовом развитии альтернариоза на восприимчивых сортах приусадебные участки могут служить источником инокулюма и для коммерческих посадок.

МЕХАНИЗМЫ ИЗМЕНЧИВОСТИ

Мутационный процесс

Поскольку возникновение мутаций – случайный процесс, протекающий с низкой частотой, возникновение мутаций по какому-либо локусу зависит от частоты мутирования этого локуса и численности популяции. При изучении частоты мутаций штаммов *P. infestans* обычно определяют численность колоний, выросших на селективных питательных средах после обработки химическими или физическими мутагенами. Как видно из представленных в таблице 8 данных, частота мутирования одного и того же штамма по разным локусам может различаться на несколько порядков. Высокая частота мутаций устойчивости к металаксилу может быть одной из причин накопления резистентных к нему штаммов в природе.

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

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

Таблица 8. Частота мутаций *P. infestans* к ростингибирующим веществам под действием нитрозометилмочевины (Долгова, Дьяков, 1986; Bagirova et al., 2001)

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

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

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

образовании одноядерных зооспор.

Размеры популяций также играют решающую роль в появлении спонтанных мутаций. В очень больших популяциях, в которых численность клеток N>1/a, где a – скорость мутирования, мутация перестает быть случайным явлением (Квитко, 1974). Расчеты показывают, что при средней зараженности картофельного поля (35 пятен на одном растении) на одном гектаре ежедневно формируется $8x10^{12}$ спор (Дьяков, Супрун, 1984). По-видимому, в таких популяциях встречаются все дозволенные типом обмена мутации по каждому локусу. Даже редкая мутация, возникающая с частотой 10^{-9}, будет обретена тысячью особей из миллионов, обитающих на одном гектаре картофельного поля. Для мутаций, возникающих с более высокой частотой (например, 10^{-6}), в такой популяции могут ежедневно возникать разнообразные парные мутации (одновременно по двум локусам), т.е. мутационный процесс заменит рекомбинацию.

Миграции

Для *P. infestans* известны два главных типа миграции: на близкие расстояния (в пределах картофельного поля или соседних полей) путем разноса зооспорангиев воздушными токами или дождевыми брызгами, и на дальние расстояния – с посадочными клубнями или перевозимыми плодами томата. Первый способ обеспечивает расширение очага болезни, второй – создание новых очагов в местах, удаленных от первичного. Распространение инфекции с клубнями и плодами томата не только способствует возникновению болезни в новых местах, но и является основным источником генетического разнообразия популяций. В Московской области выращивается картофель, привезенный из разных регионов России и Западной Европы. Плоды томата привозятся из южных регионов России (Астраханская обл., Краснодарский край, Северный Кавказ). Семена томата, которые тоже могут служить источниками инфекции (Rubin et al., 2001), также привозятся из южных регионов России, Китая, государств Европы и других стран.

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

Миграцией в зараженных клубнях обусловлено попадание *P. infestans* в Европу, распространение по всем регионам мира, где выращивают картофель; ими вызваны самые серьезные популяционные перестройки. Фитофтороз на картофеле появился на территории Российской империи почти одновременно с его появлением в Западной Европе. Поскольку болезнь впервые была отмечена в 1846-1847 гг в Прибалтике и только в последующие годы распространилась в Белоруссии и Северо-Западных районах России, ее западноевропейское происхождение очевидно. Не столь очевиден первый источник фитофтороза в Старом Свете. Развиваемая Фраем с соавторами (Fry et al., 1992; Fry, Goodwin, 1995, Goodwin et al., 1994) гипотеза предполагает, что паразит попал из Мексики сначала в Северную Америку, где распространился по посевам, а затем был перевезен в Западную Европу (рис. 7).

В результате повторного дрейфа (двойного эффекта «бутылочного горлышка») в Европу попали единичные клоны, потомство которых вызвало пандемию на всей территории Старого Света, где выращивают картофель. В качестве доказательств этой гипотезы авторы приводят, во-первых, повсеместную встречаемость только одного типа спаривания (A1) и, во-вторых, однородность генотипов исследованных штаммов из разных регионов (все они по молекулярным маркерам, включающим 2 изоферментных локуса,

Рис. 7. Пути миграции *P. infestans* в 40-х годах 19 века. 1 – первая миграция из Мексики в Северо-Восточные США (1842-1843 гг.), 2 – миграция из США в Европу (примерно 1845 г.), 3 – миграция из Европы в другие страны мира, последующие года (Goodwin et al., 1994).

паттерны фингерпринтинга ДНК и структуру митохондриальной ДНК, идентичны, и соответствуют описанному в США клону US-1). Однако некоторые данные заставляют сомневаться по крайней мере в некоторых положениях изложенной гипотезы. Анализ митохондриальной ДНК *P. infestans*, выделенной из гербарных образцов картофеля, зараженных в годы первой эпифитотии 40-х годов XIX в показал, что по структуре митохондриальной ДНК они отличаются от клона US-1, который, следовательно, был, по крайней мере, не единственным источников инфекции в Европе (Ristaino et al, 2001).

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

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

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

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

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

Половая рекомбинация

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

Соотношение типов спаривания сильно варьирует в разных популяциях и даже в разные годы в одной популяции (табл. 9,10). Причины столь резких изменений частот типов спаривания в популяциях (как, например, в России или в Израиле в начале 90-х гг прошлого века) неизвестны, но полагают, что это связано с завозом более конкурентоспособных клонов (Cohen, 2002).

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

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

2) Связь между соотношением типов спаривания в популяциях и интенсивностью образования ооспор наблюдали в Израиле (Cohen et al., 1997) и в Голландии (Flier et al., 2004). Наши исследования показали, что в популяциях, в которых изоляты с типом спаривания A2 составляли 62, 17, 9 и 6%, ооспоры обнаружены в 78, 50, 30 и 15% проанализированных листочков картофеля (имеющих 2 и более пятен) соответственно. Образцы с 2 и более пятнами значительно чаще содержали ооспоры, чем образцы с 1 пятном (32 и 14% образцов соответственно) (Апрышко и др., 2004). Ооспоры значительно чаще встречались в листьях среднего и нижнего яруса растения картофеля (Мыца и др., 2015; Elansky et al., 2016).

3) В некоторых регионах были обнаружены уникальные генотипы, возникновение которых связывают с половой рекомбинацией. Так, в Польше в 1989 г. и во Франции в 1990 г. были обнаружены штаммы, гомозиготные по локусу глюкозо-6-фосфатизомеразы (GPI 90/90). Поскольку ранее в течение 10 лет встречались только гетерозиготы 90/100, гомозиготность приписывают половой рекомбинации (Sujkowski et al., 1994). В Колумбии (США) обычны изоляты, сочетающие A2 с GPI 100/110 и A1 с GPI 100/100, однако в концу сезона 1994 г. (16 августа и 9 сентября) были обнаружены штаммы, имеющие рекомбинантные генотипы (A1 GPI 100/110 и A2 GPI 100/100) (Miller et al., 1997).

4) В некоторых популяциях из Польши (Sujkowski et al., 1994) и Северного Кавказа (Аматханова и др., 2004) распределение фингерпринтных локусов ДНК и аллозимных локусов белков соответствует распределению Харди-Вайнберга, что свидетельствует о высокой доле вклада половой рекомбинации в изменчивость популяций. В других регионах России соответствия распределению Харди-Вайнберга в

популяциях не обнаружено, но показано наличие неравновесного сцепления, свидетельствующего о преобладании клонального размножения (Еланский и др., 1999).

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

В то же время вклад половой рекомбинации в популяционное разнообразие не может быть очень высоким. Подсчет этого вклада был сделан для популяций Московской области (Еланский и др., 1999). По расчетам Левонтина (1979) «рекомбинация, которая может продуцировать новые варианты из двух локусов с частотой, не превышающей произведение их гетерозиготностей, становится эффективной только в том случае, если величины гетерозиготности по обоим аллелям уже высокие». При обычном для Московской области соотношении двух типов спаривания, равном 4:1, частота рекомбинации составит 0,25. Вероятность того, что скрещивающиеся штаммы будут гетерозиготны по двум из трех изученных изоферментных локусов, в исследованных популяциях составила 0,01 (2 штамма из 177). Следовательно, вероятность возникновения двойных гетерозигот в результате рекомбинации не должна превышать их произведение, помноженное на вероятность скрещивания (0,25x0,02x0,02) = 10^{-4}, т.е. половые рекомбинанты обычно не попадают в исследованную выборку штаммов. Эти расчеты сделаны для популяций из Московской области, характеризующихся относительно высокой вариабельностью. В мономорфных популяциях, подобных сибирским, половой процесс, если даже и происходит в отдельных популяциях, не может оказать влияние на их генетическое разнообразие.

Кроме того, для *P. infestans* характерны частые нарушения расхождения хромосом в мейозе, что приводит к анеуплоидии (Carter et al., 1999). Такие нарушения снижают фертильность гибридов.

Парасексуальная рекомбинация, митотическая конверсия генов

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

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

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

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

Интрогрессия генов

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

Таблица 9. Доля штаммов *P. infestans* с А2 типом спаривания в разных странах мира в период с 1990 по 2000 годы (по данным открытых литературных источников и сайтов www.euroblight.net, www.eucablight.org).

Страна	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000
Беларусь										33(12)	34(29)
Бельгия									15(49*)	6(66)	20(86)
Эквадор	0(13)		0(12)	0(19)	0(21)	12(41)	25(39)	15(75)	22(73)	25(68)	0(35)
Эстония											8(12)
Англия						4(26)		3(630)	9(336)		
Финляндия			0(15)		19(117)		12(16)	21(447)	6(509)	9(432)	43(550)
Франция	0(35)	0(56)	0(83)	0(67)	0(86)	2(135)	7(156)	6(123)	0(73)	0(285)	0(135)
Венгрия									72(32)		
Ирландия							4(145)				
Сев. Ирландия				10(41)	9(58)	1(106)	0(185)	0(18)	0(56)	0(35)	0(26)
Нидерланды				7(41)	5(276)	24(377)	44(353)				23(185)
Норвегия							25(446)	28(156)	8(39)	18(257)	38(197)
Перу	0(34, 1984-86)					0(287, 1997-98)		0(112)		0(66)	
Польша							19(180)	21(142)	33(256)	26(149)	35(70)
Шотландия						25(147)	11(163)	22(189)	5(22)		
Швеция									25(263)	62(258)	49(163)
Уэльс						0(16)	7(97)	0(48)	0(25)		
Корея									36(42)	10(130)	15(98)
Китай							20(142, 1995-98)		0(6)	0(8)	0(35)
Колумбия					0(40, 1994-2000)						
Уругвай									100(25, 1998-99)		
Марокко								60(108, 1997-2000)		52(25)	42(40)
Сербия											76(37)
Мексика (Толука)	28(292, 1988-89)							50(389, 1997-98)			

Прим.: *- *в скобках – число протестированных изолятов.*

Таблица 10. Доля штаммов *P. infestans* с А2 типом спаривания в разных странах мира в период с 2001 по 2011 годы

Страна	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Австрия			65(83)								
Беларусь				42 (78)							
Бельгия	20(102*)	4(32)	50(14)	25(16)	62(13)	54(26)	70(54)	30(23)	29(35)	62(71)	45(49)
Швейцария							89(19)				
Чехия			35(31)	54(64)	38(174)	12(80)					
Германия							95(53)				
Дания			48(52)								
Эквадор	5(178)	6(108)	9(121)	18(94)	2(44)	0(66)	5(47)				
Эстония	54(25)	0(24)	33(62)	45(140)	25(100)	12(103)					
Англия			4(47)	10(96)	31(55)	55(790)	68(862)	70(552)	68(299)		
Финляндия	47(162)		12(218)			42					
Франция	0(186)	4(108)	8(61)	22(103)	33(303)	65(378)	74(331)	75(125)	75(12)		
Венгрия	48(27)	48(90)			9	7					
Сев. Ирландия	0(38)	0(58)	0(40)	0(24)	5(54)	0(18)	27(578)	45(239)	36(213)	82(60)	10(80)
Нидерланды			66(24)				93(15)		91(11)		
Норвегия			39(328)	3(115)	12(19)						
Перу			0(36)								
Польша	25(46)	10(30)	85(20)	38(44)	75(66)	55(56)	65(35)	72(81)	85(21)		
Шотландия			3(213)	2(474)		24(135)	86(337)	88(386)	74(172)		
Швеция	60(277)		39(87)								
Словакия	0(36)	14(26)	62(26)	0(26)							
Уэльс				25(12)		68(106)	80(88)	92(143)	75(45)		
Корея			46(26)								
Бразилия						0(49)	0(30)				
Китай	10(30)	0(6)	0(6)								
Вьетнам			0(294, 2003-04)								
Уганда	0(8)										

Прим.: *- *в скобках – число протестированных изолятов.*

ДИНАМИКА ГЕНОТИПИЧЕСКОГО СОСТАВА ПОПУЛЯЦИЙ

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

Влияние сорта

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

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

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

Влияние фунгицидов

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

Влияние фунгицидов на резистентность и агрессивность популяций

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

К первым относится большинство *контактных* фунгицидов. Резистентность к ним (если она возможна вообще) контролируется большим число очень слабо экспрессивных генов. Эти свойства обусловливают отсутствие видимых изменений резистентности популяции после обработки ее фунгицидами (хотя в некоторых экспериментах некоторое повышение резистентности было получено). Грибная популяция, сохранившаяся после опрыскиваний контактными фунгицидами, состоит их двух групп штаммов:

1) Штаммы, сохранившиеся на участках растений, не обработанных препаратом. Поскольку контакта с фунгицидом не было, агрессивность и резистентность этих штаммов не изменяются.

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

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

Устойчивость к *олигосайтовым* фунгицидам контролируется несколькими аддитивными генами.

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

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

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

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

Наконец, мутации резистентности к *моносайтовым* фунгицидам высоко экспрессивны, то есть одна мутация может сообщить высокий уровень резистентности вплоть до полной потери чувствительности. Поэтому повышение резистентности популяций происходит очень быстро. Примером таких фунгицидов могут быть фениламиды, включая наиболее распространенный фунгицид металаксил. Мутации устойчивости к нему возникают с высокой частотой, причем степень резистентности у мутантов очень высокая – превышает чувствительный штамм в тысячу и больше раз (Деревягина и др., 1993). Хотя скорость роста и агрессивность резистентных мутантов снижается на фоне гибели чувствительных штаммов от системного фунгицида, численность резистентной популяции быстро растет и параллельно повышается ее агрессивность. Поэтому через несколько лет использования фунгицида агрессивность резистентных штаммов может не только сравняться с агрессивностью чувствительных, но и превзойти ее (Деревягина, Дьяков, 1992).

Влияние на половую рекомбинацию.

Поскольку частое нахождение типа спаривания А2 в популяциях *P. infestans* совпало по времени с интенсивным использованием металаксила против фитофтороза, было предположено, что металаксил вызывает конверсию типов спаривания. У вида *P. parasitica* такая конверсия под действием хлоронеба и металаксила была доказана экспериментально (Ко, 1994). Однократный пассаж на среде с низкой концентрацией металаксила привел к возникновению гомоталличных изолятов из чувствительного к металаксилу штамма *P. infestans* с типом спаривания А1 (Savenkova, Cherepnikova-Anikina, 2002). При последующих пассажах на средах с более высокой концентрацией металаксила не удалось обнаружить ни одного изолята, имеющего тип спаривания А2, однако большинство изолятов при скрещивании с изолятами А2 вместо ооспор формировали уродливые скопления мицелия и были стерильными. Пассажи резистентного штамма, имеющего тип спаривания А2, на средах с высокой концентрацией металаксила позволили обнаружить три формы изменений типа спаривания: 1) полную стерильность при скрещивании с изолятами А1 и А2; 2) гомоталлизм (формирование ооспор в монокультуре); 3) конверсия А2 типа спаривания в А1. Таким образом, металаксил может быть причиной изменений типов спаривания в популяциях *P. infestans* и, следовательно, протекания в них половой рекомбинации.

Влияние на вегетативную рекомбинацию. Некоторые гены резистентности к антибиотикам увеличивали частоту гетерокариотизации гиф и диплоидизации ядер (Поединок, Дьяков, 1981). Как отмечено ранее, гетерокариотизация гиф при сращивании разных штаммов *P. infestans* происходит очень редко вследствие явления вегетативной

несовместимости у этого гриба. Однако гены устойчивости к некоторым антибиотикам могут оказывать побочные действия, выражающиеся в преодолении вегетативной несовместимости. Таким свойством обладал ген устойчивости к стрептомицину мутанта 1S-1. Наличие подобных мутантов в полевых популяциях фитофторы может увеличить поток генов между штаммов и ускорить адаптацию всей популяции к новым сортам или фунгицидам.

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

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

Классический цикл развития *P. infestans* в умеренной зоне складывается из 4-х фаз.

1) Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза) с короткими генерациями. Эта фаза обычно начинается в июле и продолжается 1,5-2 мес.

2) Фаза остановки роста численности популяции вследствие резкого уменьшения доли непораженной ткани или наступления неблагоприятных погодных условий. Эта фаза в хозяйствах, проводящих заблаговременное предуборочное удаление ботвы, выпадает из годового цикла.

3) Фаза зимовки в клубнях, сопровождающаяся значительным уменьшением численности популяции вследствие случайного заражения клубней, медленного развития в них инфекции, отсутствия при нормальных режимах хранения перезаражения клубней, сгнивания и выбраковки пораженных клубней.

4) Фаза медленного развития в почве и на всходах (моноциклическая фаза), при которой продолжительность генерации может достигать месяца и больше (конец мая – начало июля). Обычно в это время больные листья трудно обнаружить даже при специальных наблюдениях.

Фаза экспоненциального роста популяции (полициклическая фаза)

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

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

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

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

Фаза зимовки в клубнях

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

Фаза вегетации в почвы

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

На зараженных клубнях в почве может формироваться спороношение гриба. Образующиеся

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

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

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

ВНУТРИВИДОВАЯ СПЕЦИАЛИЗАЦИЯ И ЕЕ ЭВОЛЮЦИЯ

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

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

Каковы свидетельства в пользу этого предположения?

1) Встречаемость на картофеле и томате.

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

2) Динамика расы T1 в посадках томата.

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

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

3) Агрессивность к картофелю и томату.

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

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

4) Вирулентность для картофеля и томата.

Раса T1 поражает сорта вишневидного томата, обладающие геном устойчивости Ph1, а раса T0 не способна поражать эти сорта, т.е. обладает более узкой вирулентностью. По отношению к дифференциаторам R-генов картофеля наблюдается обратная зависимость, т.е. штаммы, выделенные из листьев томата менее вирулентны, чем «картофельные» штаммы (табл. 11).

5) Нейтральные маркеры.

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

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

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

6) Механизмы изоляции.

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

При скрещивании штаммов, изолированных из разных видов рода *Solanum* в Эквадоре (Oliva et al., 2002), было установлено, что штаммы с типом спаривания A2 из диких пасленовых (клональная линия EC-2) хуже всего скрещиваются со штаммами из томата (линия EC-3), а наиболее эффективно скрещиваются со штаммом из картофеля (EC-1). Все гибриды оказались непатогенными. Авторы полагают, что низкий процент гибридизации и редукция патогенности у гибридов обусловлены постмейотическими механизмами репродуктивной изоляции популяций.

В опытах Багировой с соавторами (1998) было проведено скрещивание большого количества штаммов из картофеля и томата, имеющих свойства рас T0 и T1. Наиболее высокофертильными оказались кроссы штаммов T1xT1, выделенных из томата (36 ооспор в поле зрения микроскопа, 44% прорастания ооспор), наименее эффективными – скрещивания рас T0xT1, выделенных из разных хозяев (низкое число формирующихся и проросших ооспор, высокая доля абортивных и недоразвитых ооспор). Эффективность кроссов между изолятами расы T0, выделенными из картофеля, оказалась промежуточной. Поскольку основной массив штаммов расы T0 поражает картофель, она имеет надёжный источник зимовки – картофельные клубни, вследствие чего значение ооспор как зимующих инфекционных единиц для популяций из картофеля невысоко. Адаптированная «томатная форма» способна зимовать на томате в форме ооспор (см. ниже) и поэтому сохраняет более высокую продуктивность полового процесса. За счет высокой фертильности T1 приобретает самостоятельный потенциал первичной инфекции на томате.

Таким же образом можно интерпретировать результаты, полученные Кнаповой с соавторами (Knapova et al., 2002). Кроссы штаммов, выделенных

из картофеля с штаммами из томата дали наивысшее число ооспор – 13,8 на кв.мм. среды (с разбросом 5-19) и промежуточный процент прорастания ооспор (6,3 с разбросом 0-24). Скрещивания штаммов, изолированных из томата, дали наименьший процент ооспор (7,6 с разбросом 4-12) при наивысшем проценте их прорастания (10,8). Кроссы между штаммами, выделенными из картофеля, дали промежуточное число ооспор (8,6 с высоким разбросом данных – 0-30) и наименьший процент прорастания ооспор (2,7). Таким образом, штаммы из картофеля менее фертильны, чем из томата, но межпопуляционные скрещивания дали не худшие результаты, чем внутрипопуляционные. Возможно, различия с приведенные выше данными Багировой с соавт. объясняются тем, что российские исследователи работали с штаммами, изолированными в начале 90-х годов XX века, а швейцарские – с штаммами, изолированными в конце 90-х гг.

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

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

7) Конвергенция популяций.

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

Однако все произошло иначе. Зимовка ооспорами позволила паразиту избежать самого узкого этапа в его жизненном цикле – моноциклическую стадию вегетации в почве, при которой снижаются паразитические свойства, постепенно восстанавливающиеся летом в полициклической фазе.

Таблица 11. Частоты генов вирулентности к сортам-дифференциаторам картофеля у штаммов *P. infestans*

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

Первичные зооспорангии и зооспоры, которыми прорастают ооспоры, обладают высокой степенью паразитической активности, особенно если ооспоры сформировались партеногенетически под влиянием феромонов штамма, обладающего противоположным типом спаривания. Поэтому инфекционный материал на всходах томата, выросший из зараженных ооспорами семян, высоко патогенен как для томата, так и для картофеля.

Эти изменения привели к очередной популяционной перестройке, выразившейся в следующих важных с эпидемиологической точки зрения переменах:

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

2) Эпифитотии на картофеле стали наблюдаться уже в июне, примерно на месяц ранее, чем обычно.

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

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

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

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Population structure and dynamics of Phytophthora infestans, a causative agent of the late blight of potato and tomato

S.N. Elansky[1,2], L.Y. Kokaeva[1,4], N.V. Statsyuk[3], Y.T. Dyakov[1]

[1] – Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory, 1/12, Moscow, Russia 119991

[2] – Peoples Friendship University of Russia. Miklukho-Maklaya st., 6, Moscow, Russia, 117198

[3] – All-Russian Research Institute of Phytopathology, Bolshie Vyazemy, Moscow Region, Russia 143050

[4] – All-Russian Lorh Research Institute of Potato Farming, Lorh St., 23, Kraskovo, Moscow Region, Russia 145023.

Abstract

Oomycete Phytophthora infestans (Mont.) de Bary causing late blight of potato and tomato is ont of the most dangerous plant pathogens. Late blight control and related yield losses cost billions of dollars. Economical importance of the late blight resulted in a great interest to its causative agent, which became the most studied plant pathogen in the world. Due to its comprehensive investigation, a great progress has been achieved in a crop protection, breeding of resistant cultivars, and reduction of storage losses.

This review summarizes results of numerous studies of the dynamics and structure of P. infestans populations and makes a comparison between the pathogen populations of Russia and Western Europe characterized by an intensive potato production. Methods used for a comparative analysis of P. infestans strains and populations are also discussed. The review represents an expanded version of the review "Population biology of Phytophthora infestans» published in 2007 in the scientific collection "Mycology today" (Dyakov, Elansky, 2007). In the last 10 years, many new stidues devoted to P. infestans were published. A complete genome of P. infestans has been investigated. Use of microsatellite markers made it possible to perform large-scale studies of pathogen populations in different parts of the world including Russia. The review was written by scientists having a large experience of work with P. infestans and covers contemporary knowledge on the population biology of this oonycete.

Keywords*: late blight, Phytophthora infestans, potato diseases, tomato diseases, population structure*

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Авдей О.В. Расовый состав и типы совместимости Pytophthora infestans. В сб. «Защита растений в условиях реформирования АПК: экономичность, эффективность, экологичность". С.-Пб.: 1995. 149с.

Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Самофертильные изоляты *Phytophtora infestans* // Изв. РАН, сер. биол. 1997a. №4. С. 414-418.

Аникина М.И., Савенкова Л.В., Дьяков Ю.Т. Взаимодействия между штаммами *Phytophthora infestans* (Mont.) de By. // Микол. и фитопатол. 1997b. Т.31. С. 33-38.

Апрышко В.П., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* в природных очагах фитофтороза в Московской области в 2003 г.// Материалы Юбилейной конференции «Микология и альгология – 2004». М.: Прометей, 2004. С. 21-22.

Ахматханова Ф.Х., Дьяков Ю.Т., Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н., Козловская И.Н., Козловский Б.Е., Морозова Е.В., Смирнов А.Н. Популяции *Phytophthora infestans* на Северном Кавказе// Микол. и фитопатол. 2004. Т.38(3). С. 71-78.

Багирова С.Ф., Ан Цзянь Ли, Дьяков Ю.Т. Механизмы генетической изоляции специфических патогенных форм *Phytophthora infestans* в половых и бесполых популяциях // Микол. и фитопатол. 1998. Т.32(4). С. 47-50.

Багирова С.Ф., Дьяков Ю.Т. Роль ооспор в возобновлении первичной инфекции фитофтороза томата // С–Х биология. 1998. №3. С.67-71.

Балашова Н.Н. Фитофтороустойчивость рода *Lycopersicon* Tourn. и методы использования ее в селекции томата // Кишинев. "Штиница". 1979.

Богуславская Н.В., Филиппов А.В. Распростра-нение возбудителя фитофтороза в почве // Микол. и фитопатол. 1976. Т.10. С. 316-317.

Борисенок А.Б. Расовый состав *Phytophthora infestans* в годы, различающиеся метеорологическими условиями // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4. В.8. С 83-88.

Воробьева Ю.В., Гриднев В.В. Генетика фитофторовых грибов. Сообщ.2. // Генетика. 1983. Т.19. С. 1786-1789.

Воробьева Ю.В., Кваснюк Н.Я., Гриднев В.В., Шемякина Е.П., Морозова Е.В., Кузнецова Л.Н. Защита картофеля от фитофтороза в системе семеноводства // Защита растений. 1991. N5. С.17-20.

Галлегли М.Е., Нидерхаузер Дж.С. Генетическое регулирование взаимодействий хозяина и паразита при фитофторозе картофеля. В сб."Проблемы и достижения фитопатологии". М.: Сельхозиздат. 1962. С. 193-211.

Горбунова Е.В., Багирова С.Ф., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Вегетативная несовместимость у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* //. ДАН СССР. 1989. Т.104. С. 1245-1248.

Деревягина М. К. Резистентность P*hytophthora infestans* (Mont.) de Bary к фунгицидам и пути ее преодоления // Диссертация на соискание ученой степени к. б. н. МГУ. 1991.

Деревягина М.К., Воловик А.С., Дьяков Ю.Т. Изменение чувствительности к ридомилу в жизненном цикле возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestnas* и целесообразность весенних опрыскиваний // Микол. и фитопатол. 1991. Т.25. С. 426-436.

Деревягина М.К., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Мутанты *Phytophthora unfestans*, резистентные к фениламидным фунгицидам // Микол. и фитопатол. 1993. Т.27(3). С.57-61.

Деревягина М.К., Дьяков Ю.Т. Влияние системных и контактных фунгицидов на поражение листьев картофеля фитофторозом // Микол. и фитопатол. 1990. Т.24. С. 252-256.

Деревягина М.К., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Резистентность *Phytophthora infestans* к фунгициду диметоморфу// Микол. и фитопатол. 1999. Т. 33, N3. С. 208-213.

Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Генетика устойчивости возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* к фунгициду металаксилу // Генетика. 1986. Т.22(10). С. 2423-2429.

Долгова А.В., Смирнов А.Н., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в России и некоторых странах бывшего СССР // Микол. и фитопатол. 1996. Т.30(3) С. 55-60.

Долгова А.В., Смирнов А.Н., Малеева Ю.В., Багирова С.Ф., Козловская И.Н., Колесников А.А., Шоу Д.С., Дьяков Ю.Т. Сравнение популяций *Phytophthora infestans* на картофеле и томатах в Московской области // В сб. «Проблемы оптимизации фитосанитарного состояния растениеводства». СПб., 1997. С. 348-357.

Дорожкин Н.А., Бельская С.И. Болезни картофеля// Минск: Наука и техника. 1979. 248 с.

Дьяков Ю. Т., Долгова А. В., Рыбакова И. Н., Багирова С.Ф. Дивергенция популяций фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* в связи со специализацией к растениям-хозяевам // Журнал общей биологии. 1994. Т.55. С. 179-188.

Дьяков Ю.Т., Ащайе А., Вайнштейн В.М. О статусе "томатных" рас *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1975. V.9(4). С. 277-282.

Дьяков Ю.Т., Долгова А.В., Рыбакова И.Н., Багирова С.Ф. Дивергенция популяций фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в связи со специализацией к растению-хозяину // Журнал общей биол. 1994. Т.55. С. 179-188.

Дьяков Ю.Т., Еланский С.Н. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* // Микология сегодня / Под ред. Ю. Т. Дьякова. М: Национальная академия микологии, 2007. Т.1. С. 107-139.

Дьяков Ю.Т., Кузовникова Т.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. II. Генетические исследования // Микол. и фитопатол. 1974. Т.8(2). С. 81-89.

Дьяков Ю.Т., Лекомцева С.Н. О симпатрическом видообразовании у грибов // Биол. науки. 1984. №11. С. 5-16.

Дьяков Ю.Т., Супрун Л.М. Вероятностный метод расчета частот генов вирулентности и его применение для анализа популяций возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* // Сельскохозяйственная биология. 1984. N3. С.111-118.

Еланский С. Н. Особенности развития фитофтороза в России // Защита картофеля. 2015. № 1. С. 8-11.

Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. 1. Системы размножения // Микол. и фитопатол. 1999. Т.33(5). С. 346-352.

Иванюк В.Г., Журомский Г.К., Авдей О.В. Микроэволюция *Phytophthora infestans* в условиях Белоруссии // Микол. и фитопатол. 2002a. Т.36(6). С. 81-90.

Иванюк В.Г., Журомский Г.К., Авдей О.В. Структура популяции *Phytophthora infestans*, возбудителя фитофтороза картофеля, в Беларуси // Известия НАН Беларуси. Серия аграрных наук. 2002b. №4. С.29-34.

Квитко К.В. Относительная роль мутаций и отбора в микробных популяциях // Успехи совр. генетики. 1974. Т.5. С.101-113.

Кузнецова М.А., Козловский Б.Е., Бекетова М.П., Соколова Е.А., Малюченко О.П., Алексеев Я.И., Рогозина Е.В., Хавкин Э.Е. Фитопатологическая и молекулярная характеристика изолятов *Phytophthora infestans*, собранных с устойчивых и восприимчивых генотипов картофеля // Микол. и фитопатол.. 2016. V.50(3). С.175-184.

Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т. Выделение диплоидных штаммов из смешанных культур двух физиологических рас *Phytophthora infestans* // ДАН. 1979. Т.244(3). С. 435-438.

Кулиш В.Б., Дьяков Ю.Т., Ерохина С.А. Гетерокариоз у *Phytophthora infestans*. 3.Фитопатологические исследования // Микол. и фитопатол. 1978, 12, №5, С. 406-409.

Лаврова О.И. Короткие ретропозоны в геноме *Phytophthora infestans* De Bary и их использование для изучения меж- и внутриштаммовой изменчивости. Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. 2004. – 112 с

Лаврова О.И., Еланский С.Н. Идентификация SINE – подобных элементов в геноме *Phytophthora infestans* и оценка возможности их применения для сравнительного анализа штаммов // J.Russian phytopathol. Soc. 2003. V. 4. P. 17 – 22

Лаврова О.И., Еланский С.Н., Дьяков Ю.Т. Селекция штаммов *Phytophthora infestans* в бесполых генерациях // Ж. Росс. Фитопатол. общества. 2003. Т.4. С. 1-7.

Левонтин Р. Генетические основы эволюции. М.: «Мир». 1978.

Майр Э. Популяции, виды и эволюция. М.: «Мир». 1974. 457 с.

Мыца Е. Д., Кокаева Л. Ю., Еланский С. Н. Образование ооспор *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* в листьях разных ярусов растений картофеля // Защита картофеля. 2015. № 2. С. 10–12.

Оша М.Я. Расы *Phytophthora infestans* и устойчивость сортов и гибридов картофеля в Латвийской ССР // Тр. V Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1969. Т.4(8). С. 110-114.

Поединок Н.Л., Долгова А.В., Дьяков Ю.Т. Парасексуальный процесс фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Генетика. 1982. Т.18. С. 1423-1428.

Поединок Н.Л., Дьяков Ю.Т. Обнаружение вегетативной несовместимости у фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 1981. Т.15(4). С. 275-279.

Политыко В. А. Биологические особенности развития возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в Северной Осетии и обоснование мер борьбы // Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. ВНИИФ, Москва, 1994.

Пушкарев И.И. Новый фитофтороустойчивый сорт картофеля 8670. М.: Сельхозгиз. 1937.

Пшедецкая Л.И., Козубова И.А. Изучение сезонной динамики расового состава гриба *Phytophthora infestans* на различных сортах картофеля // Труды Всес. Совещ. по иммунитету растений. Киев. 1964. Т.4(8). С. 38-41.

Рыбакова И. Н., Дьяков Ю. Т. Циклические изменения генотипического состава популяций фитопатогенных грибов на примере возбудителя фитофтороза картофеля // Журн. общ. биол. 1990. Т.51. С. 651-660.

Рыбакова И.Н. Изменение агрессивности и вирулентности в популяциях *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – возбудителя фитофтороза картофеля и томатов // Автореферат канд. дисс. М. 1988. 23 с.

Рыбакова И.Н., Дьяков Ю.Т. Циклические изменения генотипического состава популяций фитопатогенных грибов на примере возбудителя фитофтороза картофеля // Журнал общей биол. 1990. Т. 51. С. 651-660.

Рыбакова И.Н., Супрун Л.М., Дьяков Ю.Т. Динамика генотипов в популяциях фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans (Mont.)de Bary* // Докл. АН СССР. 1987. Т.294. Р. 696-698.

Еланский С.Н. Особенности развития фитофтороза в России // Защита картофеля. 2015. Т.1. Р. 8-11.

Chamnanpunt J., Shan Weixing, Tyler B.M. High frequency mitotic gene conversion in genetic hybrids of the oomycete *Phytophthora sojae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V.98. P. 14530-14535.

Смирнов А.Н. Популяционная структура фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* в Московской области в 1991-1996 гг. // Автореферат канд. дисс. М. 1996. 24 с.

Смирнов А.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* // Микол. и фитопатол. 2003. Т.37. N1. С. 3-21.

Уланова Т.И., Еланский С.Н., Филиппов А.В., Дьяков Ю.Т., Апрышко В.П., Козловский Б.Е., Смирнов А.Н., Коффей М.Д. Устойчивость к фитофторозу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum* // Ж. Российского фитопатологического общества. 2003. Т.4. С. 9-15.

Уланова Т.И., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Сметанина Т.И., Филиппов А.В. Значение ооспор для перезимовки и ежегодного возобновления развития возбудителя фитофтороза на томате и картофеле // Защита картофеля. 2010. Т.1. Р.16-21.

Филиппов А.В., Гуревич Б.И., Кузнецова М.А., Рогожин А.Н., Спиглазова С.Ю., Кравцов А.С., Сметанина Т.И., Смирнов А.Н. Горизонтальная устойчивость листьев картофеля к *Phytophthora infestans* и агрессивность изолятов патогена из разных географических районов // Микол. и фитопатол. 2004. Т.38(5). С. 74-87.

Шеин С.А., Милютина Д.И., Козловская И.Н., Морозова Е.В., Побединская М.А., Еланский С.Н. Генотипическое разнообразие *Phytophthora infestans* в республике Марий Эл // Микол. и фитопатол. 2009. Т. 43. С. 358-363.

Abad Z.G., Abad J.A. Historical evidence on the occurrence of late blight of potato, tomato and pear melon in the Andes of South America // In "*Phytophthora infestans* 150". L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 36-41.

Abad Z.G., Abad J.A., Ochoa C. Historical and scientific evidence that supports the modern theory of the peruvian Andes as the center of origin of *Phytophthora infestans* // In "*Phytophthora infestans* — 150". L.J. Dowly et al., eds. Dublin, Ireland. 1995. P. 239-245.

Abu-El Samen F.M., Secor G.A., Gudmestad N.C. Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers // Plant Pathology. 2003. V.52, P. 314-325.

Acuña I., Sagredo B., Gutiérrez M., Sandoval C., Fahrenkrog A., Secor G., Rivera V., Mancilla S. Characterization of *Phytophthora infestans* population in Chile // PPO-Special Report. 2012. V.15. P. 145-150.

Acuña I., Restrepo S., Lozoya H., Gabriel J., Mora R. Tizon Latino: A Latin American network for the study of Solanaceae Blight Diseases // PPO-Special Report. 2015. V.17. P. 250.

Adams J., Paquin Ch., Oeller P.W., Lee L.W. Physiological characterization of adaptive clones in evolving populations of the yeast *Saccharomycae cerevisiae* // Genetics. 1985. V.110. P. 173-185.

Adler N., Chacon G., Forbes G., Flier W. *Phytophthora infestans* sensu lato in South America population substructuring through host specificity // In "Late blight: Managing the Global Threat" Lima, Peru. 2002a. P. 13-17.

Adler N.E., Chacon G., Flier W.G., Forbes G.A. The Andia fruit crop, pear melon (*Solanum muricatum*) is a common host for A1 and A2 strains of *Phytophthora infestans* in Equador // Plant Pathol. 2002b. V.51. P. 802.

Akino S., Kildea S., Kondo N., Cooke L.R. Genetic diversity of the Japanese population of *Phytophthora infestans* and its relationship with foreign populations // Japan Journal of Phytopathology. 2011. V.77. P. 76-77.

Al-Kherb S.M. The inheritance of host-specific pathogenicity in *Phytophthora infestans*. PhD Thesis, University of Wales, UK. 1988.

Andrivon D. Biology, ecology, and epidemiology of the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* in soil // Phytopathology. 1995. V.85. P. 1053-1056.

Bagirova S.F., An Zsan Li, Dolgova A.V., Elansky S.N., Shaw D.C., Dyakov Y.T. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to dimethomorph fungicide // J. Rus. Phytopathol. Soc. 2001. V.2. P. 19-24.

Beketova M.P., Sokolova E.A., Malyuchenko O.P., Alekseev Ya.I., Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Rogozina E.V., Khavkin E.E. On molecular identification of *Phytophthora infestans* genotypes. // Russian Agricultural Sciences. 2014. V.40(6). P.435-438.

Black W. A. & Gallegly M. E. Screening of Solanum species for resistance to physiological races of *Phytophthora infestans* // Amer. Pot. J. 1957. V.34(5). P. 273-281.

Black W. A. Late blight resistance work in Scotland // Amer. Pot. J. 1954. V.31(2). P. 93-100.

Black W. A., Mastenbroek C., Mills W. R., Peterson L. C. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in Solanum demissum derivatives // Euphytica. 1953. V.2. P. 173-179.

Bourke P.M. Emergence of potato blight // Nature. 1964. V.203. P.805-808.

Brasier C.M., Cooke D.E.L., Dubcan J.M. Origin of a new Phytophthora pathogen through interspecific hybridization // Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1999. V.96. P. 5878-5883.

Brurberg M.B., Elameen A., Le V.H., Naerstad R., Hermansen A., Lehtinen A., Hannukkala A., Nielsen B., Hansen J., Andersson B., Yuen J. Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability // Fungal Biology. 2011. V.115(4-5). P. 335-342.

Carlisle D.J., Cooke L.R., Brown A.E. Phenotypic and genotypic characterization of Northern Ireland isolates of *Phytophthora infestans* // Europ. J. of Plant Pathology. 2001. V. 107(3). P. 291-303.

Carson M.L. Relationship between parasitic and saprophytic fitness in *Cochliobolus heterostrophus*, cause leaf blight of maize // In "Durability of Disease Resistance". Kluver Acad. Publ. The Netherlands. 1993. 285 p.

Carter D.A., Archer S.A., Buck K.W., Shaw D.S., Shattock R.C. Restriction fragment lenth polymorphisms of mitochondrial DNA of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1990. V.94. P. 1123-1128.

Carter D.A., Buck K.W., Archer S.A., Van der Lee T., Shattock R.C., Shaw D.S. The detection of nonhybrid, trisomic, and triploid offspring in sexual progeny of mating of *Phytophthora infestans* // Fungal Genet. and Biol. 1999. V.26. P. 198-208.

Cherepennikova-Anikina M.I., Savenkova L.V., Dolgova A.V., Shaw D.S., Dyakov Yu.T. Vegetative incompatibility of *Phytophthora infestans* // J. Russ. Phytopathol. Soc. 2002. V.3. P. 19-32.

Chmielarz M., Sobkowiak S., Dębski K., Cooke D.E.L., Brurberg M.B., Śliwka J. Diversity of *Phytophthora infestans* from Poland // Plant Pathology. 2014. V.63. P. 203-211.

Chowdappa P., Nirmal Kumar B.J., Madhura S., Mohan Kumar S.P., Myers K.L., Fry W.E., Cook D.E.L. Severe outbreaks of late blight on potato and tomato in South India caused by recent changes in the *Phytophthora infestans* population // Plant Pathology. 2015. V.64. P. 191-199.

Cohen Y. Populations of *Phytophthora infestans* in Israel underwent three major genetic changes duting 1983 to 2000 // Phytopathology. 2002. V.92. P. 300-307.

Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., Baider A. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves // Phytopathology. 1997. V.87. P. 191-196.

Cooke D. (2017) Update on the European Phytophthora infestans population and the EuroBlight toolbox. 16th Euroblight Workshop (May 13-17, Aarhus, Denmark). http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Presentations/2_David_Cooke.pdf (Дата просмотра - 09.08.2017).

Cooke D.E.L, Young V., Birch P.R.J, Toth R., Gourlay F., Day J.P, Carnegie S., Dunkan J.M. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995 – 1997) // Plant Pathology. 2003. V.52. P. 181-192.

Cooke D.E.L., Cano L.M., Raffaele S., Bain R.A., Cooke L.R., Etherington G.J., et al. Genome analyses of an aggressive and invasive lineage of the Irish potato famine pathogen. // PLoS Pathogens. 2012. 8(10): e1002940.

Cooke D.E.L., Lees A.K. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity // Plant pathology. 2004. V. 53. P. 692-704.

Cooke D.E.L., Lees A.K., Hansen J., Lassen P., Andersson B., Bakony J. EUCABLIGHT one year on: an update on the European blight population database. PPO-Special Report 2007. V.12. P. 129-136.

Cooke L.R. The potato blight population in Northern Ireland. // PPO-Special Report. 2015. V. 17, P.31-44.

Corbière R., Rekad F.Z., Galfout A., Andrivon D., Bouznad Z. Phenotypic and genotypic characteristics of Algerian isolates of *Phytophthora infestans*. // PPO-Special Report. 2010. 14. P. 133-146.

Danies G., Small I.M., Myers K., Childers R., Fry W.E. Phenotypic characterization of recent clonal lineages of *Phytophthora infestans* in the United States. // Plant Disease. 2013. V 97. P 873-881.

Davidse L. C., Danial D. L. & Van Westen C. J. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in The Netherlands // Netherlands Journal of Plant Pathology. 1983. V.89. P. 1-20.

Davidse L.C., Looijen D., Turnensteen L.I., Vanderwal D. Occurrernce of metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields // Neth. J. Plant Pathol. 1981. V.87(2). P. 65—68.

Deahl K.L., De Muth S.P., Fry W.E. Genetic and phenotypic diversity in population of *Phytophthora infestans* in the United States of America // In "*Phytophthora infestans* – 150. Eds. L.J. Dowley et al. Dublin. 1995. 362p.

Delgado R.A., Monteros-Altamirano A.R., Li Y., Visser R.G.F., van der Lee T.A.J., Vosman B. Large subclonal variation in *Phytophthora infestans* populations associated with Ecuadorian potato landraces. // Plant Pathology. 2013. V.62, 1081-1088.

Diehl, S.R., Ziegle, J., Buck, G.A., Reynolds, T.R., Weber, J.L. Automated genotyping of human DNA polymorphisms. // Am. J. Hum. Genet. 1990. V.47, A177.

Dorrance A.E., Inglis D.A., Derie M.L., Brown C.R., Goodwin S.B., Fry W.E. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in Western Washington // Phytopathology. 1999. V.89. P. 423-428.

Dowley L. J. & O'Sullivan E. Metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* in Ireland // Potato Research. 1981. V.24. P. 417-421.

Drenth A., de Boer D., Ransom L., Pung H. Characteristics of Australian isolates of *Phytophthora infestans* and planning to manage new and more aggressive strains of the fungus. Report on the project PT98009. Sydney: Horticultural Australia Ltd., 2002.

Drenth A., Goodwin S. B., Fry W. E., Davidse L. C. Genotypic diversity of *Phytophthora infestans* in the Netherlands revealed by DNA polymorphism // Phytopathology. 1993. V. 83. P. 1087-1092.

Drenth A., Janssen E.M., Govers F. Formation and survival of oospores of *Phytophthora infestans* under natural conditions // Plant Pathol. 1995. V.44. P. 86-94.

Drenth A., Tas I.C.Q., Govers, F. DNA fingerprinting uncovers a new sexually reproducing population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands// Eur.J. Plant Pathol. 1994. V.100. P. 97-107.

Dyakov Yu.T., Derevjahina M.K. Late blight of potato and its control in Russia. // Pesticide Outlook. 2000. V.11. P. 230-232.

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

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.

Elansky S., Pobedinskaya M., Kokaeva L., Statsyuk N. *Phytophthora infestans* populations from the European part of Russia: genotypic structure and metalaxyl resistance // Journal of Plant Pathology. 2015. 97(3). P. 449-456.

Elansky S. N., Mita E. D., Skolotneva E. S., Pobedinskaya M. A., Kokaeva L. Yu. Effect of difenoconazole on the formation of oospores by *Phytophthora infestans (Mont) de Bary.* // Journal of Plant Pathology. 2016. V.98(1). P.123-127.

Erselius L.J., Hohl H.R., Ordonez M.E., Oyarzun P.J., Jarrin F., Velasco A., Ramon M.P., Forbes G.A. Genetic diversity among isolates of *Phytophthora infestans* from various hosts in Equador // CIP program report 1997-98. 1998. P. 39-48.

Fernández-Pavía S.P., Grünwald N.J., Díaz-Valasis M., Cadena-Hinojosa M., Fry W.E. (2004) Soilborne oospores of *Phytophthora infestans* in Central Mexico survive winter fallow and infect potato plants in the field. Plant Disease, V.88(1), P.29-33.

Fife A.M., Shaw D.S. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1992. V.96. P. 390-394.

Flier W.G., Grunwald N.J., Kroon L.P.N.M., Sturbaum A.K., van der Bosch T.B.M., Geray-Serrano E., Lozoya-Saldana H., Fry W.E., Turkensteen L.J. The population structure of *Phytophthora infestans* from the Toluca valley of Central Mexico suggests genetic differentiations between populations from cultivated potato and wild Solanum spp // Phytopathology. 2003. V.93. P. 382-390.

Flier W.G., Grünwald N.J., Kroon L.P.N.M., van Den Bosch T.B.M., Garay-Serrano E., Lozoya-Saldaña H., Bonants P.J.M., Turkensteen L.J. (2002) *Phytophthora ipomoeae*, a new homothallic species causing late blight on Ipomoeae longipedunculata in the Toluca Valley of central Mexico. // Mycological Research. V. 106(7). P.848-856.

Flier W.G., Kessel G.J.T., Shepers H.T.A.M. The impact of oospores of *Phytophthora infestans* on late blight epidemics // Plant dreeding and seed science. 2004. V.50. P. 5-13.

Forbes G.A., Escobar X.C., Ayala C.C., Revelo J., Ordonez M.E., Fry B.A., Doucett K., Fry W.E. Population genetic structure of P*hytophthora infestans* in Ecuador // Phytopathology. 1997. V.87. P. 375-380.

Forbes G.A., Goodwin S.B., Drenth A., Oyarzun P., Ordonez M.E., Fry W.E. A global marker database for *Phytophthora infestans*. // Plant Diseases. 1998. V.82. P. 811-818.

Forbes G.A., Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E. Host specificity of late blight pathogen on potato and tomato in Ecuador. Program Report 1995-1996 // Internat. Potato Center. 1997. P. 138-143.

Fry W.E. *Phytophthora infestans*: New tools (and old ones) lead to new understanding and precision management. // Annual Reviews in Phytopathology. 2016. 54. P. 22.1–22.19.

Fry W.E., Birch P.R.J., Judelson H.S., GruEnwald N.J., Danies G., Everts K.L., Gevens A.J., Gugino B.K., Johnson D.A., Johnson S.B., McGrath M.T., Myers K.L., Ristaino J.B., Roberts P.D., Secor G., Smart C.D. Five reasons to consider *Phytophthora infestans* a reemerging pathogen. // Phytopathology. 2015. V.105. P.966-981.

Fry W.E., Goodwin S.B. Recent migrations of *Phytophthora infestans* // In "Phytophthora infestans 150". L. T. Dowly et al. editors. Dublin, Ireland. 1995. P. 89-95.

Fry W.E., Goodwin S.P., Matuszak J.M., Spielman L.J., Milgroom M.G. Population genetics and interconinental migrations of *Phytopthora infestans* // Ann. Rev. Phytopathol. 1992. V.30, P. 107-129.

Fry W.E., Grünwald N.L., Cooke D.E.L., McLeod A., Forbes G.A., Cao K. Population genetics and population diversity of *Phytophthora infestans*. In: Oomycete genetics and genomics: diversity, interactions, and research tools (Lamour K, Kamoun S., eds.). Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ. 2009.

Fry W.E., McGrath M.T., Seaman A., Zitter T.A., McLeod A., Danies G., Small I., Myers K., Everts K., Gevens A., Gugino B.K., Johnson S., Judelson H., Ristaino H., Roberts P., Secor G., Seebold K., Snover-Clift K., Wyenandt A., Grünwald N.J., Smart C.D. (2013) The 2009 late blight pandemic in the eastern United States – causes and results. // Plant Disease. 2013. V.97. P. 296-306.

Gallegly M. E. & Marvell M. E. Inheritance of resistance to tomato race T0 of *Phytophthora infestans* // Phytopathology. 1955. V. 45. P. 103-109.

Gallegly M.E. Physiological races of tomato late blight fungus // Phytopathology. 1952. V. 42. P. 461-462.

Gavino P.D., Smart C.D., Sandrock R.W., Miller J.S., Hamm P.B., Lee T.Y., Davis R.M., Fry W.E. () Implications of sexual reproduction for *Phytophthora infestans* in the United States: generation of an aggressive lineage. // Plant Diseases. 2000. V.84, P. 731-735.

Ghimire S.R., Hyde K.D., Hodgkiss I.J., Shaw D.S., Liew E.C.Y. Variations in the *Phytophthora infestans* population in Nepal as revealed by nuclear and mitochondrial DNA polymorphisms // Phytopathology. 2003. V.93, N.2. P. 236-243.

Gisi U., Walder F., Resheat-Eini Z., Edel D., Sierotzki H. Changes of genotype, sensitivity and aggressiveness in *Phytophthora infestans* isolates collected in European countries in 1997, 2006 and 2007. Journal of Phytopathology. 2011. V.159. P. 223-232.

Gomez-Alpizar L., Carbone I., Ristaino J.B. An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2007. V.104(9). P. 3306-3311.

Gomez-Alpizar L., Carbone I., Ristaino J.B. An andiam origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V.104. P. 3306-3311.

Goodwin S. B., Sujkovski L. C., Dyer A. T., Fry B. A. & Fry B. E. Direct detection of gene flow and probable sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America // Phytopathology. 1995. V.85. P. 473-479.

Goodwin S.B. The population genetics of Phytophthora // Phytopathology. 1997. V.87, N 4. P. 462-473.

Goodwin S.B., Cohen B.A., Fry W.E. Panglobal distributin of single clonal lineage of the Irish potato famine fungus // Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1994. V.91. P. 11591-11595.

Goodwin S.B., Drenth A. Origin of A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1997. V.87. N. 10. P. 992-999.

Goodwin S.B., Drenth A., Fry W.E. Cloning and genetic analysis of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* // Current Genetics. 1992. V.22(2). P. 107-115.

Goodwin S.B., Fry W.E. Genetic analysis of of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytopthora mirabilis* // Exp. Mycol. 1994. V.18. P. 20-32.

Goodwin S.B., Legard D.E., Smart C.D., Levy M., Fry W.E. Gene flow analysis of molecular markers confirms that *Phytophthora mirabilis* and *P. infestans* are separate species. // Mycologia. 1999. V.91(5). P. 796-810.

Goodwin S.B., Smart C.D., Sandrock R.W., Deahl K.L., Punja Z.K., Fry W.E. Genetic change within populations of *Phytophthora infestans* in the United States and Canada during 1994 to 1996: Role of migration and recombination. // Phytopathology. 1998. V.88. P. 939-949.

Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Dyer A.T., Fry B.A., Fry W.E. Direct detection of gene flow and probably sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in northern North America // Phytopathology. 1995b. V.85. P. 473-479.

Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Rapid evolution of pathogenicity within clonal lineage of the potato late blight disease fungus // Phytopathology. 1995a. V.85. P. 669-676.

Goodwin S.B., Sujkowski L.S., Fry W.E. Widespread distribution and probable origin of resistance to metalaxyl in clonal genotypes of *Phytophthora infestans* in the United States and western Canada // Phytopathology. 1996. V.86. P. 793-800.

Goss E.M., Tabima J.F., Cooke D.E.L., Restrepo S., Fry W.E., Forbes G.A., Fieland V.J., Cardenas M., Grünwald N.J. The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2014. V.111(24). P. 8791-8796.

Goss E.M., Tabimab J.F., Cookec D.E.L., Restrepod S., Fry W.E., Forbesf G.A., Gotz E. Unterzuchungen zum Auftertwen des A2-Paaringstyps bei *Phytophthora infestans* in Ostdeutschland // Potato Res. 1991. V.34. P. 233-237.

Griffith G.W., Shaw D.S. Polymorfism in *Phytophthora infestans*: four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure culture or from host lesion // Applied and Env. Microbiol. 1998. V.64(10). P. 4007-4014.

Grünwald N.J., Flier W.G. The biology of *Phytophthora infestans* at its center of origin. // Annual Review of Phytopathology. 2005. V.431. P. 171-190.

Guo L., Zhu X.Q., Hu C.H., Ristaino J.B. Genetic structure of *Phytophthora infestans* populations in China indicates multiple migration events. // Phytopathology. 2010. V.100(10). P. 997-1006.

Guo J., T. van der Lee, Qu D. Y., Yao Y. Q., Gong X. F., Liang D. L., Xie K. Y., Wang X., Govers W. F. Phytophthora infestans isolates from Northern China show high virulence diversity but low genotypic diversity // Plant Biology. 2008. P. 1435 –8603.

Haas B. J., Kamoun S., Zody M. C. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophtho-*

ra infestans // Nature. 2009. V. 461. P. 393-398.

Hanson K., Shattock R.C. Formation of oosporae of Phytophthora infestans in cultivars of potato with different levels of race-nonspecific resistance // Plant Pathol. 1998. V.47. P. 123-129.

Harbaoui K., Hamada W., Li Y., Vleeshouwers V.G.A.A., van der Lee T. Increased difficulties to control late blight in Tunisia are caused by a genetically diverse *Phytophthora infestans* population next to the clonal lineage NA-01. // Plant Diseases. 2014. V.98, P. 898–908.

Hastie A.C. Benlate-induced instability of Aspergillus diploids // Nature. 1970. V.226. P. 771.

Hirst J.M., Stedman O.J. The epidemiology of *Phytophthora infestans*. II. The source of inoculum // Ann. App. Biol. 1960. V.48. P. 489-517.

Jmour W. and Hamada W. First report of A2 mating type of *Phytophthora infestans* in Tunisia using molecular markers and some observations on its metalaxyl resistance // Tunisian Journal of Plant Protection. 2006. V.1. P. 85-91.

Judelson H.S., Ge Yang. Recombination pathways in *Phytophthora infestans:* polyploidy resulting from aberrant sexual development and zoospore-mediated heterokaryosis // Mycol. Res. 1998. V.102. P. 1245-1253.

Judelson H.S., L.J. Spielman, and R.C. Shattock. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating-tpye loci in the oomycete, *Phytophthora infestans* // Genetics. 1995. V.141. P. 503-512.

Judelson H.S., Roberts, S. Multiple loci determining insensitivity to phenilamide fungicides in *Phytophthora infestans* // Phytopathology. 1999. V.89, N 9. P. 754-760.

Jyan M.H., Ann P.J., Tsai J.N., Hsin S.D., Chang T.T., Liou R.F. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan // Canad. J. Plant Pathol. P. 188-192.

Kadish D., Cohen Y. Overseasoning of metalaxyl-sensitive and metalaxyl-resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato tubers // Phytopathology. 1992. V.82. P. 887-889.

Kalischuk M.L., Al-Mughrabi K.I., Peters R.D., Howard R.J., Platt H.W., Kawchuk L.M. Genetic composition of *Phytophthora infestans* in Canada reveals migration and increased diversity. // Plant Disease. 2012. V.96(12). P. 1729-1735.

Kato M., Mizubuti E.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Sensitvity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineage of *Phytophthora infestans* in the United States // Phytopathology. 1997. V.87. P. 973-978.

Kato M., Sato N., Takahashi K., Shimaniki T. Yearly change of frequency and geographic diatribution of A2 mating type isolates of *Phytophthora infestans* in Japan from 1987 to 1993 // Ann. Phytopathol. Soc. Japan. 1999. V.64. P. 168-174.

Kim K.J., Lee Y.S. Genetic DNA Marker for A2 mating type in *Phytophthora infestans* // The Journal of Microbiology. 2002. V.40. №. 4. P. 254-259.

Knapova G., Gisi U. Phenotypic and genotypic structure of *Phytophthora infestans* population on potato and tomato in France and Switzerland // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 641-553.

Knapova G., Schlenzig A., Gisi U. Crosses between isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato and characterization of F1 and F2 progeny for phenotypic and molecular markers // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 698-709.

Knapova, G, Tenzer, I., Gessler, G., Gisi, U. Characterization of *Phytophthora infestans* from potato and tomato with moleculare markers // Proceedings of the 5th congress of the European Foundation for Plant Pathology. Taormina, Italy. 2001. P. 6-9.

Ko W.H. An alternative possible origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico // Phytopathology. 1994. V.84. P. 1224-1227.

Koh Y.J., Goodwin S.B., Dyer A.T., Cohen B.A., Ogoshi A., Sato N., Fry W.E. Migrations and displacements of *Phytophthora infestans* populations in East Asian countries // Phytopathology. 1994. V.84. P. 922-927.

Kroon P.N.M., Brouwer H., de Coock A.W.A.M., Grovers F., The genus *Phytophthora* // Phytopathology. 2012. V.102. P 348-364.

Lagercrantz U., Ellegren H., Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. // Nucleic Acids Research 1993. V.21. P. 1111-1115.

Leberton L., Andrivon D. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype // Phytopathology. 1998. V.88. P. 583-594.

Leberton L., Lucas J-M., Andrivon D. Aggressiveness and competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolayes collected from potato and tomato in France // Phytopathology. 1999. V.89. P. 679-686.

Lees A.K., Wattier R., Sullivan L., Williams N.A., Cooke D.E.L. Novel microsatellite markers for the analysis of *Phytophthora infestans* populations. // Plant Pathology. 2006. V.55. P. 311-319.

Legard D.E., Lee T.Y., Fry W.E. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans:* aggrecciveness on tomato // Phytopathology. 1995. V.85. P. 1356-1361.

Li Y., Cooke D.E., Jacobsen E., van der Lee T. Efficient multiplex simple sequence repeat genotyping of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*. // J. Microbiol. Methods. 2013a. V.92(3). P. 316-322.

Li Y., Govers F., Mendes O., Testa A., Jacobsen E., Huang S.W., van der Lee T.A.J. A new set of highly informative SSR markers for P*hytophthora infestans* population analysis assembled into an efficient multiplex. // Molecular Ecology Resources. 2010. V.10. P. 1098-1105.

Li Y., van der Lee T.A.J., Zhu J.H., Jin G.H., Lan C.Z., Zhu S.X., Zhang R.F., Liu B.W., Zhao Z.J., Kessel G.J.T., Huang S.W., Jacobsen E. Population structure of *Phytophthora infestans* in China – geographic clusters and presence of the EU genotype Blue_13. // Plant Pathology. 2013b. V.62. P. 932-942.

Malcolmson J. F. & Black W. New R-genes in Solanum demissum Lindl. and their complementary races of *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* // Euphytica. 1966. V.15. №2. P. 199-203.

Malcolmson J. F. Vegetative hybridity in *Phytophthora infestans* // Nature. 1970. V. 225. P. 971-972.

May K.J., Ristaino J.B. Identity of the mtDNA haplotype(s) of *Phytophthora infestans* in historical specimens from the Irish potato famine. Mycology Research. 2004. V.108, P. 471-479.

Mazáková J., Táborský V., Zouhar M., Ryšánek P., Hausvater E., Doležal P. Occurrence and distribution of mating types A1 and A2 of *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary* in the Czech Republic. // Plant Protect. Sci. 2006. V.42. P. 41-48.

McKee R.K. Effects of ultraviolet irradiation on zoospores of *Phytophthora infestans* // Transact. British Mycil. Soc. 1969. V.52. P. 281-291.

Miller J.S., Hamm P.B., Johnson D.A. Characterization of the *Phytopththora infestans* populations in the Columbia basin of Oregon and Washington from 1992 to 1995 // Phytopathology. 1997. V.87. P. 656-660.

Miller J.S., Johnson D.A. Competitive fitness of *Phytophthora infestans* isolates under semiarid field conditions // Phytoparthology. 2000. V.90. P. 220-227.

Montarry J., Andrivon D., Glais I., Corbiere R., Mialdea G., Delmotte F. Microsatellite markers reveal two admixed genetic groups and an ongoing displacement within the French population of the invasive plant pathogen *Phytophthora infestans.* // Molecular Ecology. 2010. V.19. P. 1965-1977.

Mosa A.A., Kobayashi K., Ogoshi A., Kato M., Sato N. Isoensime polymorphysm and segregation in isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // Plant pathol. 1993. V. 42. P. 26-34.

Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // TREE. V.14. N.10. P. 389-394.

Muller K.O. Uber den augenbicklichen Stand unserer Kenntnis zur biologischen Spezialisierung des Krautfauleerrggers der Kartoffel (*Phytophthora infestans*) // Der Zuchter. 1935. N7.

Niederhauser J.S. International cooperation in potato research and development // Ann. Rev. Phytopathol. 1993. V.31. P. 1-21.

Niederhauser J.S. *Phytophthora infestans:* the Mexican connection. In "Phytophthora". Eds. J.A. Lucas, D.S. Shaw, L.R. Cooke. Camdrge Univ.Pr. 1991. P. 25-45.

Nielsen B.J., Cooke D.E.L., Hansen J.G. Monitoring the Danish population of potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans* in 2011-2012 and occurrence of 13_A2. // PPO-Special Report. 2014. V.16. P. 159-162.

Njoroge A.W., Tusiime G., Forbes G.A., Yuen J.E. Displacement of US-1 clonal lineage by a new lineage of *Phytophthora infestans* on potato in Kenya and Uganda. Plant Pathology. 2016. V.65(4). P. 587-592.

Ochwo M.K.N., Kamoun S., Adipala E., Rubaihayo P.R., Lamour K., Olanya M. Genetic diversity of *Phytyophthora infestans (Mont.)de Bary* in the Eastern and Western highlands of Uganda // J. Phytopathol. 2002. V.150. P. 541-542.

Oliva R.F., Erselius L.J., Adler N.E., Forbes G.A. Potential of sexual reproduction among host-adapted populations of *Phytophthora infestans* sensu lato in Ecuador // Plant Pathol. 2002. V.51. P. 710-719.

Oliva R.F., Flier W.G., Kroon L.P.N.M., Ristaino J.B., Forbes G.A. *Phytophthora andina*: a newly identified heterothallic pathogen of Solanaceous hosts in the Andean highlands. // Phytopathology. 2010. V.59(4), P. 613-625.

Oyarzun P.J., Pozo A., Ordonez M.E., Doucett K., Forbes G.A. Host specificity of *Phytophthora infestans* on tomato and potato in Ecuador // Phytopathology. 1998. V.88. P. 265-271.

Perez T., Albornoz J., Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature // Mol.Ecol. 1998. V.7. P. 1347-1358.

Peters R.D. (2017) Characterization and tracking of potato blight pathogen in Canada. Progress report March 2017. http://www.hortcouncil.ca/wp-content/uploads/2017/04/Late-Blight-AIP-2015-2018-Performance-Report-March-2017_EN.pdf (Дата просмотра - 25.08.2017).

Peters R.D., Al-Mughrabi K.I., Kalischuk M.L., Dobinson K.F., Conn K.L., Alkher H., Islam M.R., Daayf F., Lynn J., Bizimungu B., De Koeyer D., Lévesque C.A., Kawchuk L.M. Characterization of *Phytophthora infestans* population diversity in Canada reveals increased migration and genotype recombination. // Canadian Journal of Plant Pathology. 2014. V.36(1). P. 73-82.

Pule B.B., Meitz J.C., Thompson A.H., Linde C.C., Fry W.E., Langenhoven S.D., Meyers K.L., Kandolo D.S., van Rij N.C., McLeod A. *Phytophthora infestans* populations in central, eastern and southern African countries consist of two major clonal lineages. // Plant Pathology. 2012. V.62. P. 154-165.

Reis A., Smart C.D., Fry W.E., Maffia L.A., Mizubuti E.S.G. Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from Southern and Southeastern Brazil from 1998 to 2000 // Plant Disease. 2003. V.87. N.8. P. 896-900.

Rekad F.Z., Cooke D.E., Puglisi I., Randall E., Guenaoui Y., Bouznad Z., Evoli M., Pane A., Schena L., Magnano di San Lio G., Cacciola S.O. Characterization of *Phytophthora infestans* populations in northwestern Algeria during 2008-2014. // Fungal Biology. 2017. V.121(5). P. 467-477.

Ristaino J.B., Groves C.T., Parra G.R. PCR amplification of the Irish potato famine pathogen from historic specimens // Nature. 2001. V.411. P. 695-697.

Ristaino J.B., Hu C. DNA sequence analysis of the late-blight pathogen gives clues to the world-wide migration. // Acta Horticulturae. 2009. V.834, P. 27-40.

Ritch D.L., Daggett S.S. Nuclear DNA content and chromosome number in German isolates of *Phytophthora infestans* // Mycologia. 1995. V.87. P. 579-581.

Rubin E., Baider A., Cohen Y. Phytophthora infestans produced oospores in fruits and seeds of tomato // Phytopathology. 2001. V.91. P. 1074-1080.

Runno-Paurson E., Kiiker R., Joutsjoki T., Hannukkala A. High genotypic diversity found among population of *Phytophthora infestans* collected in Estonia. // Fungal Biology. 2016. 120. P. 385-392.

Sansome E., Brasier C.M., Hamm P.B. *Phytophthora meadii* may be a species hybrid // Mycol. Res. 1991. V.95. P. 273-277.

Savelkoul P.H., Aarts H.J.M., de Haas J., Dijkshoorn L., Duim B., Otsen M., Rademaker J.L.W., Schouls L., Lenstra J.A. Amplified Fragment Lenth Polymorphism analisys: the State of the Art // Journal of Clinical Microbiology. Oct. 1999. P. 3083-3091.

Savenkova L.V., Cherepnikova-Anikina M.I. Effect of metalaxyl and N-nitro-N-nitrosomethylurea on mating type of *Phytophthora infestans* // J. Russ. Phytopathol. Soc. 2002. V.3. P. 33-38.

Saville A.C., Martin M.D., Ristaino J.B. Historic late blight outbreaks caused by a widespread dominant lineage of *Phytophthora infestans (Mont.) de Bary.* // PLoS ONE. 2016. 11(12). Article ID e0168381.

Schober-Butin B., Knapova G., Knipfelberg I. & Niepold F. *Phytophthora infestans* in Germany: population dynamics and modern methods in diagnosis // Phytophthora infestans -150. Eds L. J. Dowley et al., Dublin: Bool Press Ltd. 1995. P. 96-101.

Schulman Alan H. Molecular markers to assess genetic diversity // Euphytica on-line. 2006. P. 1-9.

Schwinn F.J., Staub T. Biological properties of metalaxyl. In “System Fungizides and Antifungale Verbindungen” // 6 Internat. Symp. Abh. Akad. Wiss. DDR. 1980. P. 123-133.

Shattock R.C., Shaw D.S. Novel phenotypes of *Phytophthora infestans* from mixed cultures of antibiotic resistant mutants // Transact. British Mycol. Soc. 1976. V.67. P. 201-206.

Shaw D. S. Genetics // in: Advances in Plant Pathology. Phytophthora infestans the cause of late blight of potato, edited by D. S Ingram & P. H. Williams, London: Academic Press. 1991. V.7. P. 131-170.

Shaw D., Nagy Z.A., Evans D., Deahl K. The 2005 population of *Phytophthora infestans* in Great Britain: the frequency of A2 mating type has increased and new molecular genotypes have been detected. // PPO-Special Report. 2007. V.12. P. 137-144.

Sjöholm L., Andersson B., Hösberg N., Widmark A.-K., Yuen J. *Phytophthora infestans* in the Nordic countries. // Fungal Biology. 2013. V.117. P. 722-730.

Statsyuk N.V., Semina Y.V., Perez F.G.M., Larsen M.M., Kuznetsova M.A., Kozlovskaya I.N., Morozova E.V., Deahl K.L., Grunwald N.J. Characterization of Russian Phytophthora infestans populations: DNA fingerprinting and SSR analysis. // PPO – Special Report. 2014. V.16. P. 255-266.

Stellingwerf J. (2017) Can late blight resistance in potato drive genetic diversification in a clonal *Phytophthora infestans* population? 16th Euroblight Workshop (May 13-17, Aarhus, Denmark). http://euroblight.net/fileadmin/euroblight/Presentations/2_Jeroen_Stellingwerf.pdf (Дата просмотра: 12.08.2017).

Stem J.M., Kirk W.W. The generation and quantification of resistance to dimethomorph in *Phytophthora infestans* // Plant Disease. 2004. V.88. P. 930-934.

Suassuna N.D., Maffia I.A., Mizubuti F. S.G. Aggressiveness and host specificity of Brasilian isolates of *Phytophthora infestans* // Plant Pathol. 2004. V.53. P. 405-413.

Sujkovski L. S., Goodwin S. B., Dyer A. T., Fry W. E. Increased genotypic diversity via migration and possible occurence of sexual reproduction of *Phytophthora infestans* in Poland // Phytopathology. 1994. V.84. P. 201-207.

Sujkowski L.S., Goodwin S.B., Fry W.E. Changes in specific virulence in polish population of *Phytophthora infestans*: 1985–1991 // Eur. J. Plant Pathol. 1991. V.102. P. 555-561.

Therrien C.D., Daggett S.S., Ritch D.L., Sato N., Spielman L.J., Tolley P.N. Mating type, nuclear DNA content, and isozyme composition of thirty-three isolates of *Phytophthora infestans* from Japan // Phytopathology. 1990. V.80. P. 124 (abstr.).

Therrien C.D., Ritch D.L., Davidse L.C., Jespers B.K., Spielman L.J. Nuclear DNA content, mating type, and metalaxyl sensitivity of eighty-three isolates of *Phytophthora infestans* from the Netherlands // Mycol. Res. 1989. V.92. P. 140-146.

Turner R.S. After the famine: plant pathology, *Phytophthora infestans,* and the late blight of potatoes, 1845-1960. // Historical Studies in the Physical and Biological Sciences. 2005. V.35(2). P. 341-370.

Van den Bosch T., Li Y., Evenhuis B., Forch M., Kessel G., van der Lee T. (2011) Population of *Phytophthora infestans* in the Netherlands during the first decade of the 21st century. 13th EuroBlight workshop (Oct 9-12, 2011, St. Petersburg, Russia). http://130.226.173.223/euroblight/Workshop/2011StPetersburg/PPT/01_02_VandenBosch.pdf (Дата просмотра: 09.08.2017).

VanBruggen A.H.C. Plant disease severity in high-input compared to rediced-input and organic farming system // Plant Disease. 1995. V.79. N.10. P. 976-984.

Vartanian V. G. & Endo R. M. Overwintering hosts, compatibility types and races of *Phytophthora infestans* on tomato in Southern California // Plant Disease. 1985. V.69. P. 516-520.

Vega-Sanchez M.E., Erselius L.J., Rodriguez A.M., Bastidas O., Hohl H.R., Ojiambo P.S., Mukalazi J., Vermeulen T., Fry W.E., Forbes G.A. Host adaptation to potato and tomato within the US-1 clonal lineage of *Phytophthora infestans* in Uganda and Kenya // Plant Pathol. 2000. V.49. P. 531-539.

Veld W.A.M in’t, Veenbaas-Rijks W.J., Ilieva E., de Cock A.W.A.M., Bonants P.J.M., Pieters R. Natural hybrids of Phytophthora nicotianae and *Phytophthora cactorum* demonstrated by isozyme analysis and random amplified polymorphic DNA // Phytopathology. 1998. V.88. P. 922-929.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting // Nucleic Acids Res. 1995. V. 23. № 21. P. 4407 –4414.

Wang J., Fernández-Pavía S.P., Larsen M.M., Garay-Serrano E., Gregorio-Cipriano R., Rodríguez-Alvarado G., Grünwald N.J., Goss E.M. High levels of diversity and population structure in the potato late blight pathogen at the Mexico centre of origin. // Molecular Ecology. 2017. V.26(4). P. 1091-1107.

Weingartner D.P., Tombolato D. Temporal, geographic and host distribution of *Phytophthora infestans* genotypeas in Florida // Amer. Potato J. 2004. V.81. P. 94-95.

Whittaker S.L., Shattock R.S., Shaw D.S. The duplication cycle and DAPI-DNA contents in nuclei in germinationg zoopores cysts of *Phytophthora infestans* // Mycol. Res. 1992. V.96. P. 355-358.

Wiebe M.G., Robson G.D., Oliver S.G., Trinici A.P.J. Evolution of Fusarium graminearum a315 grown in a series of glucose-limited chemostat cultures at a high dilution rate // Mycol. Res. 1995. V.99. P. 173-178.

Yoshida K. Schuenemann V.J., Cano L.M., Pais M., Mishra B., Sharma R., Lanz C., Martin F.N., Kamoun S., Krause J., Thines M., Weige D., Burbano H.A. (2013) The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. eLife, 2, Article ID e00731.

Yoshida K., Burbano H.A., Krause J., Thines M., Weigel D., Kamoun S. Mining herbaria for plant pathogen genomes: back to the future. // PLoS Pathogens. 2014. 10(4). Article ID e1004028.

Yuen J.E. Modelling pathogen competition and displacement – *Phytophthora infestans* in Scandinavia. // European Journal of Plant Pathology. 2012. V.133. P. 25-32.

Ziegle J.S.; Su Y.; Corcoran K.P.; Nie L.; Mayrand P.E.; Hoff L.B.; Mcbride L.J.; Kronick M.N.; Diehl S.R. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. // Genomics. 1992. V.14. P. 1026-1031.

Поступила в редакцию: 10.09.2017
Опубликовано: 15.11.2017

Владимиру Николаевичу Зейруку – 70 лет

2 января 2018 г исполняется 70 лет со дня рождения доктора сельскохозяйственных наук, заслуженного деятеля науки Московской области, заведующего лабораторией защиты ВНИИ картофельного хозяйства (ВНИИКХ) Владимира Николаевича Зейрука.

Владимир Николаевич с отличием окончил Житомирский сельскохозяйственный институт, работал агрономом в Волынской области, служил на Балтийском флоте, где прошел путь от матроса до лейтенанта. Свою дальнейшую жизнь юбиляр связал со «вторым хлебом» – картофелем, которым увлекся уже с 1-го курса института. Научную деятельность В.Н. Зейрук начинал в отделе первичного семеноводства Украинского НИИ картофельного хозяйства.

По партийному призыву КПСС 2 года работал 1-м секретарем Бородянского ЛКСМ Киевской области Украины. Ему пришлось комплектовать кадры для строительства БАМа и Чернобыльской АЭС.

Аспирантская работа, проведенная в 1976-1979 гг. во ВНИИКХ, была посвящена изучению штаммового состава наиболее патогенных вирусов картофеля. На один из обнаруженных юбиляром штаммов было получено авторское свидетельство, первое в практике отечественного картофелеводства.

Работая после окончания аспирантуры главным агрономом производственно-технического отраслевого центра НОТ приложил много усилий и профессионализма для налаживания системы семеноводства картофеля в Курской, Белгородской, Московской и Рязанской областях.

Во ВНИИКХ, в различные периоды своей деятельности, Владимир Николаевич заведовал интродукционно-карантинной лабораторией, секторами технологии защиты и оптимизации применения фунгицидов, был ведущим сотрудником отдела хранения, руководил отделом семеноводства, а последние 11 лет возглавляет отдел защиты.

В настоящее время Владимир Николаевич ведет поиск экологических приемов защиты и технологий улучшения сохранности и качества полученного урожая картофеля, уменьшения его потерь. Он автор и соавтор более 300 статей и рекомендаций, 18 авторских свидетельств и патентов, 11 книг, часто выступает на международных, всероссийских и региональных конференциях, семинарах и совещаниях.

Картофелеводы знают В.Н. Зейрука как человека высокой эрудиции и принципиальности, твердых убеждений, неустанного трудолюбия и большой сердечной доброты, в то же время не лишенного самокритики и юмора.

Наряду с научной деятельностью Владимир Николаевич ведет большую общественную работу. В разные годы был секретарем партийной организации института, членом Горкома КПСС, неоднократно избирался поселковым и районным депутатом, баллотировался в депутаты Московской областной Думы.

В настоящее время В.Н. Зейрук – член ученого совета ВНИИКХ, эксперт РАН, занимается подготовкой студентов и аспирантов, выступает в периодической прессе и по телевидению, участвует в общественной и спортивной жизни поселка Красково и Люберецкого района. С 2010 года входит в состав редколлегии журнала «Защита картофеля».

За плодотворную научную и производственную деятельность В.Н. Зейрук награжден медалями «В память 850-летию Москвы», «Лауреат ВВЦ», Почетной грамотой Министерства сельского хозяйства Московской области, Почетными знаками Московской областной Думы «За трудовую доблесть» и «За труды», многими грамотами и благодарностями.

Ученые – картофелеводы России, Украины и Белоруссии, коллеги и друзья поздравляют от всей души Владимира Николаевича со славным юбилеем и желают ему доброго здоровья, благополучия и неиссякаемых сил для дальнейшей плодотворной деятельности на благо Российской науки!