

Б. С. Жуков¹, Є. В. Демедюк², Т. В. Гудзенко²

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна,
e-mail: tgudzenko@ukr.net

¹Випробувальний центр ІП «СЖС Україна»,
вул. Чорноморського Козацтва, 103, м. Одеса, 65059, Україна,
e-mail: tgudzenko@ukr.net

МОНІТОРИНГ ГЕНЕТИЧНОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ ПОПУЛЯЦІЇ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* – ЗБУДНИКА ФІТОФТОРОЗУ КАРТОПЛІ НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

Знання генетичної структури популяцій таких фітопатогенів як *Phytophthora infestans* є невід'ємною частиною успішного контролю фітофторозу – широко розповсюдженої найбільш руйнівної хвороби картопляних культур, яка завдає величезних економічних збитків у всіх країнах світу. **Мета.** Встановити генетичну різноманітність популяції *P. infestans* – збудника фітофторозу картоплі на території України. **Методи.** Ізоляцію чистих культур *P. infestans* проведено методом блоттерів на картопляних дисках з наступним послідовним пересіванням на житній агар з додаванням рифампіцину (RAB-R) та картопляно-декстрозний агар (PDA). Генетичне типування ліній вітчизняних *P. infestans* проводили за допомогою SSP ПЛР аналізу. Аналітичні дендрограми формували за допомогою програмного забезпечення MEGA 1. **Результати.** У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу з використанням 10 мікросателітних маркерів, 35 вітчизняних ізолятів *P. infestans* розподілилися на 17 генотипів, що свідчить про високий рівень поліморфності у популяції, яка не пов'язана ні з регіоном виділення, ні з сортом ураженої картоплі. Частота генотипів коливалася від 2,86 до 11,43%. Найбільш розповсюдженими на Україні генотипами виявилися С, F та G. Найменшу генетичну різноманітність було виявлено у популяції *P. infestans* Львівської області. Зразки, що отримано з інших областей, демонструють високу гетерогенність. Кореляції між регіонами та сортами картоплі, з яких отримано зразки *P. infestans*, та їх генотипами не спостерігається. **Висновки.** Встановлено генетичну різноманітність популяції збудника фітофторозу картоплі на території України – 35 вітчизняних ізолятів *P. infestans* розподілилися на 17 генотипів без значного зміщення в бік певного варіанту, що свідчить про високий рівень поліморфності у популяції.

Ключові слова: фітофтороз картоплі, генотипи *Phytophthora infestans*, кластерний аналіз, Україна.

Фітофтороз, спричинений ооміцетом *Phytophthora infestans*, є найбільш руйнівною хворобою картопляних культур, яка завдає величезних економічних збитків, які оцінюються від 1 до 10 мільярдів євро в країнах, що розвива-



ються, і в розвинених країнах, відповідно, без урахування додаткових наслідків для суспільства та навколишнього середовища [9]. У наш час, у країнах, що розвиваються, уражена площа становить 2–3 мільйони гектарів з 13 мільйонів світової площі посіву картоплі. За консервативними оцінками на частку фітофторозу приходиться 15% втрат фактичної та 25% досяжної врожайності [5, 6, 14].

Популяція *P. infestans* у Європі характеризується високою динамічністю. Одним з прикладів суттєвих зрушень стала поява типу спарювання A2, що призвела до витіснення лінії *US-1* та насичення популяції новими варіантами, зокрема *EU_13_A2*, з більшою вірулентністю та резистентністю до металаксилу. Сьогодні популяція *P. infestans* формується з широкого розмаїття генотипів, деякі з яких є панівними клоновими лініями, а інші є рідкісними або навіть унікальними для року чи місця. Такі зміни становлять значну загрозу для картоплярства через зростання потенціалу формування нових більш агресивних генотипів, здатних долати сортову стійкість, набувати резистентність до фунгіцидів та швидко замішувати раніше сформовані популяції.

P. infestans de Vary це вид грибів ооміцетів, який як і культурна картопля, мають спільне південно-американське походження з регіону Анд або Мексики. Картопля є важливою продовольчою культурою, яку може уражувати *P. infestans*, окрім картоплі цей фітопатоген може зустрічатися і на інших культурах з пасльонових, наприклад на томатах (*Solanum lycopersicum*) та баклажанах (*Solanum melongena*).

Фітофтороз, спричинений *P. infestans*, викликає загнивання та відмирання листя. На черешку і стеблі уражених рослин можуть розвинутися плями, які розширюються і мають довгу форму, шкірка заражених бульб картоплі виглядає нерівномірно бляклою, викривленою та злегка водянистою, м'якоть бульби картоплі стає коричневою [10].

Дане захворювання характеризується регулярними рецидивами, а патоген є надзвичайно вірулентним [5]. Еволюція патогену спостерігається неспинно, вже починаючи з його першої реєстрації у 1840-их роках [12]. Лише за останні десятиріччя збудник фітофторозу зазнав значних генетичних перетворень через внутрішньопопуляційні зміни частоти генотипів та міжпопуляційні схрещування. Це спричинило значні проблеми у зонах вирощування картоплі по всьому світу [13].

Боротьба з фітофторозом ускладнюється змішаною репродуктивною системою, що сприяє еволюції *P. infestans*. Даний патоген є гетероталічним організмом, який для статевого процесу вимагає контакту міцелію сформованого представниками A1 та A2 типів спарювання. Будучи самостерильними, при контакті у спільній популяції вони здатні формувати стійкі ооспори, що формують нову генетичну лінію *P. infestans*. У зв'язку з цим, міграції обох типів спарювання в Європу збільшило генетичне різноманіття збудника [1]. У більшості країн світу популяції *P. infestans* дотримуються переважно нестатевого життєвого циклу, і збудник мігрує через повітряне розповсюдження або глобальну торгівлю насінням картоплі. Цей спосіб призводить до безперервного та повторюваного впровадження нових генотипів, які зазнають селекційного тиску в умовах місцевого середовища та агрономічної практики, що при-



зводить до генетичної реструктуризації популяцій і створює проблеми для виробництва сільськогосподарських культур [4, 14]. Серед одних з головних сучасних європейських генетичних ліній, що викликають занепокоєння є лінія EU_13_A2 (Blue 13), та EU_33_A2 (Green 33) [8]. За таких умов, зростання генетичного різноманіття у популяції сприяє підвищенню загрози формування нових загрозливих ліній з непередбачуваними характеристиками.

Знання генетичної структури популяцій патогенів є невід'ємною частиною успішного контролю. Послідовні повтори, також відомі як мікросателітні маркери (SSR), дуже варіабельні, розподілені по геному, інформативні та надійні в експериментальних умовах, і, отже, широко визнані як «золотий стандарт» для генетичного дослідження популяцій *P. infestans* [11].

Таким чином, молекулярно-генетичне дослідження місцевих популяцій *P. infestans* дозволяє здійснювати моніторинг змін з метою раннього виявлення процесів адаптації в популяції *P. infestans* у певному регіоні. Моніторинг надасть змогу вчасно адаптувати заходи контролю та агротехнології спрямовані на запобігання втрати врожаїв, зниження шкоди навколишньому середовищу, що виникає у зв'язку з масштабним застосуванням пестицидів, та запобігти утворенню на території України ареалів стійких популяцій *P. infestans*.

Мета роботи: встановити генетичну різноманітність популяцій *P. infestans* – збудника фітофторозу картоплі на території України.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження були 35 зразків картопляного листа з ознаками ураження фітофторозом, отримані з господарств які розташовані в різних регіонах України. Перелік зразків надано у таблиці 1.

Загалом досліджували 22 сорти картоплі, що вирощувалися на ділянках які охоплювали 10 областей України. Перелік сортів та кількість зразків надано у таблиці 2.

Ізоляцію чистих культур *P. infestans* було проведено за допомогою методу блоттерів на картопляних дисках з наступним послідовним пересіванням на житній агар з додаванням ріфампіцину (RAB-R) та картопляно-декстрозний агар (PDA) [12].

Зрізи з переднього краю ураженого листа було вирізано за допомогою стерильного скальпелю, та перенесено на скибочки картоплі. Сформовані блоти інкубовано протягом 5 діб при температурі 18 ± 1 °C у темних умовах. Осередки споруутворення переносили на поверхню живильного середовища RAB-R з додаванням ріфампіцину у концентрації 25 мкг/мл [12]. Посіви інкубовано протягом 7 діб при температурі 15 ± 1 °C у темних умовах.

Чистоту культури *P. infestans* підтверджували типуванням спор за допомогою мікроскопії у світлому полі.

Географічне покриття та кількість ізолятів, що отримано з означених вище зразків, відображено на рисунку 1.

Накопичення біомаси чистих культур *P. infestans* для проведення подальших етапів дослідження було здійснено пересівання на поверхню поживного середовища PDA, з наступною інкубацією протягом 7 діб при температурі 15 ± 1 °C у темних умовах. Екстракцію геномної ДНК проводили за допо-



Таблиця 1

Table 1

Перелік зразків картопляного листя, що було взято в дослідження

List of potato leaf samples taken for the study

№	Область та район походження	Сорт	№	Область та район походження	Сорт	№	Область та район походження	Сорт
1	Херсонська обл., с. Чумаківка	Інара	13	Львівська обл., с. Вирів	ВГ 808	25	Київська обл., с. Шпильки	Верді
2	Херсонська обл., с. Чумаківка	Карпена	14	Львівська обл., с. Вирів	Леді Клер	26	Київська обл., с. Шпильки	Тоскана
3	Херсонська обл., с. Чумаківка	Леді Клер	15	Львівська обл., с. Вирів	Леді Клер	27	Житомирська обл., с. Гальчин	Агаг
4	Чернігівська обл., с. Пльохів	Тоскана	16	Львівська обл., с. Вирів	ВГ 808	28	Житомирська обл., с. Межирічка	Пікасо
5	Чернігівська обл., с. Пльохів	Наташа	17	Волинська обл., с. Торчин	Лагона	29	Тернопільська обл., м. Дворіччя	Скарлет
6	Чернігівська обл., с. Понорниця	Сифра	18	Хмельницька обл., с. Великі Калетинці	Пікасо	30	Тернопільська обл., с. Васильківці	Астерікс
7	Чернігівська обл., с. Понорниця	Белароса	19	Житомирська обл., с. Тупольці	Гала	31	Тернопільська обл., с. Новий Нижбірок	Скарлет
8	Чернігівська обл., с. Виблі	Белароса	20	Київська обл., с. Пухівка	Піраль	32	Дніпропетровська обл., с. Котовка	Романа
9	Чернігівська обл., пгт. Сосниця	Белароса	21	Житомирська обл., с. Брусилів	Пікасо	33	Дніпропетровська обл., с. Котовка	Монарт
10	Чернігівська обл., с. Городниця	Белароса	22	Київська обл., с. Городниця	Зіфра	34	Дніпропетровська обл., с. Котовка	Сифра
11	Полтавська обл., с. Комишня	Рів'єра	23	Київська обл., с. Красилівка	Тоскана	35	Тернопільська обл., с. Капустинці	Астерікс
12	Полтавська обл., с. Комишня	Лабела	24	Київська обл., с. Маковиця	Аладін			



Таблиця 2

Перелік сортів картоплі, взятих у дослідження

Table 2

List of potato varieties included in the study

№	Сорти картоплі	Кількість зразків	№	Сорти картоплі	Кількість зразків
1	Агат	1	12	Латона	1
2	Аладін	1	13	Леді Клер	3
3	Астерікс	2	14	Моцарт	1
4	Белароса	4	15	Нагаша	1
5	ВГ 808	2	16	Пікасо	3
6	Верді	1	17	Піраль	1
7	Гала	1	18	Рів'єра	1
8	Зіфра	1	19	Романа	1
9	Інара	1	20	Сифра	2
10	Карпена	1	21	Скарлет	2
11	Лабела	1	22	Тоскана	3



Рис. 1. Географічне покриття дослідження, та кількість ізолятів *P. infestans*, отриманих зі зразків по регіонах України

Fig. 1. Geographical coverage of the study and the number of isolates of *P. infestans* obtained from samples by regions of Ukraine

могою комерційних наборів згідно з інструкцією виробника, з врахуванням вимог ISO 21571 [7].

Кількість та якість отриманої ДНК оцінювали за допомогою спектрофотометрії, з метою досягнення оптимальної концентрації з порівняним значенням більше 30 нг/мкл у всіх зразках.

Висновок щодо придатності ДНК для подальшого дослідження здійснювали на підставі аналізу відношення поглинання розчином на довжинах хвиль 260/280 та 260/230 нм. Дані співвідношення демонстрували наявність чи відсутність у розчині ДНК речовин, що мають здатність негативно впливати на проходження ПЛР. До таких речовин відносяться протеїни, феноли та інші. Максимальне досягнення необхідного співвідношення 260/280 та 260/230, що дорівнює приблизно 1,7 та 1,9 відповідно, є необхідною умовою для прийняття екстрагованого матеріалу для реалізації ПЛР. Для поліпшення контролю якості, нами було прийнято діапазони приємності для чистоти на довжинах хвиль 260/280 рівним 1,8–2,1, а на довжинах 260/230 – 2,0–2,2.

За результатами аналізу джерел літератури було відібрано 10 пар мікросателітних локусів які характеризуються найбільшою диференціальною здатністю. Перелік праймерів [2, 9], за допомогою яких було проведено генетичне типування ліній вітчизняних *P. infestans*, надано у таблиці 3.

Таблиця 3

Перелік праймерів, що було використано у дослідженні [2, 9]

Table 3

List of primers used in the study [2, 9]

Маркер	SSR Праймер 5'-3'	Мотив	Маркер	SSR Праймер 5'-3'	Мотив
G11	F: tgctattatcaagcgtgg R: tacaatctgcagccgaaga	TC	SSR3	F: acttgcaactaccgccc R: gtttcagaactaccgccc	GT
Pi4B	F: aaaataaagcctttggtca R: gcaagcaggttttagatt	TC	SSR4	F: tcttgctcagatcgacg R: gttcactcgggagaaaggcttc	CT
Pi63	F: atgacgaagatgaaagtgagg R: cgtatttctgttatctaacc	GAG	SSR6	F: gtttggtgggctgaagtttt R: tcgccacaagattattccg	AT
Pi70	F: atgaaaatacgtcaatgctcg R: cgttgatattctattcttcg	AAG	SSR8	F: aatctgatcgcaactgagg R: gtttacaatacacacgtcgtcc	AC
SSR2	F: cgactctacatcaaccggc R: gtttgcttgactgcgtcttagc	CT	SSR11	F: ttaagccacgatgatgctg R: gtttagacaattggttggtcgc	AG

Для проведення SSR ПЛР аналізу було використано комерційний набір реактивів та програма ампліфікації, з врахуванням рекомендацій EusaBlight та EuroBlight з наступними умовами: 1 цикл – 95 °C 2 хвилини; 30 циклів: 58 °C 25 секунд, 72 °C 60 секунд, 95 °C 20 секунд, 72 °C 20 хвилин. Зберігання зразків здійснювали при 4 °C [16].

Розподіл та візуалізацію фрагментів проводили за допомогою електрофорезу у ПААГ. Для проведення електрофорезу, використовували 7% ПААГ що складався з наступних реактивів, з врахуванням приготування смужки для



герметизації скла: – ТВЕ буфер х10 – 3,55 мл; 10,8 г трис; 5,5 г борна кислота; 0,75 г трилон Б; 100 мл дистильована вода; – акриламід 30% – 8,22 мл; 29 г акриламід; 1 г бісакриламід; 100 мл дистильована вода; – дистильована вода – 23,22 мл; – ТЕМЕД – 45 мкл; – персульфат амонію – 450 мкл. Розділення продуктів ампліфікації проводили за напруги 280В протягом 2 годин. Забарвлення результатів електрофорезу здійснювали впродовж 20 хвилин інкубацією гелю у розчині інтеркаляційного агенту – бромистого етидію. Оцінювання результатів проводили за допомогою приладу UVP.

Аналітичні дендрограми формували за допомогою програмного забезпечення MEGA 11 [16]. Конструювання дендрограми проводили відносно одного з отриманих генотипів, який приймали як відправну точку кластеризації за алгоритмом Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA).

Результати та їх обговорення

За результатами ПЛР аналізу, який було проведено з використанням праймерів до десяти мікросателітних локусів, було отримано дані відносно поліморфізму 35 ізолятів *P. infestans*. Результати представлено у таблиці 4.

Таблиця 4

Алельний стан мікросателітних локусів *P. infestans*, що встановлено за допомогою ПЛР аналізу

Table 4

Allelic status of microsatellite loci of *P. infestans* determined by PCR analysis

№	g11	pi4b	pi63	pi70	ssr2	ssr3	ssr4	ssr6	ssr8	ssr11
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	162	205/217	285	192	170	260	320	260	256	352/341
2	162	205/217	285	192	170	260	320	260	256	352/341
3	162	205/217	285	192	173	260	320	260	256	352/341
4	162	205/217	285	192	173	260	320	260	256	352/341
5	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	352/341
6	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	352/341
7	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	341
8	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	352/341
9	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	352/341
10	162	205/217	285	192	165	260	294	260	256	352/341
11	162	205/217	285	192	165	260	294	260	256	352/341
12	162	205/217	285	192	165	260	294	260	256	352/341
13	162	205/217	285	192	165	266	292	260	256	352/341
14	162	205/217	285	192	165	266	292	260	256	352/341
15	162	205/217	285	192	165	266	292	260	256	352/341
16	162	205/217	285	192	165	266	292	260	256	352/341
17	162	205/217	285	192	165	275	292	260	256	352/341



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
18	162	205/217	285	192	165	275	292	260	256	352/341
19	162	205/217	285	192	165	275	292	260	256	352/341
20	162	205/217	285	192	165	260	292	260	256	352/341
21	162	205/217	285	192	165	260	292	260	256	352/341
22	162	205/217	285	192	173	260	292	260	256	352/341
23	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	352/341
24	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	352/341
25	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	341
26	162	205/217	285	192	170	260	292	260	256	352/341
27	162	205/217	285	192	165	275	292	260	256	352/341
28	162	205/217	285	192	165	260	292	260	256	352/341
29	162	205/217	285	192	170	260	292	260	256	341
30	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	352
31	162	205/217	285	192	165	275	287	260	256	352/341
32	162	205/217	285	192	165	260	284	260	256	352/341
33	162	205/217	285	192	165	260	287	260	256	352/341
34	162	205/217	285	192	165	260	287	260	256	352/341
35	162	205/217	285	192	165	260	287	260	256	352/341

Найбільш інформативними були маркери *ssr2*, *ssr3*, *ssr4* та *ssr11*. На відміну від *g11*, *pi4b*, *pi63*, *pi70* та *ssr8*, що продемонстрували відсутність поліморфізму, ці маркери надали змогу диференціювати вітчизняні ізоляти за генотипом. Отриманий поліморфізм та частота алелів продемонстровано у таблиці 5.

Таблиця 5

Варіанти довжин та частоти фрагментів ампліфікації зразків *P. infestans*

Table 5

Variants of lengths and frequencies of amplification fragments of *P. infestans* samples

Локус	Довжина фрагменту, п.н.	Частота, %	Локус	Довжина фрагменту, п.н.	Частота, %
<i>g11</i>	162	100	<i>ssr6</i>	260	100
<i>pi4b</i>	205/217	100	<i>ssr8</i>	256	100
<i>pi63</i>	285	100	<i>ssr4</i>	284	14,29
<i>pi70</i>	192	100		287	11,40
<i>ssr2</i>	165	54,29		292	40,00
	170	22,86	294	22,86	
	173	22,86	320	11,43	
<i>ssr3</i>	260	74,29	<i>ssr11</i>	341	9,09
	266	11,43		352	3,03
	275	14,29		352/341	93,94



Таким чином, за допомогою 10 мікросателітних маркерів було виявлено 17 генотипів (А-Q), що є характерними для проаналізованих зразків вітчизняної популяції *P. infestans*. Мікросателітні комбінації даних генотипів продемонстровано у таблиці 6.

Таблиця 6

**Варіанти генотипів українських ізолятів *P. infestans*
за мікросателітними маркерами**

Table 6

**Genotype variants of Ukrainian *P. infestans* isolates determined
by microsatellite markers**

№ генотипу	g11	pi4b	pi63	pi70	ssr2	ssr3	ssr4	ssr6	ssr8	ssr11
A	162	205/217	285	192	170	260	320	260	256	352/341
B	162	205/217	285	192	173	260	320	260	256	352/341
C	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	352/341
D	162	205/217	285	192	173	260	294	260	256	341
E	162	205/217	285	192	165	260	294	260	256	352/341
F	162	205/217	285	192	165	266	292	260	256	352/341
G	162	205/217	285	192	165	275	292	260	256	352/341
H	162	205/217	285	192	165	260	292	260	256	352/341
I	162	205/217	285	192	173	260	292	260	256	352/341
J	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	352/341
K	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	341
L	162	205/217	285	192	170	260	292	260	256	352/341
M	162	205/217	285	192	170	260	292	260	256	341
N	162	205/217	285	192	170	260	284	260	256	352
O	162	205/217	285	192	165	275	287	260	256	352/341
P	162	205/217	285	192	165	260	284	260	256	352/341
Q	162	205/217	285	192	165	260	287	260	256	352/341

Згідно з отриманими даними, частота генотипів коливалася від 2,86 до 11,43%. Найбільш розповсюдженими генотипами виявилися С, F та G. Однак їх частоти не дозволяють різко відокремити їх від загальної групи, у зв'язку з порівняно низькою варіативністю за середньої частоти $5,88\% \pm 3,42\%$ з модальним значенням 2,86%.

Частоту генотипів українських ізолятів *P. infestans* за мікросателітними маркерами представлено у таблиці 7.

Розподіл даних генотипів по областях, що були охоплені проведеним дослідженням, продемонстровано на рисунку 2.

Незважаючи на невеликий обсяг вибірки, використання мікросателітних маркерів дозволив виявити генотипи, що є спільними для деяких регіонів України. Матриця перехрестя генотипів наведена у таблиці 8.



Таблиця 7

Частота генотипів українських ізолятів *P. infestans* за мікросателітними маркерами

Table 7

Frequency distribution of Ukrainian *P. infestans* isolates' genotypes based on microsatellite markers

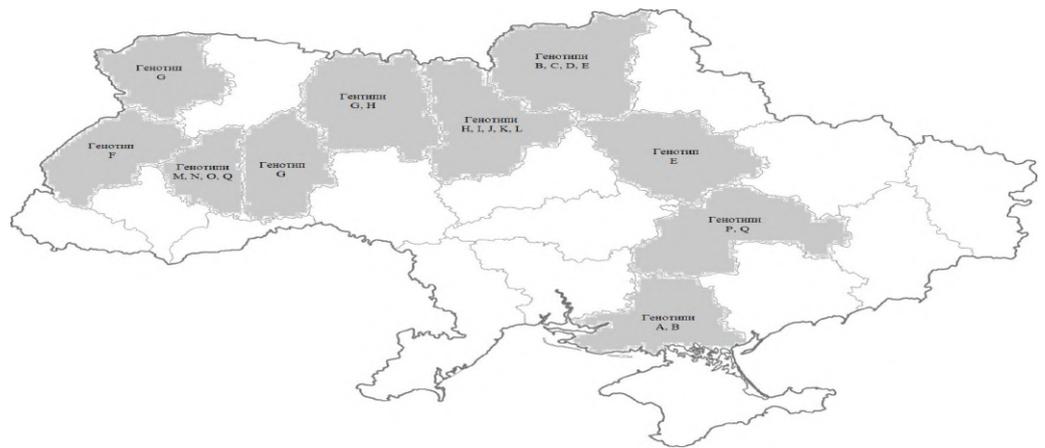
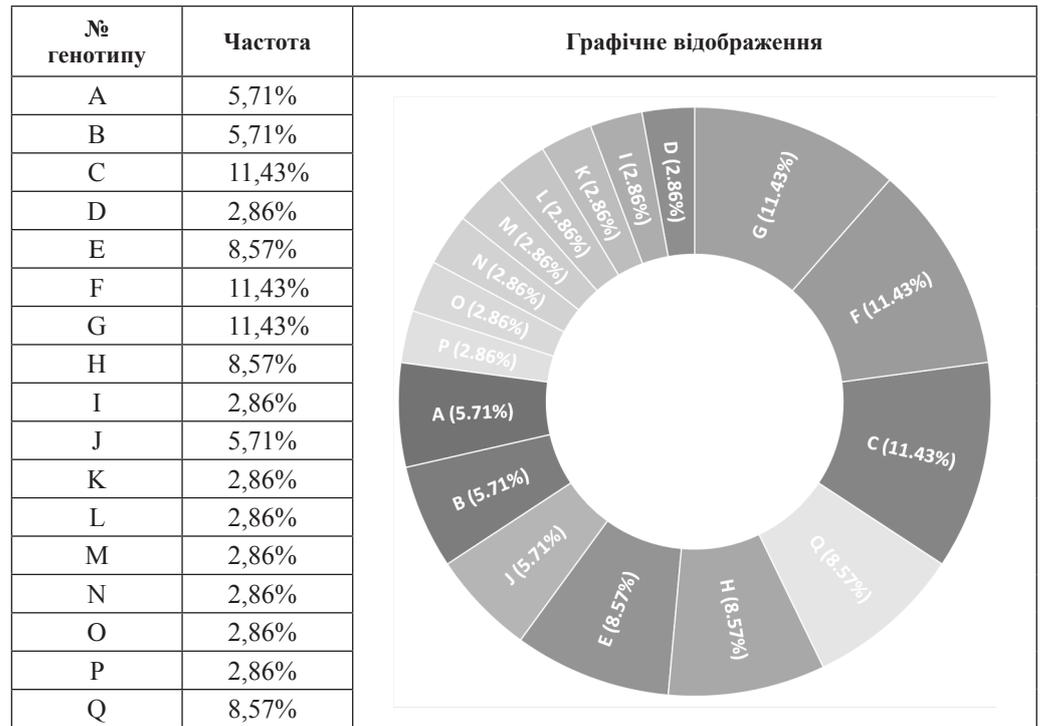


Рис. 2. Географічне розташування встановлених генотипів *P. infestans* по регіонах України

Fig. 2. Regional geographic distribution of detected *P. infestans* genotypes in Ukraine



Таблиця 8

Розподіл встановлених генотипів *P. infestans* за регіонами України

Table 8

Distribution of identified *P. infestans* genotypes across regions of Ukraine

Область походження	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Волинська							+										
Дніпропетровська																+	+
Житомирська обл							+	+									
Київська								+	+	+	+	+					
Львівська						+											
Полтавська					+												
Тернопільська													+	+	+		+
Херсонська	+	+															
Хмельницька							+										
Чернігівська		+	+	+	+												

Хоча, деякі варіанти генотипів, такі як G та E, мали спільну регіональну межу, більшість з них не продемонстрували регіональної залежності.

Для детальнішого дослідження ймовірних зв'язків або тенденцій, було сформовано графічне відображення регіонального розподілу встановлених генотипів *P. infestans* за допомогою формування дендрограми. Дендрограму сконструйовано відносно генотипу А. Слід відмітити, що дана дендрограма не містить інформації у довжині та чергуванні гілок (рис. 3).

Ізоляти *P. infestans*, що отримано з Дніпропетровської та Житомирської областей виявляли значну гетерогенність, але в межах одного кластеру.

Згідно з цим, чіткої кореляції між регіонами, з яких отримано зразки *P. infestans*, та їх генотипами, встановленими за допомогою 10 означених молекулярних маркерів, не спостерігається.

Для визначення ймовірного зв'язку між генотипом *P. infestans* та сортом картоплі, з якого він був виділений, дендрограму інтерпретовано у відповідності до зразків картоплі (рис. 4).

Згідно з проведеним аналізом, об'єднання в кластери або субкластери не пояснюється сортом картоплі. Наприклад, сорт Белароса, що концентрується у субкластері 2.2.2, також спостерігається у субкластері 1.1.1.1 та вражається генотипами E, C та D.

Таким чином, у результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу з використанням 10 мікросателітних маркерів, 35 вітчизняних ізолятів *P. infestans* розподілилися на 17 генотипів, що свідчить про високий рівень поліморфності у популяції, яка не пов'язана а ні з регіоном виділення, а ні з сортом ураженої картоплі. Частота генотипів коливалася від 2,86 до 11,43%. Найбільш розповсюдженими на Україні генотипами виявилися C, F та G. Найменшу генетичну різноманітність було виявлено у популяції *P. infestans* Львівської області. Зразки, що отримано з інших областей демонструють високу гетерогенність. Кореляції між регіонами та сортами картоплі, з яких отримано зразки *P. infestans*, та їх генотипами не спостерігається.



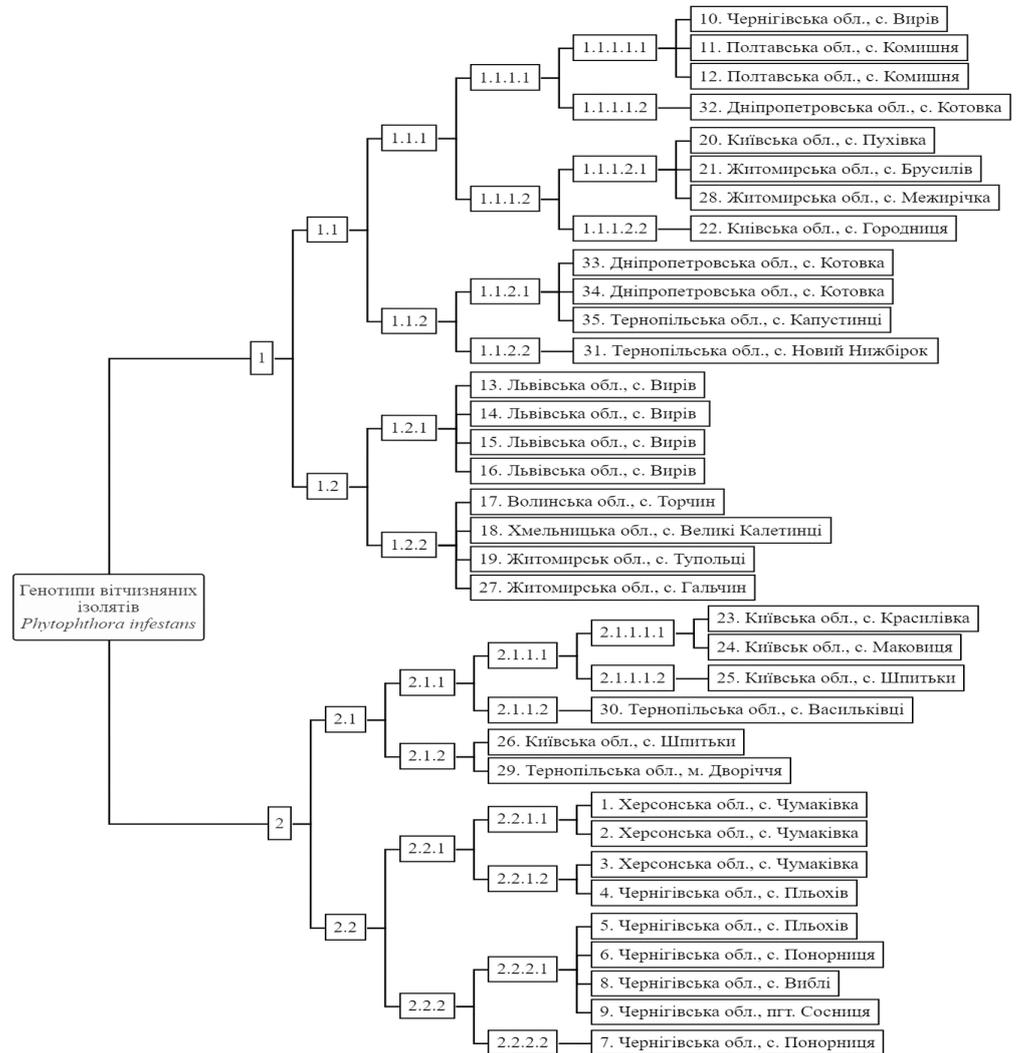


Рис. 3. Дендрограма розподілу українських ізолятів *P. infestans* за регіонами України
 1, 2 – кластери, що поєднують ізоляти *P. infestans* із спільними рисами SSR-профілю;
 1.n, 2.n – субкластери, що агрегують ізоляти за збільшенням різноманіття та групуються за спільними рисами в межах кластерів більш глибокого рівня

Fig. 3. Clustering dendrogram of Ukrainian *P. infestans* isolates by Ukrainian regions
 1, 2 – clusters combining *P. infestans* isolates with common SSR profile features;
 1.n, 2.n – subclusters aggregating isolates by increasing diversity and grouped by common features within deeper-level clusters

Продовження даного дослідження має перспективи сформувати fingerprint-бібліотеку вітчизняних рас патогенів, відібрати найбільш показові молекулярні маркери та розробити структуру моніторингу, що надасть змогу здійснення обґрунтованого, економічно та екологічно доцільного контролю даного захворювання. Саме довгострокові дослідження на конкретних ділянках, що описують зміни у фенотипічній мінливості популяцій *P. infestans*, дозволяють прогнозувати поширення патогену і можливі спалахи інфекції.



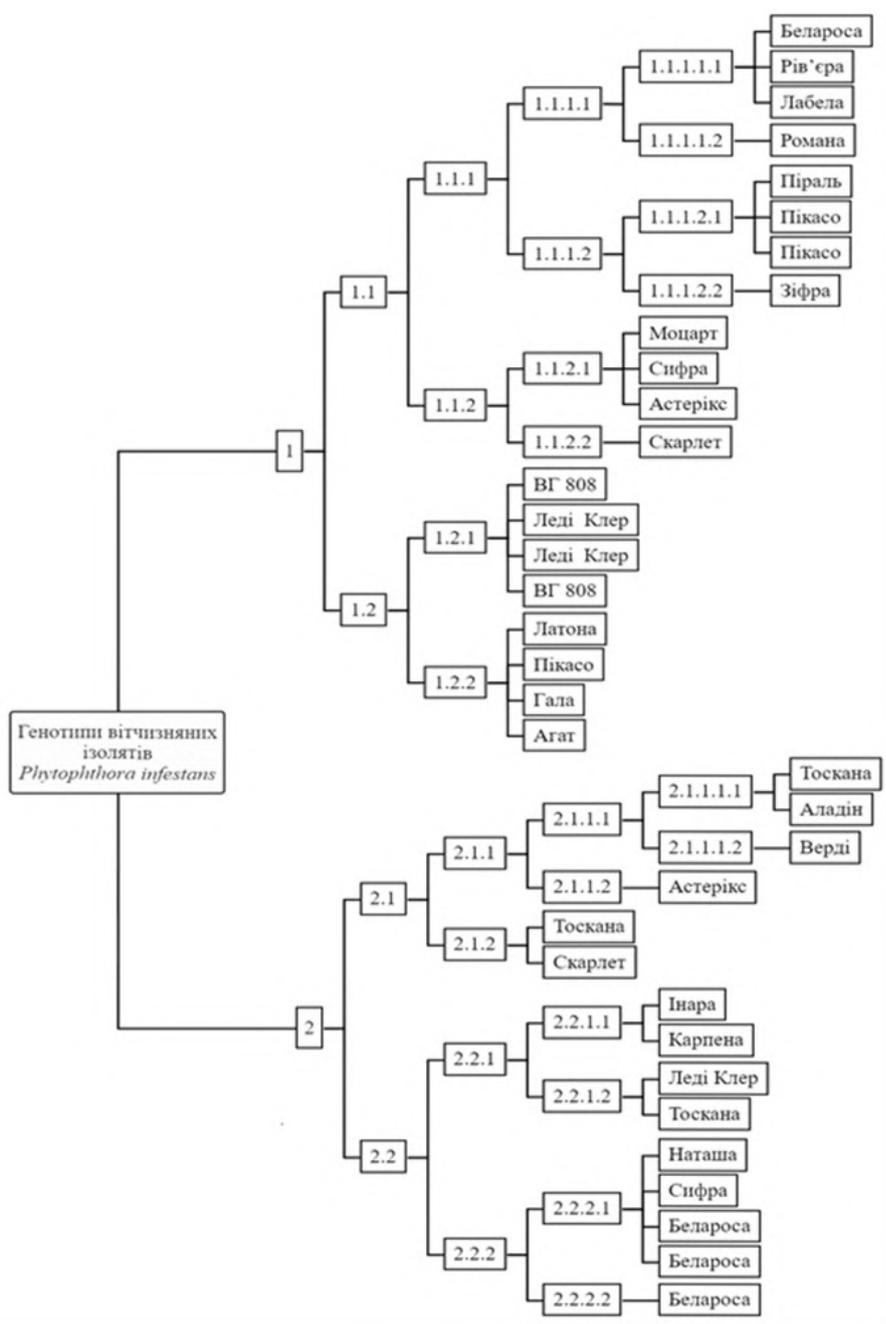


Рис. 4. Дендродіаграма розподілення українських ізолятів *P. infestans* за сортами картоплі, з яких вони були виділені

1, 2 – кластери, що поєднують ізоляти *P. infestans* із спільними рисами SSR-профілю;
 1.n, 2.n – субкластери, що агрегують ізоляти за збільшенням різноманіття та групуються за спільними рисами в межах кластерів більш глибокого рівня

Fig. 4. Clustering dendrogram of Ukrainian *P. infestans* isolates by potato variety origin

1, 2 – clusters combining *P. infestans* isolates with common SSR profile features;
 1.n, 2.n – subclusters aggregating isolates by increasing diversity and grouped by common features within deeper-level clusters

Таким чином, встановлено генетичну різноманітність популяції збудника фітофторозу картоплі на території України – 35 вітчизняних ізолятів *P. infestans* розподілилися на 17 генотипів без значного зміщення в бік певного варіанту, що свідчить про високий рівень поліморфності у популяції.

B. S. Zhukov², E. V. Demediuk¹, T. V. Gudzenko¹

¹Odesa I. I. Mechnikov National University,
2 Zmiienska Vsevoloda St, Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: tgudzenko@ukr.net

²Testing Center of IP "SZHS Ukraine",
103 Chornomorskooho Kozatstva St, Odesa, 65059, Ukraine,
e-mail: tgudzenko@ukr.net

MONITORING OF GENETIC DIVERSITY OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS* POPULATIONS – THE CAUSATIVE AGENT OF POTATO LATE BLIGHT ACROSS UKRAINIAN TERRITORY

Summary

*Knowledge of the genetic structure of *Phytophthora infestans* populations is essential for effective late blight management—the most widespread and destructive potato disease, causing substantial economic losses worldwide. **Aim.** To assess the genetic diversity of *P. infestans* populations—the causative agent of potato late blight in Ukraine. **Methods.** Pure cultures of *P. infestans* were isolated using the blotter method on potato leaf discs, followed by sequential subculturing on rye agar with rifampicin (RAB-R) and potato dextrose agar (PDA). Genetic typing of Ukrainian *P. infestans* isolates was performed using SSR-PCR analysis with 10 microsatellite markers. Analytical dendrograms were constructed using MEGA 11 software. **Results.** Molecular genetic analysis of 35 Ukrainian *P. infestans* isolates using 10 microsatellite markers revealed 17 distinct genotypes, indicating high population polymorphism independent of isolation region or host potato variety. Genotype frequencies ranged from 2.86% to 11.43%, with genotypes C, F, and G being most prevalent across Ukraine. The lowest genetic diversity was observed in Lviv region isolates, while samples from other regions showed high heterogeneity. No correlations were found between isolate genotypes and either geographic origin or potato cultivars. **Conclusions.** The *P. infestans* population causing potato late blight in Ukraine exhibits high genetic diversity, with 35 isolates distributed across 17 genotypes without dominance of any particular variant, confirming substantial population polymorphism.*

Key words: potato late blight; *Phytophthora infestans*; genotypes; SSR markers; cluster analysis; Ukraine.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Cooke D.E.L., Kessel G.J.T., Lassen P., Hansen J.G. The European population of *Phytophthora infestans* in a global context // Proceedings of the seventeenth EuroBlight workshop. WUR-special report. – 2019. – V. 9. – P. 35–36. https://agro.au.dk/fileadmin/euroblight/Workshops/York/Presentations_and_posters/Proceedings/2._David_Cooke-p35-36.pdf



2. *El-Ganainy S.M., Iqbal Z., Awad H.M., Sattar M.N., Tohamy A.M. et al.* Genotypic and Phenotypic Structure of the Population of *Phytophthora infestans* in Egypt Revealed the Presence of European Genotypes // *J. Fungi*. – 2022. – V. 8 (5). – P. 468. <https://doi.org/10.3390/jof8050468>
3. *EuroBlight 12-plex SSR genotyping of Phytophthora infestans*. – 2020. – 25 p.
https://agro.au.dk/fileadmin/euroblight/Protocols/12plex_genotyping_Protocol_Apr_2020.pdf
4. *Fry W.E.* *Phytophthora infestans*: the itinerant invader; “late blight” the persistent disease // *Phytoparasitica*. – 2020. – V. 48. – P. 87–94. DOI:10.1007/s12600-019-00778-3
5. *Ghislain M., Byarugaba A.A., Magembe E., Njoroge A. et al.* Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races // *Plant Biotechnology Journal*. – 2019. – V. 17. – P. 1119–1129. doi: 10.1111/pbi.13042.
6. *Holiachuk Y., Kosylovych H.* Spread of Quarantine Plant Diseases and Phytonematodes in Ukraine // *Quarantine and plant protection*. – 2025. – № 1(280). – P. 20–28. <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2024.2.21-28>
7. *ISO 21571:2005 Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction [Чинний від 2013-03].* Видання офіційне International Standard Organisation. – 2013. – 10 p.
<https://cdn.standards.iteh.ai/samples/56166/eff265102d8345bda8ad40161fa73886/ISO-21571-2005-Amd-1-2013.pdf>
8. *Janiszewska M., Sobkowiak S., Stefanczyk E., Sliwka J.* Population structure of *Phytophthora infestans* from a single location in Poland over a long period of time in context of weather conditions // *Microb. Ecol.* – 2021. – V. 81. – P. 746–757 <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-020-01630-6>
9. *Loukas I., Kanetis L.I., Pittas L., Nikoloudakis N. et al.* Characterization of *Phytophthora infestans* Populations in Cyprus, the Southernmost Potato-Producing European Country // *Plant Disease*. – 2021. – V. 11. – P. 3407–3417. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2694-RE>
10. *Lubis Y.F., Hasanuddin Y., Safni I.* The effectively test of the metalaxyl on different concentrations and application intervals to *Phytophthora infestans* that caused potato late blight in the wet season in the Karo highlands // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – 2021. – V. 782. – Issue 4. DOI:10.1088/1755-1315/782/4/042021
11. *Maurice S., Montes M.S., Nielsen B.J. et al.* Population genomics of an outbreak of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, reveals both clonality and high genotypic diversity // *Mol. Plant Pathol.* – 2019. – V. 20. – P. 1134–1146. DOI: 10.1111/mpp.12819
12. *Nobuyuki S., Hisashi O., Seishi A., Akiha U. et al.* An Easy Direct Zoospore Sampling Method for Collecting *Phytophthora infestans* Isolates // *J.Res. Fac.Agr. Hokkaido Univ.* – 2019. – Vol. 74. – P. 1–5. <http://hdl.handle.net/2115/73697>



13. Saville A.C., La Spada F., Faedda R., Migheli Q. et al. Population structure of *Phytophthora infestans* collected on potato and tomato in Italy. *Plant Pathol.* – 2021. – V. 70. – P. 2165–2178 <https://dx.doi.org/10.1111/ppa.13444>
14. Shchetina S., Mostoviak I., Fedorenko V. Phytosanitary state of open-field vegetable crop agroecosystems of the genus *Solanum*, *Raphanus*, *Brassica* in the central part of the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine // *Quarantine and plant protection.* – 2023. – № 4(275). – P. 32–38.
DOI: <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2023.4.32-38>
15. Stroud J.A., Shaw D.S., Hale M.D., Steele K.A. SSR assessment of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization // *Plant Pathol.* – 2016. – V. 65. – P. 334–341. DOI:10.1111/ppa.12407
16. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 // *Molecular Biology and Evolution.* – 2021. – V. 38. – P. 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

REFERENCES

1. Cooke DEL, Kessel GJT, Lassen P, Hansen JG The European population of *Phytophthora infestans* in a global context. *Proceedings of the seventeenth EuroBlight workshop. WUR-special report.* 2019;9:35–36.
https://agro.au.dk/fileadmin/euroblight/Workshops/York/Presentations_and_posters/Proceedings/2._David_Cooke-p35-36.pdf
2. El-Ganainy SM, Iqbal Z, Awad HM, Sattar MN, Tohamy AM et al. Genotypic and phenotypic structure of the population of *phytophthora infestans* in Egypt revealed the presence of European genotypes. *J. Fungi.* 2022;8(5):468. <https://doi.org/10.3390/jof8050468>
3. EuroBlight 12-plex SSR genotyping of *Phytophthora infestans*. 2020;25.
https://agro.au.dk/fileadmin/euroblight/Protocols/12plex_genotyping_Protocol_Apr_2020.pdf
4. Fry WE *Phytophthora infestans*: the itinerant invader; “late blight” the persistent disease. *Phytoparasitica.* 2020;48:87–94.
<https://doi.org/10.1007/s12600-019-00778-3>
5. Ghislain M, Byarugaba AA, Magembe E, Njoroge A et al. Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnology Journal.* 2019;17:1119–1129. <https://doi.org/10.1111/pbi.13042>
6. Holiachuk Y, Kosylovyh H Spread of Quarantine Plant Diseases and Phytonematodes in Ukraine. *Quarantine and plant protection.* 2025;1(280):20–28. <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2024.2.21-28>
7. ISO 21571:2005 Foodstuffs – Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products – Nucleic acid extraction [Valid from 2013-03]. Official Edition International Standard Organisation. 2013; 10. <https://cdn.standards.iteh.ai/samples/56166/eff265102d8345bda8ad40161fa73886/ISO-21571-2005-Amd-1-2013.pdf>
8. Janiszewska M, Sobkowiak S, Stefanczyk E, Sliwka J Population structure of *Phytophthora infestans* from a single location in Poland over a long period



- of time in context of weather conditions. *Microb. Ecol.* 2021;81:746–757. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-020-01630-6>
9. Loukas I, Kanetis LI, Pittas L, Nikoloudakis N et al. Characterization of *Phytophthora infestans* Populations in Cyprus, the Southernmost Potato-Producing European Country. *Plant Disease.* 2021;11:3407–3417. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-20-2694-RE>
 10. Lubis YF, Hasanuddin Y, Safni I The effectively test of the metalaxyl on different concentrations and application intervals to *Phytophthora infestans* that caused potato late blight in the wet season in the Karo highlands. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2021;782(4). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/782/4/042021>
 11. Maurice S, Montes MS, Nielsen BJ et al. Population genomics of an outbreak of the potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, reveals both clonality and high genotypic diversity. *Mol. Plant Pathol.* 2019;20:1134–1146. <https://doi.org/10.1111/mpp.12819>
 12. Nobuyuki S, Hisashi O, Seishi A, Akiha U et al. An easy direct zoosporangia sampling method for collecting *Phytophthora infestans* isolates. *J. Res. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 2019;74:1–5. <http://hdl.handle.net/2115/73697>
 13. Saville AC, La Spada F, Faedda R, Migheli Q et al. Population structure of *Phytophthora infestans* collected on potato and tomato in Italy. *Plant Pathol.* 2021;70:2165–2178. <https://doi.org/10.1111/ppa.13444>
 14. Shchetina S, Mostoviak I, Fedorenko V Phytosanitary state of open-field vegetable crop agroecosystems of the genus *Solanum*, *Raphanus*, *Brassica* in the central part of the Right-Bank Forest-Steppe of Ukraine. *Quarantine and plant protection.* 2023;4(275):32–38. <https://doi.org/10.36495/2312-0614.2023.4.32-38>
 15. Stroud JA, Shaw DS, Hale MD, Steele KA SSR assessment of *Phytophthora infestans* populations on tomato and potato in British gardens demonstrates high diversity but no evidence for host specialization. *Plant Pathol.* 2016;65:334–341. <https://doi.org/10.1111/ppa.12407>
 16. Tamura K, Stecher G, Kumar S MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution.* 2021;38:3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Стаття надійшла до редакції 21.11.2025 р.

