

ЗАЩИТА РАСТЕНИЙ

Известия ТСХЛ, выпуск 4, 2003 год

УДК 581.2

ОЦЕНКА ПРОИСХОЖДЕНИЯ ООСПОР В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

А. Н. СМИРНОВ

(Кафедра сельскохозяйственной фитопатологии)

Для ооспор, обнаруженных в 5 природных популяциях *Phytophthora infestans* с территории Москвы и Московской обл. в 1999 г., было определено их происхождение. В 4 популяциях (2 — с листьев картофеля с территории МСХА и окрестностей Звенигорода, 1 — с листьев томата из окрестностей Звенигорода, 1 — с плодов томата из теплицы МСХА) преобладали негибридные ооспоры. Доля гибридных ооспор была небольшой. В популяции в звенигородских плодах томата определить происхождение большинства ооспор не удалось. В популяциях с листьев картофеля преобладали партеногенетические ооспоры, а на томатах — ооспоры от самооплодотворения. Как правило, используемый метод позволял разграничить происхождение ооспор, обнаруженных в полевых образцах картофеля и томатов, пораженных *P. infestans*. В некоторых образцах применение метода было затруднено из-за недостатка данных по типам спаривания изолятов.

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary — оомицет, паразитирующий на картофеле и томатах. Опасность этого заболевания в Московской области в значительной степени связана с обнаружением ооспор в инфекционном цикле возбудителя [4]. Ооспоры могут иметь различное происхождение — образовываться в результате

перекрестного оплодотворения (гибридные), а также от самооплодотворения, или партеногенеза (негибридные). Ранее нами предложен метод, позволяющий различать происхождение ооспор в природных популяциях *P. infestans* [1]. Он может иметь большое значение, так как различные по происхождению ооспоры, вероятно, выполняют раз-

личную роль в инфекционном цикле возбудителя [2].

Цель исследования — определить происхождение ооспор, выявленных в природных популяциях *P. infestans* в Московской области в 1999 г.

Методика

Посредством обесцвечивания тканей растений-хозяев и световой микроскопии проводили поиск ооспор и оценивали их количество. Если встречаемость ооспор в 50 полях зрения (1 мм² каждое) была не более 5, от 6 до 25, от 26 до 250 и более 250, то

их встречаемость оценивали соответственно как очень редкую, редкую, умеренную и частую [4].

Для определения происхождения ооспор были использованы: 1) данные о встречаемости и морфологии ооспор *P. infestans* (табл. 1, [4]); 2) данные о типах спаривания изолятов, выделенных из исследуемых популяций *P. infestans* (табл. 1, [3]); 3) метод определения происхождения ооспор в полевых популяциях *P. infestans* [1].

Сначала проводили анализ морфологии обнаруженных ооспор. Гибридные ооспоры

Т а б л и ц а 1

Характеристика полевых популяций *P. infestans* с территории МСХА и окрестностей Звенигорода, в которых были обнаружены ооспоры

Популяция	Растение-хозяин	Время сбора	Образцы с ооспорами, %	A1:A2, %
МСХА ЛЗР ¹ (теплица)	Томат (плоды)	23.09	66,7	0:100
— » — ЛЗР	Картофель (листья)	15.09	9,1	0:100
— » — МС ²	— » —	8.09	5,4	23:77
— » — ЛЦ ³	— » —	8.09	5,6	13:87
ЗБС МГУ ⁴	Томат (листья)	31.08	33,3	69:31
— » — МГУ	— » —	6.09	64,0	100:0
Апальщино	Томат (плоды)	10.09	18,2	100:0
ЗБС МГУ	— » —	6.09	42,9	95:5
Колубакино	Картофель (листья)	29.08	5,0	23:77
Апальщино	— » —	29.08	12,5	91:9
ЗБС МГУ	— » —	31.08	2,9	2:9
— » —	— » —	6.09	8,8	—
Раменка	— » —	2.09	4,3	52:48

¹ Лаборатория защиты растений МСХА; ² Мичуринский сад МСХА; ³ Лаборатория цветоводства МСХА; ⁴ Звенигородская биостанция МГУ.

имеют типичную морфологию [2] — шаровидную форму, как правило, от 25 до 35 мкм в диаметре, двухслойную или многослойную стенку. Антеридий имеется, по крайней мере, на начальной стадии.

Ооспоры от самооплодотворения могут иметь как типичную, так и нетипичную морфологию [2]. Они могут быть крупными — до 50 мкм. Оогоний шаровидной или вытянутой формы. Стенка ооспор однослойная или многослойная. Антеридий имеется, по крайней мере, на начальной стадии.

Партеногенетические ооспоры имеют, как правило, нетипичную, иногда — типичную морфологию. В ряде случаев они представляют собой недоразвитые оогонии диаметром 15-20 мкм, у других ооспор диаметр достигает 45 мкм. Форма оогония может быть как шаровидной,

так и продолговатой, стенка ооспор — как тонкой, так и многослойной. Антеридия не имеется.

По результатам морфологического анализа делали предварительное заключение о происхождении ооспор в каждом образце (табл. 2). При однозначном заключении выявляли партеногенетические, образованные при самооплодотворении, и гибридные ооспоры. При альтернативном заключении выявлялись ооспоры спорного происхождения: 1) от партеногенеза и/или от самооплодотворения, 2) от самооплодотворения и/или гибридные, 3) ооспоры неопределенного происхождения (табл. 2).

Далее проводили популяционно-генетический анализ мицелиев, образующих ооспоры.

Гибридные ооспоры образуются в образцах с двумя или более пятнами, иногда

Т а б л и ц а 2

Оценка происхождения ооспор в полевых образцах, пораженных фитофторозом, посредством морфологического и генетического критериев

По генетическому критерию	По морфологическому критерию					
	п	с/п	с	с/г	г	п/с/г
с/п	п	с/п	с	с	с/г	с/п
г	п	с/п	с/г	г	г	п/с/г
п/с/г	п	с/п	с/г	с/г	с/г	п/с/г

П р и м е ч а н и е, п — партеногенетические ооспоры, с — ооспоры от самооплодотворения, г — гибридные ооспоры, с/п — ооспоры от самооплодотворения и/или партеногенеза, с/г — ооспоры от самооплодотворения и/или перекрестного оплодотворения, п/с/г — ооспоры неопределенного происхождения.

сливающимися в одно. В образцах должны присутствовать оба типа спаривания. Ооспоры встречаются часто или умеренно преимущественно в зоне контакта между мицелиями A1 и A2. В полевой популяции соотношение между мицелиями различных типов спаривания должно быть меньше, чем 9:1.

Негибридные ооспоры образуются в образцах как с одним пятном, так и с несколькими пятнами. В образцах должны присутствовать мицелии одного типа спаривания. Ооспоры встречаются редко, умеренно, иногда часто на протяжении всего образца. В полевой популяции соотношение между мицелиями различных типов спаривания должно быть не меньше, чем 9:1.

Популяционно-генетический анализ не позволяет различать ооспоры от самооплодотворения и партеногенеза. В результате популяционно-генетического анализа делали предварительное заключение о происхождении ооспор в каждом образце (см. табл. 2). При однозначном заключении выявляли гибридные ооспоры, при альтернативном — ооспоры спорного происхождения: 1) от партеногенеза и/или от самооплодотворения, 2) ооспоры неопределенного происхождения.

Далее для каждого образца сопоставляли результаты

обоих анализов и делали окончательное заключение о происхождении ооспор (см. табл. 2). Совпадения фиксировали, а несовпадения отбрасывали. Например, если по морфологическому критерию ооспоры были гибридными и/или от самооплодотворения, а по популяционно-генетическому — от самооплодотворения и/или партеногенеза, то окончательное заключение было, что ооспоры (все или большинство) образовывались от самооплодотворения. Окончательное заключение могло быть однозначным или альтернативным.

В отдельных случаях (при затруднении половой совместимости между A1 и A2) образование негибридных ооспор возможно и при наличии в образце мицелиев обоих типов спаривания. Поэтому, когда генетическое заключение указывало на гибридное происхождение ооспор, а морфологическое — на их негибридное происхождение, то определяющим критерием считали морфологическое заключение.

Затем для каждого образца подсчитывали количество ооспор определенного происхождения (табл. 3). При однозначном заключении, если ооспоры в образце были, например, редкими и партеногенетическими, то их среднее количество было 15, минимальное — 6, максимальное — 25. При альтернатив-

Шкала оценки встречаемости ооспор с учетом их происхождения. Объяснения — в тексте

Ранг	Встречаемость ооспор определенного типа		
	$\pi^1; c^2; \gamma^3$ min : среднее : max	$c/\pi^4; c/\gamma^5$ min : среднее : max	$\pi/c/\gamma^6$ min : среднее : max
Очень редко	1:3:5	0:2:2:5	0:1:1:1:5
Редко	6:15:25	0:7:7:25	0:5:5:5:25
Умеренно	26:140:250	0:70:70:250	0:45:45:45:250
Часто	251:400:550	0:200:200:550	0:135:135:135:550

Примечание. Сокращения — как в табл. 2.

ном заключении встречаемость ооспор разных типов считали равновероятной. Например, если ооспоры встречались умеренно и были гибридными и/или результатом самооплодотворения, то средние количества ооспор обоих типов были по 70 (в сумме 140 — это среднее значение для умеренной встречаемости ооспор). Минимальные количества ооспор обоих типов были равны нулю в силу возможной альтернативности полученного варианта (или гибридные или от самооплодотворения). Максимальные количества ооспор обоих типов по той же причине были по 250 (это верхний предел умеренной встречаемости).

В результате для образцов получали данные о встречаемости ооспор определенного происхождения и суммировали их по популяциям. Для каждой из подмосковных природных популяций из МСХА и окрестностей Зве-

нигорода подсчитывали средние, а также минимальные и максимальные количества и затем частоты ооспор определенного происхождения. Среднюю частоту определенных ооспор подсчитывали как процент от общего количества средних значений ооспор всех типов в популяции. Минимальную частоту определенных ооспор подсчитывали как процент их минимального количества от его суммы с максимальными значениями ооспор другого происхождения. Максимальную частоту определенных ооспор подсчитывали как процент их максимального количества от его суммы с минимальными значениями ооспор другого происхождения.

Результаты и их обсуждение

Из всех исследованных популяций наиболее часто ооспоры встречались в звенигородской популяции с листь-

ев томата, в популяциях с плодов томата и листьев картофеля ооспоры встречались значительно реже.

Подсчеты показали, что около 61% (от 31 до 83%) всех обнаруженных ооспор имели негибридное происхождение. Доля гибридных ооспор составила лишь около 2% (от 0 до 7%). Происхождение остальных ооспор было спорным.

Почти во всех природных популяциях очень часто встречались ооспоры негибридного происхождения. В популяциях из МСХА они доминировали, в звенигородских популяциях на листьях картофеля и томата — преобладали (табл. 4).

Для популяции с звенигородских плодов томата однозначного результата получить не удалось, несмотря на то, что в большинстве образцов встречались редкие ооспоры от самооплодотворения, в двух образцах были обнаружены частые ооспоры типичной морфологии [4]. В популяции преобладал А1, но редко встречался и А2 (см. табл. 1). Поэтому исключать гибридное происхождение ооспор из этих образцов не стоило (табл. 4).

Более детальное изучение показало, что ооспоры в листьях картофеля образовывались преимущественно посредством партеногенеза, в

Т а б л и ц а 4

Встречаемость негибридных, спорных и гибридных ооспор в природных популяциях *P. infestans*

Популяция		Число образцов с ооспорами	Число ооспор в образце	Ооспоры, %		
место	растение-хозяин			негибридные	спорные	гибридные
МСХА	Томат (плоды)	13	14* 3**—24***	100	0	0
— » —	Картофель (листья)	5	60 12—107	99	1	0
Звенигород	Томат (листья)	27	154 75—232	67	29	4
— » —	Томат (плоды)	6	137 86—193	3	87	0
— » —	Картофель (листья)	11	128 57—199	62	34	0
				30—83	17—37	

Здесь и в табл. 5: * — среднее значение, ** — минимальное значение, *** — максимальное значение.

плодах томата в МСХА — при самооплодотворении. В звенигородских томатных популяциях ооспоры от самооплодотворения также встречались несколько чаще, однако это можно утверждать с низкой достоверностью (табл. 5).

Встречаемость гибридных ооспор была очень низкой во всех популяциях (см. табл. 4). Детальный анализ иногда выявлял более высокую их встречаемость, но достоверность этих данных невелика (табл. 5).

На преобладание негибридных ооспор в природных популяциях *P. infestans* указывают и дополнительные свидетельства. Так, в большинстве случаев ооспоры образовывались в образцах с одним пятном. Была сделана проверка, насколько часто могут

встречаться в одном пятне мицелии разных типов спаривания. Для этого из 59 пятен было выделено от 2 до 5 изолятов *P. infestans*; из 26 пятен — только изоляты А1, из 28 пятен — изоляты А2. Лишь в 5 пятнах были обнаружены мицелии обоих типов спаривания. Значит, в подавляющем большинстве исследованных образцов содержались мицелии только одного типа спаривания и некоторые из них образовывали ооспоры. В 8 из 13 полевых популяций *P. infestans* с образованием ооспор преобладали изоляты одного типа спаривания.

Регулярное соприкосновение А1 и А2 в полевых популяциях не приводило к повышению встречаемости в них ооспор. В исследовании [2] взаимосвязи между этими показателями выявлено не

Т а б л и ц а б

Встречаемость партеногенетических, от самооплодотворения и гибридных ооспор в природных популяциях *P. infestans*

Популяция		Ооспоры, %		
место	растение-хозяин	партеногенетические	от самооплодотворения	гибридные
МСХА	Томат	3*	97	0
	(плоды)	0**—30***	70—100	
— » —	Картофель	75	24	1
	(листья)	11—100	0—89	0—8
Звенигород	Томат	25	59	16
	(листья)	0—86	29—100	0—78
— » —	Томат	33	34	33
	(плоды)	0—100	0—100	0—100
— » —	Картофель	65	19	16
	(листья)	16—98	1—74	1—37

было. В 9 образцах были обнаружены мицелии А1 и А2, однако частые ооспоры типичной морфологии (гибридного происхождения) были обнаружены только в одном из них. Это можно объяснить недостатком влажности и неблагоприятным сочетанием некоторых других экологических факторов [5]. Представляет интерес, какие факторы способствуют образованию негибридных ооспор [2]. Возможно, что самооплодотворение вызывалось циркулирующими по растению-хозяину гормонами мицелия противоположного типа спаривания. Этот механизм можно предположить, например, для полевой популяции с листьев томата из ЗБС, где исчезновение А2 к концу сезона не привело к снижению образования ооспор (см. табл. 1).

Метод определения происхождения ооспор показал достаточно высокую эффективность. В большинстве случаев он с высокой достоверностью позволил разграничить массивы гибридных и негибридных ооспор. С другой стороны, в некоторых случаях однозначных результатов получено не было. Морфологический критерий не всегда позволял различать ооспоры от самооплодотворения и гибридные, а популяционно-генетический — от партеногенеза и самоопло-

дотворения. Это сказалось на больших интервалах между минимумами и максимумами по встречаемости ооспор определенного происхождения (табл. 4, 5). Альтернативность и низкая достоверность (особенно для популяции звенигородских плодов томата) прежде всего были связаны с недостатком фактических данных, особенно по типам спаривания мицелиев, образующих ооспоры. Экспресс-определение типов спаривания в полевых образцах на основе ДНК-овых маркеров [6] без выделения изолятов *P. infestans* в чистую культуру позволит существенно облегчить определение происхождения ооспор. Уточнение шкалы встречаемости ооспор или их точный подсчет дадут возможность получать более точные результаты. Однако на это требуется больше времени, и уточнение, как правило, не будет значительным.

Несмотря на преобладание негибридных ооспор в природных популяциях *P. infestans* 1999 г., мы не исключаем возможности образования гибридных ооспор в условиях Московской обл. Происхождение ооспор *in vivo* может зависеть от экологических факторов. Вероятность гибридизации особенно велика в плодах томата, где в некоторых популяциях уже наблюдалось час-

тое ооспорообразование. При наличии в плодах томата мицелиев А1 и А2 достигаются высокая вероятность контакта между ними и благоприятные условия для развития ооспор.

Выводы

1. В природных популяциях *P. infestans* 1999 г. были обнаружены ооспоры преимущественно негибридного происхождения: в листьях картофеля — в основном от партеногенеза, на томатах — от самооплодотворения. Гибридные ооспоры встречались редко.

2. Метод определения происхождения ооспор *P. infestans* показал довольно высокую эффективность. Он позволил разграничивать негибридные и гибридные ооспоры и, как правило, ооспоры от самооплодотворения и партеногенетические ооспоры. В некоторых случаях, связанных

с недостатком фактических данных, получить достоверную оценку происхождения ооспор не удалось.

Исследование поддержано международным грантом МНТЦ #1640.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов А. Н. — Изв. ТСХА, 2001, вып. 1, с. 141 — 153. — 2. Смирнов А. Н. Микология и фитопатология, 2003, т. 37, вып. 1, с. 3-21. — 3. Смирнов А. Я., Кравцов А. С. и др. Материалы науч. конф. «Памяти Грегора Менделя». М.: Изд-во МСХА, 2001, с. 122-123. — 4. Смирнов А. В., Кузнецов С. А. — Изв. ТСХА, 2001, вып. 4, с. 116-133. — 5. Cohen Y., Farkash S., Reshit Z., and Baider A. Phytopathology, 1997, vol. 87, p. 191-196. — 6. Scott D., Deahl K. Abstracts of the 96th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1996.

Статья поступила
17 января 2002 г.

SUMMARY

The origin of oospores in 5 natural *Phytophthora infestans* populations from Moscow and Moscow region in 1999 was determined. In 4 populations (2 - from potato leaves of Moscow Agricultural Academy and Zvenigorod district, 1 - from tomato leaves of Zvenigorod district, and 1 - from indoor tomato fruits of Moscow Agricultural Academy) the non-hybrid oospores predominated. The frequency of hybrid oospores was very low. It was not possible to clearly determine the origin of oospores in population in tomato fruits from Zvenigorod district. In general in potato leaves the parthenogenetic oospores predominated, in tomato leaves - the oospores produced by means of self-fertilization. As a rule the used method allowed to distinguish the origin of oospores found in field blighted samples of potato and tomato. In some samples the determination of oospore origin was complicated due to deficiency of data on mating types of *P. infestans* isolates.