

УДК 581.2

СРАВНЕНИЕ АГРЕССИВНОСТИ МЕКСИКАНСКИХ ШТАММОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* ИЗ ДОЛИНЫ ТОЛУКА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

А. Н. СМИРНОВ

(Кафедра фитопатологии)

В нашем исследовании определяли агрессивность 4 штаммов *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary из Мексиканской долины Толука при температурах 12° и 20°С. Один штамм по типу спаривания и изоферментному локусу *Gpi* относился к «старому типу», который уже не обнаруживается в европейских популяциях возбудителя фитофтороза, остальные три имели генотипы, образованные в результате половой рекомбинации или эндемичные для Мексики. Подсчитывали такие компоненты агрессивности как ЧИ (частота инфекции), РН (размер некрозов), ИС (интенсивность спороношения), ИП (инкубационный период), ЛП (латентный период) и ИИА (итоговый индекс агрессивности). Все эти компоненты с некоторыми изменениями были взяты из предшествующих исследований.

При 12°С у всех исследованных штаммов *P. infestans* агрессивность была значительно ниже, чем при 20°С (в 1,5-17 раз). При 12°С штамм с характеристиками «старого типа» по компонентам агрессивности не уступал другим штаммам или превосходил их. Соответственно, к полному вытеснению штаммов «старого типа» за короткий срок времени другими штаммами, на наш взгляд, это привести не могло. Также важно, что при 20°С агрессивность штаммов «старого типа» была вполне сравнимой с агрессивностью других штаммов, которые преобладают сейчас в мексиканской и европейской популяциях *P. infestans*. На основе данных, полученных в настоящем и предшествующих исследованиях, мы предполагаем, что замещение генотипов в природных популяциях возбудителя фитофтороза было исходно вызвано не различиями в агрессивности, а внешними причинами — очень вероятно, применением металаксилсодержащих фунгицидов.

Долина Толука относится к высокогорным тропикам, расположенным в штате Мехико. Южнее и в сравнительной близости от Толуки находятся тропические и лесные районы, севернее — пустыня с жарким засушливым климатом. Со всех сторон долину окружают горы и скалы, имеется вулкан Невадо де Толука.

Долина Толука представляет собой центр происхождения опасней-

шего паразита картофеля и томатов — оомицета *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary [15]. Было установлено, что в Толуке встречаются штаммы обоих типов спаривания, в результате их контакта в природе в листьях картофеля и диких пасленовых происходит регулярное образование ооспор [6, 8]. Половое размножение преимущественно на основе ооспор гибридного происхождения привело к высо-

чайшему генетическому разнообразию в природных популяциях *P. infestans* [5, 10, 16]. В них присутствуют штаммы с высокой вирулентностью и агрессивностью. В 1980-е гг. штаммы мексиканской популяции *P. infestans* были агрессивней штаммов из стран Старого Света, хотя по вирулентности они незначительно различались между собой [17]. Но к концу 1990-х гг. ситуация выровнялась. В Новом и Старом Свете (в России) были выявлены полевые популяции, не уступающие по агрессивности мексиканским и даже превосходящие их [4].

Мексиканская популяция *P. infestans* из долины Толука обеспечивает мощный естественный провокационный фон патогена. Это используют селекционеры при проверке сортов картофеля на устойчивость к фитофторозу. Поэтому долина Толука — испытательный центр для картофельных сортов, признанный во всем мире. Несомненно, характеристика агрессивности мексиканских штаммов будет полезна российским специалистам, создающим новые сорта картофеля и проверяющим их устойчивость к фитофторозу и другим болезням.

В 1980-е и начале 1990-х годов в природных популяциях возбудителя фитофтороза произошли существенные сдвиги. Штаммы с генотипами «старого типа» исчезли из популяций, в них широко распространились и стали доминировать штаммы «нового типа». Было предположено, что штаммы «нового типа» вытеснили штаммы «старого типа» за счет более высокой агрессивности [2, 9].

Однако предшествующие исследования не выявили очень существенных преимуществ по агрессивности штаммов с различными гено-

типами по сравнению со штаммами «старого типа» [2]. Штаммы «старого типа» несколько уступали другим штаммам по выходу зооспор [3, 14] и по прорастанию зооспорангиев при температуре 20°C и 25°C [3]. По другим данным, штаммы «старого типа» даже превосходили другие штаммы по прорастанию зооспорангиев при температуре 20°C и 25°C [14]. В целом, все имеющиеся данные по агрессивности не могут объяснить полного вытеснения штаммов «старого типа» из природных популяций *P. infestans*. По своей жизнеспособности они в большей или меньшей степени могли бы быть конкурентоспособны с другими штаммами возбудителя фитофтороза.

Мы исследовали агрессивность при температуре 20°C [2]. Можно, однако, предполагать, что при низких температурах (около 10°C) агрессивность будет в значительной степени развиваться и новые штаммы *P. infestans* превзойдут старые. Тогда объяснение замещения генотипов из-за разницы по агрессивности может оказаться вполне правильным.

В течение последних 10—15 лет штаммы «старого типа» с аллелем 86 по локусу *Gpi* можно обнаружить только в Мексике, в европейских популяциях они отсутствуют [5]. Поэтому, чтобы сравнить агрессивность штаммов *P. infestans* при разных температурах, были использованы штаммы именно из долины Толука.

Цель настоящего исследования — сравнение агрессивности мексиканских штаммов *P. infestans* при разных температурах, а также сравнение агрессивности мексиканских штаммов *P. infestans* с разными генотипами при низкой температуре.

Методика

Исследование проводили в 1998 г. Для работы были использованы 4 штамма *P. infestans* из коллекции исследовательского центра Pictipara (долина Толука, г. Метепек, собраны в сентябре 1997 г. с сорта картофеля Альфа), любезно предоставленные Н. Грюнвальдам и В. Флиером. Их характеристики приведены в табл. 1.

Типы спаривания и генотипы по изоферментным локусам *Gpi* и *Pep-1* были определены сотрудниками Pictipara А. Стурбаум и Э. Гарай-Серрано. Типы спаривания (ТС) определяли посредством попарного скрещивания исследуемых изолятов с тестерными на ржаном агаре. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры с тестером А2 и не образовывал их с А1, то его относили к А1. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры с тестером А1 и не образовывал их с А2, то его относили к А2. Изоферментный анализ проводили в целлюлозоацетатном геле как описано в [12] (см. табл. 1).

Классификацию генотипов проводили по стандарту, принятому в лаборатории Корнельского университета США проф. Б. Фрая [9] с учетом результатов популяционных исследований в России и Западной Европе. Учитывали типы спаривания и изоферментный локус *Gpi*. А1 и *Gpi* 86/100 - это основные характеристики штаммов «старого типа» [2].

А1 *Gpi* 100/100 и А2 *Gpi* 100/100 - это «новые» генотипы, которые в 1980-е и 1990-е годы вытеснили штаммы «старого типа» в Европе.

Генотипы А2 с аллелем *Gpi* 86, а также А1 *Gpi* 86/86 - рекомбинантные генотипы, которые могут образовываться за счет половой рекомбинации (в основном, в долине Толука) с участием штаммов с генотипами «старого» и/или «нового» типа.

Генотипы обоих типов спаривания с аллелем *Gpi* 122 зарегистрированы только в Мексике и других соседних странах.

Локус *Pep-1* не имел такого принципиального значения в разграничении генотипов «старого» и «нового» типов [2].

Определение агрессивности штаммов проводили на основе методик Тулея [16] и Флиера [7], с существенными изменениями. Сегменты листьев сорта картофеля Сантэ раскладывали во влажные камеры (чашки Петри с увлажненной фильтровальной бумагой) нижней стороной кверху. Далее их инокулировали суспензией зооспорангиев (в дистиллированной воде) исследуемых штаммов *P. infestans*. Концентрация зооспорангиев была 5000/мл, ее определяли в гемоцитометре (американском аналоге камеры Горяева). Перед инокуляцией суспензии зооспорангиев выдерживали при температуре 7°C в течение 1 ч для выхода зооспор. Далее диски инкубировали 5 сут при температурах

Т а б л и ц а 1

Характеристика штаммов *P. infestans*, использованных в исследовании

Штамм	Генотип			
	тип спаривания	<i>Gpi-1</i>	<i>Pep-1</i>	тип
97604	A1	86/100	100/100	С характеристиками «старого типа»
97618	A2	86/100	100/100	Рекомбинантный генотип
97654	A2	122/122	100/100	Североамериканский эндемик
97659	A1	86/86	100/100	Рекомбинантный генотип

20-2ГС и 12°C. На каждый штамм было 3 повторности, в каждой повторности по 10 сегментов листьев. Результаты учетов по каждому показателю агрессивности для 3 повторностей при температуре 20-21°C и 12°C усредняли.

По мере инкубации для каждого штамма измеряли следующие параметры:

ЧИ (частота инфекции) измеряли на 5-й день. Учитывали для каждой повторности в баллах: 1 — 1-2 сегмента листьев заражены, 2 — 3-4 сегмента заражены, 3 — 5—6 сегментов заражены, 4 — 7-8 сегментов заражены, 5 — 9-10 сегментов заражены;

РН (размер некроза) измеряли на 5-й день. Каждый диск учитывали в баллах: 1 — до 10% поверхности некротизировано, 2 — 11-30% некротизировано, 3 — 31-60% некротизировано, 4 — 61-90% некротизировано, 5 — 91-100% некротизировано. По каждой повторности балл для всех 10 сегментов листьев усредняли;

ИС (интенсивность спороношения) измеряли на 5-й день. С пораженного сегмента листа делали смыв зооспорангиев в 10 мл воды и посредством гемацитометра подсчитывали их концентрацию в баллах: 1 — до 10000/мл, 2 — 11000-25000/мл, 3 — 26000-50000/мл, 4 — 51000-75000/мл, 5 — более 75000/мл. По каждой повторности балл для всех 10 сегментов листьев усредняли;

ИП (инкубационный период) — период (в сутках) до появления симптомов фитофтороза (некроза или спороношения). Измеряли для каждого диска. Далее по каждой повторности балл для всех 10 сегментов листьев усредняли;

ЛП (латентный период) — период (в сутках) до появления споро-

ношения. Измеряли для каждого диска. Далее по каждой повторности баллы для всех 10 сегментов листьев усредняли;

АП-ИП (разность между латентным и инкубационным периодами).

На основе этих показателей по методике Тулея [17] (с изменениями) подсчитывали **ИИА** (итоговый индекс агрессивности). Он прямо пропорционален ЧИ, РН и ИС, и обратно пропорционален ИП и ЛП.

$$\text{ИИА} = \frac{\text{ЧИ} \times \text{РН} \times \text{ИС}}{\text{ИП} \times \text{ЛП}}$$

Результаты по каждому показателю агрессивности ранжировали. Это позволило выделить высоко-, умеренно- и малоагрессивные штаммы.

Штамм	Показатели агрессивности		
	ЧИ, РН, ИС (в баллах)	ИП, ЛП (в сутках)	ИИА (в цифрах)
Малоагрессивные	0-1,9	> 4,0	0-3,5
Умеренноагрессивные	2,0-3,9	3,1-4,0	3,6-6,5
Высокоагрессивные	4,0-5,0	2,1-3,0	> 6,5

Для определения достоверности различий между средними по каждому показателю подсчитывали стандартные отклонения (только для ИП, ЛП и ИИА) и НСР_{0,95} в компьютерных программах EXCEL и СТРАЗ соответственно. При подсчете НСР_{0,05} штамм 97618 при t 20°C использовали как эталон.

Результаты и их обсуждение

Сравнение агрессивности при разных температурах показало, что по всем компонентам она была значительно (в 1,5-7 раз) выше при t 20°C, чем при t 12°C (табл. 2). Срав-

Компоненты агрессивности штаммов *P. infestans* при температурах 20°C и 12°C (н)

Штамм	Компоненты агрессивности						
	ЧИ	РН	ИС	ИП	ЛП	ЛП-ИП	ИИА
<i>Штамм с характеристиками «старого типа»</i>							
97604	5	4,3	3,5	2,9±0,1	3,1±0,2	0,2±0,4	8,4±2,6
97604н	4,3	3,5	1,6	5,2±0,1	5,3±0,1	0,1±0,2	0,9±0,3
<i>Штамм – североамериканский эндемик</i>							
97654	5	4,3	2,0	2,9±0,1	3,0±0	0,1±0,3	5,0±1,7
97654н	4,8	3,0	1,3	4,9±0,2	5,1±0,1	0,2±0,3	0,8±0
<i>Штаммы с рекомбинантным генотипом</i>							
97618	5	4,3	2,3	3,4±0,4	4,0±0,3	0,6±0,5	3,4±0,5
97618н	2,8	2,5	1,0	5,3±0,2	6,0±0	0,7±0,2	0,2±0,1
97659	4,8	4,3	2,8	3,0±0	3,5±0,2	0,5±0,9	5,5±0,9
97659н	4,5	3,0	1,2	5,2±0,2	5,4±0,3	0,3±0,1	0,6±0,1
НСР ₀₉₅	0,7	0,6	0,7	0,5	0,5		2,1

Примечание: ЧИ – частота инфекции; РН – размер некрозов; ИС – интенсивность спороношения; ИП – инкубационный период; ЛП – латентный период; ИП-ЛП – разность между инкубационным и латентным периодами; ИИА – итоговый индекс агрессивности.

нение агрессивности различных штаммов показало, что при температуре 12°C штамм «старого типа» не уступал другим штаммам или даже превосходил их по компонентам агрессивности. В целом, если при понижении температуры штаммы с эндемичными и рекомбинантными генотипами теряли агрессивность в 6-17 раз, то штамм «старого типа» — в 9 раз (табл. 2).

Полученные в этом исследовании и ранее [3, 11] данные свидетельствуют о том, что в настоящее время оптимумы развития определенных стадий жизненного цикла *P. infestans* соответствуют разным температурам. При температуре 5~10°C осуществляется образование зооспор, при 15-20°C — развитие мицелия, при 25°C — прямое прорастание зооспорангиев. При несоответствующих температурах осуществление стадий жизненного цик-

ла может быть затруднено или невозможно. К примеру, компоненты агрессивности при низких или высоких температурах находятся на низком уровне. Есть основания полагать, что эволюция *P. infestans* направлена на достижения максимального соответствия стадий жизненного цикла возбудителя фитофтороза суточным температурным ритмам. Эту эволюционную стратегию эффективно реализуют штаммы с различными генотипами, в т. ч. и с характеристиками «старого типа».

Полученные в настоящем и предшествующих исследованиях [2, 3] результаты дают возможность проанализировать известную теорию о том, что повсеместно широко распространенные до 1980-х гг. штаммы «старого типа» с аллелями 86 и 92 по локусам *Gpi* и *Pep-1* (генотип US-1: A1 *Gpi* 86/100 *Pep-1* 92/100

и его модификации) были вытеснены штаммами «нового типа» с аллелем 100 по этим локусам. Причина вытеснения — большая агрессивность новых штаммов [9, 10]. В настоящее время только популяция *P. infestans* из долины Толука дает возможность проверить эту теорию. Только в ней сохранились регулярно встречающиеся штаммы с аллелем *Gpi* 86 (в т. ч. и соответствующие генотипам «старого типа» по локусам *Gpi* и *Pep-1*), способные сосуществовать с другими штаммами [5].

Несколько другие результаты были получены в предшествующем исследовании [14]. Было показано, что «новые» штаммы в условиях США обладали некоторым преимуществом по агрессивности при низких температурах. Это могло создать штаммам «нового типа» дополнительные преимущества и способствовать их преобладанию во многих природных популяциях *P. infestans*, особенно в тех климатических условиях, при которых температура колеблется в пределах 10 — 15 — 20°C. Однако выше уже было сказано, что низкие температуры не оказали большого влияния на развитие общей агрессивности *P. infestans*, а при t 20°C штаммы «старого типа» уже не уступали другим штаммам по большинству компонентов агрессивности [2]. Поэтому полученные нами результаты не могут свидетельствовать о полном вытеснении штаммов «старого типа» другими штаммами из-за различий по компонентам агрессивности за довольно короткий срок. Для этого разница в агрессивности между штаммами «нового» и «старого» типов как при высоких, так и низких температурах должна была составить не менее 5—10 раз, но таких различий между ними обнаружено не было.

В ряде работ было изучено влияние отрицательных температур на жизнеспособность мицелиев *P. infestans* различных генотипов («старого типа» US-1, а также US-8, US-11 и US-14). Оказалось, что штаммы всех генотипов сохраняли некоторую жизнеспособность при температуре от ~5°C до 0°C [13]. Толерантность к этому диапазону температур была несколько выше у штаммов US-8 и US-14, что могло обеспечить некоторое преобладание новых штаммов в регионах с холодным климатом [13] благодаря первичной инфекции в клубнях-волонтерах. Однако полного замещения генотипов и эта разница не гарантирует. Кроме того, в странах с мягким климатом, где замена генотипов также имела место, подобное объяснение совсем не подходит. Поэтому едва ли различия штаммов по агрессивности и жизнеспособности могли стать решающей причиной столь существенных популяционных сдвигов.

Полное замещение генотипов могло произойти только под влиянием внешнего фактора, повсеместно ослабившего штаммы *P. infestans* «старого типа» в большей степени, чем другие штаммы. Таким фактором могло стать массовое применение фениламидных препаратов на основе металаксила [2]. Штаммы «старого типа» не сумели приспособиться к этим препаратам. Штаммы с другими генотипами оказались более устойчивыми и на фоне применения фунгицидов они сумели эффективно реализовать свои некоторые преимущества в агрессивности и полностью вытеснить оставшиеся небольшие количества ослабленных штаммов «старого типа». В результате агрессивность полевых популяций *P. infestans* в целом повысилась.

В долине Толука в 1997 и 1998 гг. преобладали чувствительные к металаксилу штаммы как «новых», так и «старых» генотипов [5]. Мы полагаем, что штаммы «старого типа» сумели там сохраниться благодаря эффективному половому размножению [2].

В 1992 и 1993 гг. штаммы «старого типа», восприимчивые к металаксилу, еще довольно часто выявляли и в России — например, на томате в Одинцовском районе Московской обл. Они сосуществовали со штаммами «нового типа» [1]. Против *P. infestans* тогда активно применялся металаксилсодержащий препарат арцерид. В 1993 г. большинство штаммов в этой популяции *P. infestans* были «нового типа» и устойчивы к металаксилу. Далее в ней выявляли только штаммы «нового типа» [1]. По мере отказа от обработок металаксилсодержащими препаратами к 1995 г. в пределах доминировавшего «нового типа» появилось довольно много чувствительных изолятов *P. infestans*.

Выводы

1. При $t\ 12^{\circ}\text{C}$ у всех исследованных штаммов *P. infestans* из долины Толука агрессивность была значительно ниже, чем при $t\ 20^{\circ}\text{C}$.

2. Результаты нашего настоящего и предшествующих исследований свидетельствуют о том, что каждая стадия жизненного цикла *P. infestans* имеет свой температурный оптимум. При этом достигается соответствие между развитием стадий жизненного цикла возбудителя фитофтороза и суточными температурными ритмами, что способствует очень эффективному развитию *P. infestans* и осложняет применение против нее средств защиты.

3. При $t\ 12^{\circ}\text{C}$ штамм с характеристиками «старого типа» (с типом спаривания A1 и генотипом 86/100 по локусу *Gpi*) по агрессивности не уступал другим штам-

мам или превосходил их. Эти данные не свидетельствовали в пользу возможности полного вытеснения штаммов «старого типа» за короткий срок времени.

4. К вытеснению штаммов «старого типа» могли привести обработки металаксилсодержащими препаратами, так как эти штаммы не выработали к ним устойчивость.

За возможность проведения этой работы и советы автор очень благодарен др. Н. Дж. Грюнвальду и др. В. Г. Флаеру. Исследование поддержано грантом СЕЕМ (Cornell-Eastern Europe-Mexico) в 1998 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Смирнов А. Н. Популяционная структура фитопатогенного гриба *P. infestans* (Mont.) de Vauy в Московской обл. в 1991-1996 гг. Автореф. канд. дисс. МГУ. М., 1996. — 2. Смирнов А. Н. Характеристики мексиканских штаммов из долины Толука. I. Агрессивность // Микол. и фитопатол., 2006. Т. 40. В печати. — 3. Смирнов А. Н. Характеристики мексиканских штаммов из долины Толука. II. Прорастание зооспорангиев // Микол. и фитопатол., 2006. Т. 40. В печати. — 4. Филиппов А. В., Гуревич Б. И., Кузнецова М. А. и др. Горизонтальная устойчивость листьев картофеля к *P. infestans* и агрессивность изолятов патогена из разных географических регионов // Микол. и фитопатол., 2004. Т. 38. С. 74-88. — 5. Flier W. G., Grtinwald N. J., Croon L. P. N. M. et al. // Phytopathology, 2003. Vol. 93. P. 382-390. — 6. Flier W. G., Grtinwald N. J., Fry W. E. et al. // Mycol. Res., 2001. Vol. 105. P. 998-1006. — 7. Flier W. G. and Turkensteen L. J. // European Journal of plant pathology, 1999. Vol. 105. P. 381-388. — 8. Gallegly M. E., Galindo G. // Phytopathology, 1958. Vol. 48. P. 274-277. — 9. Goodwin S. B., Cohen B. A., Fry W. E. // Proc. Natl. Acad. Sci. United States, 1994. Vol. 91. P. 11591-11595. — 10. Goodwin S. B., Spielman L. J., Matuszak J. M. et al. // Phytopathology, 1992. Vol. 82. P. 955-961. — 11. Ham-

son J. G. // Plant pathology, 1992. Vol. 41. P. 384-416. — 12. Hebert P. D. N., Beaton M. J. // A practical handbook Guelph, Ontario, 1993. — 13. Kirk W. E. // Phytopathology, 2003. Vol. 93. P. 1400-1406. — 14. Mizubuti E. S. G., Fry W. E. // Phytopathology, 1998. Vol. 88. P. 837-843. — 15. Niederhauser J. S. *Phytophthora*

infestans: the Mexican connection. *Phytophthora* / Ed. J. A. Lucas, R. C. Shattock, D. S. Shaw, L. R. Cooke. Cambridge, 1991. P. 25-45. — 16. Tooley P. W., Fry W. E., Villareal-Gonzalez M. J. // J. Hered., 1985. Vol. 76. P. 431-435. — 17. Tooley P. W., SweigarcL J. A., Fry W. E. // Phytopathology, 1986. Vol. 76. P. 1209-1212.

Статья поступила
12 октября 2005 г.

SUMMARY

In this investigation the aggressiveness of 4 strains of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary from Mexico, the Toluca Valley, was studied at the temperatures 12°C and 20°C. According to the mating type and isozyme locus *Gpi*, one strain belonged to the 'old type' which is already not detected in the European populations of late blight agent, other three strains had genotypes originated from sexual recombination or endemic for Mexico. The following standard features of aggressiveness were determined at the temperature 20°C: IF (infection frequency), LA (lesion area), SC (sporulation capacity), LP (latent period), IP (incubation period), LP-IP (difference between latent and incubation periods), CFI (composite fitness index) = $(IF \times LA \times SC) / (IP \times LP)$ were determined. All these features were used from the previous investigations but modified in some details.

At 12°C the aggressiveness of all investigated strains was essentially lower than at 20°C (approximately by 2~5 times lower). At 12°C the strain with characteristics of 'old type' was weaker in components of aggressiveness than other strains. At the mixed coexistence this difference could not cause quite a strong advantage of strains of a 'new type'. I believe that it was not enough for total displacement of strains of 'old type' by the other strains. This assumption is also based on the fact that at 20°C the aggressiveness of strains of 'old type' was comparable with aggressiveness of strains which now predominate in Mexican and European *P. infestans* populations. With consideration of data of the current and previous investigations I suppose that displacement of genotypes in the natural populations of late blight agent was initially caused rather by application of Metalaxyl-containing fungicides than by difference in aggressiveness.