

УДК (>82.4.01 / .08

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ООСПОР В ПОЛЕВЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ ГРИБА *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Д. Н. СМИРНОВ

(Кафедра ботаники)

В статье анализируется происхождение ооспор *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary — гриба, паразитирующего на картофеле и томатах. При перекрестном оплодотворении с участием мицелиев разных типов спаривания у *P. infestans* образуются гибридные ооспоры (зиготы). При самооплодотворении с участием одного мицелия *P. infestans* также образуются ооспоры (зиготы). Кроме того, ооспоры могут образовываться при партеногенезе — из неоплодотворенного оогония. Показано, что лабораторные методы слежения гиф и генанализ малоэффективны для определения происхождения ооспор в полевых популяциях гриба. Для этого предлагается анализировать морфологию ооспор (размер, толщину стенок, форму оогония, наличие антеридия) и определять типы спаривания мицелиев, образовавших ооспоры. Анализ этих признаков позволяет разграничить все 3 типа ооспор *P. infestans* в полевых образцах.

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary — гриб, паразитирующий на картофеле и томатах. Гриб способен активно размножаться бесполым путем — посредством конидий (зооспорангиев) и зооспор. Описан для него и парасексуальный цикл.

Система скрещивания *P. infestans*

Каждый мицелий *P. infestans* потенциально самофертилен. Он способен формировать мужские и женские органы полового размножения — антеридии и оогонии.

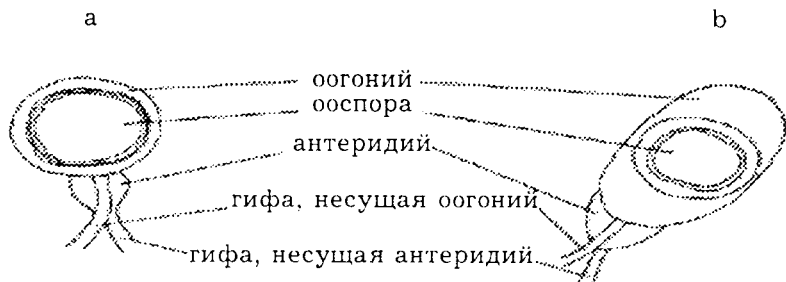


Рис. 1, а — ооспора типичной морфологии (гибридная или образующаяся при самооплодотворении, по [6]; б — ооспора с нетипичным оогонием, образованная при самооплодотворении.

Их образованию предшествует мейоз. При половом процессе отрог антеридия оплодотворяет яйцеклетку в оогонии и образуется зигота — ооспора [6] (рис. 1, а).

Установлено, что у *P. infestans* существует 2 генетически различные группы мицелиев — А1 и А2. Они соответствуют 2 типам спаривания гриба. При встрече мицелии А1 и А2 начинают формировать антеридии и оогонии, в результате образуются частые ооспоры. Интересно, что антеридиальная/оогониальная активность мицелия зависит от его физиологического состояния, а также от партнера по скрещиванию [6]. Есть данные, что образование ооспор у *P. infestans* осуществляется благодаря выделению полового гормона мицелием одного типа спаривания и узнаванию его мицелием другого

типа спаривания [9]. Таким образом, типы спаривания работают скорее как типы половой совместимости [6].

В ряде случаев мицелий *P. infestans* образует ооспоры при самооплодотворении (рис. 1, а, б). Это случается под действием бактерий, грибов, фунгицидов, метаболитов мицелия другого типа спаривания. Вероятно, описанные внешние воздействия включают систему выделения и узнавания половых гормонов, благодаря чему мицелий способен производить органы полового размножения и затем ооспоры [9, 10].

Наконец, ооспоры могут формироваться при одной из форм апомиксиса — партеногенезе [1—3, 12]; (рис. 2). Партеногенез представляет собой половое размножение без полового процесса. Это своеобразный промежуточный вариант между половым

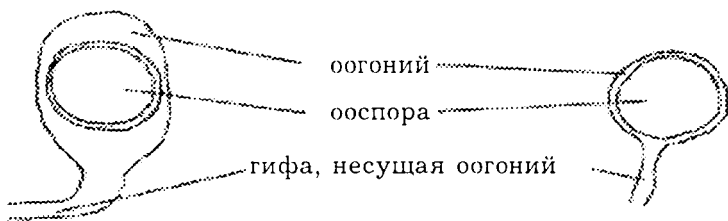


Рис. 2. Партеногенетические ооспоры, по [3, 4].

и бесполом размножением. При партеногенезе мицелий гриба на основе митотических делений формирует оогонии. Из них образуются ооспоры. Антеридий при партеногенезе не образуется. Нередко причиной партеногенетического образования ооспор является стрессовая нагрузка на мицелий.

Партеногенетические ооспоры могут напоминать хламидоспоры. Однако между ними есть существенные различия. Хламидоспоры *P. infestans* образуются в результате утолщений гиф, возникающих на всем их протя-

жении [4] (рис. 3). Партеногенетические ооспоры (фактически — оогонии) формируются только на концах гиф [3] (см. рис. 2).

Строго говоря, термин «ооспора» применим только для структур, образующихся при партеногенезе. Споры (в том числе и ооспоры) образуются при бесполом размножении, а не в результате полового процесса. Для обозначения продуктов полового процесса принят термин «зиготы». Однако у *P. infestans* партеногенетические ооспоры были достоверно описаны раньше, чем половой процесс.

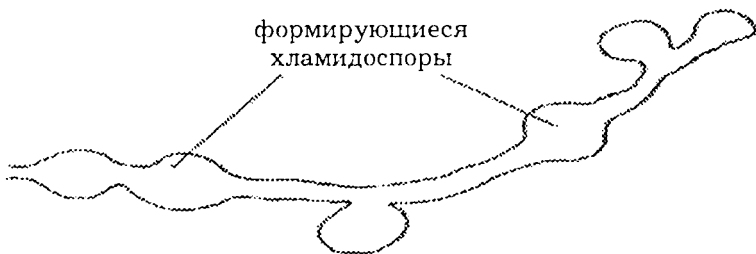


Рис. 3. Гифа с формирующимися хламидоспорами, по [3].

Поэтому позднее термин «ооспоры» механически применили и для продуктов полового процесса. Традиция называть зиготы ооспорами настолько прочно укоренилась в микологии, что менять ее, видимо, уже не стоит.

Таким образом, по происхождению у *P. infestans* возможно образование ооспор трех типов [2].

1. Гибридные ооспоры.

Они образуются в результате перекрестного оплодотворения с участием мицелиев А1 и А2.

2. **Ооспоры от самооплодотворения.** Они образуются на одном мицелии при половом процессе. Иногда их называют «сэлфинговые» ооспоры (от английского «сэлфинг») — самооплодотворение).

3. **Партногенетические ооспоры.** Они образуются на одном мицелии из оогония без полового процесса.

Ооспоры от самооплодотворения и партеногенетические называют **нсгибридными**, так как они образуются на одном мицелии.

Значение ооспор

P. infestans

Генетическая роль ооспор разных типов различна. Так, мицелии из гибридных ооспор могут сильно отличаться от исходных родительских мицелиев, образовавших ооспоры. Этот эффект связан с

мейозом и кроссинговером, предшествующих образованию ооспор. Таким образом в полевых популяциях *P. infestans*, где есть мицелии А1 и А2 и половое размножение, могут образовываться новые формы гриба, в том числе и высокопатогенные. Мицелии из ооспор, образованных при самооплодотворении, также могут отличаться от родительских мицелиев. Однако эти различия будут не столь велики, как в случае с гибридными ооспорами. Мицелии из партеногенетических ооспор будут генетически одинаковы с исходными мицелиями, образовавшими ооспоры.

Биологическая роль ооспор в основном сводится к перенесению *P. infestans* неблагоприятных условий. Ооспоры могут служить источником распространения *P. infestans* и первичного заражения грибом растений-хозяев. Мы полагаем, что различные по происхождению ооспоры могут иметь в этих процессах разное значение. Такая точка зрения требует экспериментальных подтверждений.

Определение происхождения ооспор в лабораторных условиях

Разработано 2 группы методов, позволяющих определить происхождение ооспор в лабораторных условиях.

Первая группа методов связана с отслеживанием гиф, на которых образуются антеридии и оогонии [6]. Если гифа оогония направлена в сторону одного мицелия, а гифа антеридия — к другому мицелию с противоположным типом спаривания, то, скорее всего, образующаяся ооспора будет иметь гибридное происхождение. Если и гифа антеридия, и гифа оогония направлены к одному мицелию, то образующаяся ооспора будет результатом самооплодотворения.

В Калифорнийском университете США были получены мицелии *P. infestans*, обладающие способностью светиться [8]. Это было достигнуто посредством трансформации — вставки в геном *P. infestans* плазмидного гена GUS, ответственного за свечение. Скрещивание трансгенных светящихся и обычных несветящихся мицелиев разных типов спаривания позволило отслеживать происхождение ооспор. Если один из органов полового размножения светился, а другой — нет, то это свидетельствовало в пользу гибридного происхождения образующейся ооспоры. Если оба органа полового размножения светились или, наоборот, не светились, то это указывало на негибридное происхождение образующейся ооспоры.

Использование этого метода показало, что при скрещивании мицелиев A1 и A2 около 50% ооспор образовывалось при самооплодотворении, а остальные имели гибридное происхождение.

Рассмотренные методы слежения гиф имеют недостатки. При слежении гиф возможны визуальные ошибки. Наличие нового гена в мицелии и его свечение, вполне вероятно могут изменить поведение как этого мицелия, так и его партнера по скрещиванию, способствуя их самооплодотворению. Так, при отдельных скрещиваниях между близкими видами *P. infestans* и *P. mirabilis* было обнаружено, что большая часть образуемых ооспор имеет негибридное происхождение [7]. Кроме того, со временем у части гиф способность к свечению слабела [8].

Другая группа методов связана с генанализом [7, 10, 11, 12]. При генанализе использовали димерные аллоферменты, для которых было установлено, какие аллели их кодируют. Скрещивали 2 гомозиготных мицелия разных типов спаривания, различающиеся по аллелям одного из генов, получали ооспоры и проращивали их отдельно друг от друга. Полученные мицелии представляют собой F1. Определив аллели исходного гена в каждом из этих

мицелиев, можно установить генетическое происхождение ооспор, из которых они образовались [11]. Мицелии из гибридных ооспор должны иметь оба родительских аллеля. Мицелии из негибридных ооспор должны иметь только один из родительских аллелей (схема 1).

Схема 1. Скрещивание двух мицелиев *P. infestans*, гомозиготных по аллелям гена аллофермента фосфоглюкоизомеразы ФГИ-1 (аллели 86 и 100).

P Мицелий А1 (86/86) x Мицелий А2 (100/100).

- F1 1. Мицелии 86/86 — из негибридных ооспор, образованных родительским мицелием А1;
2. Мицелии 100/100 — из негибридных ооспор, образованных родительским мицелием А2;
3. Мицелии 86/100 — из гибридных ооспор.

Однако при таком способе нельзя различить ооспоры от самооплодотворения и партеногенетические ооспоры [12]. Это учли Сمارт и Фрай из Корнуэльского университета США (личное сообщение). Они предложили вводить в скрещивание гетерозиготные родительские мицелии. В этом случае расщепление в F1 возможно как при перекрестном оплодотворении, так и при самооплодо-

творении. При партеногенезе расщепления в F1 не происходит (не считая возможных очень редких случаев соматического кроссинговера). Поэтому такой подход во многих случаях позволяет различить F1 от самооплодотворения и партеногенеза (схема 2).

Схема 2. Скрещивание двух мицелиев *P. infestans*, гетерозиготных по аллелям гена аллофермента фосфоглюкоизомеразы ФГИ-1 (аллели 86, 100, 111, 122) и ее объяснение.

P Мицелий А1 (86/122) x Мицелий А2 (100/111).

- F1 1. Мицелии 86/86, 122/122 — скорее всего из ооспор, образованных при самооплодотворении родительского мицелия А1;
2. Мицелии 86/122 — из ооспор, образованных при самооплодотворении или партеногенезе родительским мицелием А1;
3. Мицелии 100/100, 111/111 — из ооспор, образованных при самооплодотворении родительского мицелия А2;
4. Мицелии 100/111 — скорее всего из ооспор, образованных при самооплодотворении или партеногенезе родительским мицелием А2;
5. Мицелии 86/100, 86/111, 100/122, 111/122 — из гибридных ооспор.

Мицелии 2 и 4 из схемы 2 требуют дополнительной проверки, чтобы установить происхождение ооспор, из которых они были образованы. Для этого можно использовать дополнительные белковые (другие аллоферменты) и ДНК-овые (фингерпринты ДНК) маркеры. Если по ним будут выявлены различия между этими мицелиями и родительскими мицелиями, то, скорее всего, это будет указывать на самооплодотворение. Однако нельзя исключать и партеногенетическое происхождение некоторых из этих мицелиев благодаря соматическому кроссинговеру. Если различий выявлено не будет, то поставленный вопрос, по-прежнему, останется нерешенным.

Согласно выводам большинства авторов, при контакте мицелиев А1 и А2 подавляющее большинство ооспор имеет гибридное происхождение [6, 7, 11, 12]. Сначала образуется небольшое количество ооспор от самооплодотворения [12]. Видимо, это связано с тем, что выделение половых гормонов и их диффузия в среде несколько опережает контакт мицелиев. Далее гифы мицелиев А1 и А2 взаимодействуют. В результате образуются обильные гибридные ооспоры и редкие ооспоры негибридного происхождения.

Таким образом, используя описанные методы, можно выяснить генетическое происхождение большинства ооспор, полученных в лабораторных условиях. Однако даже посредством этих методов в ряде случаев трудно различить ооспоры, полученные при самооплодотворении и партеногенезе.

Определение происхождения природных ооспор

Применять приведенные выше методы для природных ооспор оказалось практически невозможно. Гифы *P. znfestans* в полевых образцах довольно быстро разрушаются, поэтому отследить их направление не представляется возможным.

Выделение из одной зоны поражения двух мицелиев разных типов спаривания с хорошими генетическими различиями — случай крайне редкий. Кроме того, эти мицелии могут и не образовывать ооспоры. Описано немало случаев, когда в полевых экспериментах при контакте мицелиев А1 и А2 в природе ооспоры не образовывались [5]. Проращивать природные ооспоры значительно труднее, чем ооспоры, полученные в искусственных условиях. Если даже и удастся осуществить генанализ для конкретной пары изоля-

тов, то это не гарантирует, что для других комбинаций и других условий результат будет сходным. Наконец, генанализу вовсе не поддаются случаи, когда в скрещивании участвует три мицелия и более, что нередко встречается в природных популяциях *P. infestans*. Кроме того, молекулярный анализ имеет большую себестоимость.

Методы слежения гиф и генанализ оказались применимы только в лабораторных условиях. Для использования этих методов к работе с полевыми образцами требуется их совершенствование.

Для определения происхождения природных ооспор *P. infestans*, обнаруженных в пораженных образцах из одного места, следует использовать морфологический и популяционно-генетический анализы. Предлагаемый подход основан на анализе исследований по биологии и генетике *P. infestans*, а также на консультациях с российскими и зарубежными специалистами. десятки лет проработавшими с *P. infestans*.

Сначала необходимо собрать полевые образцы с одним или несколькими числами фитотрофных пятен. Их следует доставить в лабораторию и выделить из каждого пятна одну чистую культуру *P. infestans*. Из некоторых пятен можно выделить

2—3 чистых культуры гриба. Далее образцы нужно обесцветить и осуществить в них поиск ооспор.

Для обнаруженных ооспор следует провести морфологический анализ (табл. 1).

Гибридные ооспоры образуются при перекрестном оплодотворении и имеют шаровидную форму (см. рис. 1). Их стенка может быть достаточно толстой, многослойной или двухслойной. Антеридий имеется. Большинство ооспор имеет диаметр 25—35 мкм.

Ооспоры, образованные при самооплодотворении. Часть ооспор этого типа очень похожа на гибридные ооспоры (см. рис. 1, а), особенно если они (в малом количестве) образуются при скрещивании мицелиев разных типов спаривания. Однако другие ооспоры этого типа могут иметь нетипичные морфологические особенности — оогоний необычной формы (рис. 1, б), большой антеридий. Некоторые ооспоры могут быть крупными — от 40 до 60 мкм в диаметре.

Партеногенетические ооспоры характеризуются шаровидным или удлинённым оогонием с достаточно тонкой стенкой и не имеют антеридия (рис. 2). Многие из них могут иметь размер 15-20 мкм, что не характерно для ооспор, образованных в результате полового процесса.

**Морфологические различия между гибридными ооспорами
и ооспорами, образующимися при самооплодотворении
и партеногенезе**

Морфологический признак	Гибридные ооспоры	Ооспоры, образованные при самооплодотворении	Партеногенетические ооспоры
Диаметр ооспоры	21–50 мкм, как правило, в районе 25–35 мкм	21–50 мкм, многие из ооспор могут быть довольно крупными — до 40 мкм и более	15–45 мкм, в ряде случаев ооспоры могут быть мелкими — 15–20 мкм в диаметре
Стенка ооспоры	Толстая или довольно толстая, многослойная, двухслойная	Довольно толстая, реже толстая, 1–2 слоя, реже многослойная	Тонкая, редко довольно толстая, однослойная, реже двухслойная
Оогоний	Образуется, как правило, шаровидный	Образуется различной формы — от шаровидной	Образуется, шаровидный, реже овальной или неправильной формы до овальной или неправильной
Антеридий	Образуется	Образуется	Отсутствует

Параллельно морфологическим исследованиям следует провести популяционно-генетический анализ *P. infestans*. Для этого необходимо определить типы спаривания культур, выделенных из образцов с ооспорами (табл. 2).

Гибридные ооспоры образуются в образцах с 2 и большим количеством пятен фитофтороза. В этих пятнах развиваются мицелии раз-

личных типов спаривания. Ооспоры на листе формируются в основном в местах их контакта. Соответственно в исследуемой популяции *P. infestans* из одного места также должны присутствовать мицелии разных типов спаривания. Частоты различных мицелиев в популяции должны быть сравнимы, чтобы повысить вероятность контактов между ними.

Т а б л и ц а

**Генетические различия между гибридными ооспорами
и ооспорами, образующимися при самооплодотворении
и партеногенезе**

Признак	Гибридные ооспоры	Ооспоры, образованные при самооплодотворении	Партеногенетические ооспоры
Число пятен на образце	Два и более	Одно, два или несколько	Одно, два или несколько
Типы спаривания мицелиев в образце	Мицелии разных типов спаривания	Мицелии одного типа спаривания	Мицелии одного типа спаривания
Типы спаривания мицелиев в полевой популяции	Мицелии разных типов спаривания в соотношении не меньшем, чем 9:1	Мицелии одного типа спаривания преобладают в соотношении большем, чем 9:1	Мицелии одного типа спаривания преобладают в соотношении большем, чем 9:1
Встречаемость ооспор в образце	Часто или умеренно	Редко или умеренно	Редко, умеренно, реже часто
Распределение ооспор в образце	Местами	Равномерно, иногда группами	Равномерно, иногда группами

Негибридные ооспоры

формируются в образцах с различным числом пятен фитофтороза. Наиболее обычный вариант — когда пятно одно. В каждом пятне развивается мицелий одного типа спаривания. Ооспоры могут развиваться на протяжении всей зоны поражения, более-менее равномерно, иногда — группами. Соответственно в исследуемой популяции *P. infestans* из од-

ного места должны присутствовать мицелии одного или преимущественного одного типа спаривания. Контакты мицелиев различных типов спаривания должны отсутствовать или их вероятность должна быть минимальной.

Далее следует сделать выводы по морфологическому и популяционно-генетическому анализам ооспор и сопоставить их друг с другом. В случае соответствия между ними

можно давать заключение о происхождении наблюдаемых ооспор.

По отдельности морфологический и популяционно-генетический анализы эффективны не всегда. Морфологический метод во многих случаях не позволяет различить гибридные ооспоры и ооспоры от самооплодотворения. Популяционно-генетический метод не позволяет установить различия между ооспорами, образованными при самооплодотворении и партеногенезе. Однако при комбинировании 2 методов можно обойти эти трудности и с высокой вероятностью сделать вывод о происхождении большинства наблюдаемых ооспор.

Предлагаемый метод имеет ограничения и трудности. Так, в ряде случаев установить происхождение одной конкретной ооспоры не представляется возможным. Например, при скрещивании мицелиев A1 и A2 образуется много ооспор типичной морфологии (см. рис. 1, а). Доказано, что большинство из них имеет гибридное происхождение и лишь некоторые образуются в результате самооплодотворения. Но, не имея возможности использовать генанализ, нельзя определить, какие именно ооспоры образовались при самооплодотворении.

В ряде случаев пятна фитотрофа могут сливаться, и определить их точное количество становится трудно. Чтобы определить соотношение типов спаривания в полевой популяции *P. infestans*, нужно выделить большое количество чистых культур. Это удастся сделать далеко не всегда.

Диаметр ооспор может изменяться в зависимости от разных причин. Так, увеличение пloidности ооспор приводит к увеличению их размеров. Полиплоидным и анеуплоидным мицелиям значительно легче скрещиваться самим с собой, а не с партнером, имеющим другую пloidность. Это в значительной степени подтверждает точку зрения, что большинство крупных ооспор типичной морфологии в природе образуются при самооплодотворении.

Стенка ооспоры бывает различной толщины. Отдельные партеногенетические ооспоры могут иметь толстую стенку, а гибридные ооспоры — тонкую. Наконец, все типы ооспор могут иметь стенку умеренной толщины. Эти особенности затрудняют морфологический анализ.

Наличие антеридия позволяет отличать ооспоры, возникшие при половом процессе, от партеногенетических ооспор. Однако антеридий —

структура непрочная, в природных условиях она может сравнительно легко отвалиться от оогония, разрушиться. При анализе ооспор (оогониев) без антеридия эту особенность следует учитывать.

Описанные трудности могут возникнуть, скорее, при анализе отдельных признаков или ооспор. Помешать основному анализу массива ооспор они не могут. Например, если в образцах обнаружены умеренные или частые средне- и толстостенные ооспоры около 30 мкм в диаметре без антеридиев и из этих образцов выделены мицелии обоих типов спаривания, то можно заключить, что большинство наблюдаемых ооспор имеет гибридное происхождение. По причинам, изложенным выше, отсутствие антеридиев допускает сделать этот вывод.

Определение происхождения полевых ооспор имеет большое научно-практическое значение. Способность к образованию ооспор различных типов — один из факторов, определяющих стратегию популяции *P. infestans*. Сведения о происхождении ооспор важны при изучении

биологии *P. infestans*, создании моделей, прогнозирующих развитие заболевания на растениях-хозяевах и использовании мер защиты против фитофтороза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бордукова М. В. Зимовка *Phytophthora infestans* D. В. в условиях Московской области. — Вестн. Овощеводство и картофель, 1940, № 3, с. 13-19. — 2. Кузнецов С. А., Смирнов А. Н. Роль ооспор в популяциях фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в Московской области. — Сб. студенческих науч. работ, 1999, М.: МСХА, с. 7—12. — 3. Маленев Ф. Е. К вопросу о партеногенетическом образовании ооспор у гриба *Phytophthora infestans* D. В. — Записки ЛСХИ, 1962, т. 87, с. 104~108. — 4. Смирнов А. Н. Популяционная структура фитопатогенного гриба *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в Московской области в 1991-1996 г. Канд. дис. М., 1996. — 5. Cohen Y., Farhash S., Reshit Z. — Phytopathology, 1997, vol. 87, no 2, p. 191-196. — 6. Galindo J., Gallegly M. E. — Phytopathology, 1960, vol. 50, p. 123-128. — 7. Goodwin S. B.,

Статья написана при поддержке Корнуэльского университета США (СЕЕМ project, 1998 г.) и российско-белорусского гранта РФФИ (00-04-81101, 2000 г.). Автор благодарен С. Н. Еланскому и О. А. Коровкину за ценные советы и замечания.

- Fry W. E. Experimental mycology, 1994, vol. 18, p. 20-32. — 8. Judelson H. S. — Fungal genetics and biology, 1997, vol. 21, p. 187-197. — 9. Ko W. H. — Journal of general microbiology, 1980, vol. 116, p. 459-463. — 10. Shattick R. C., Tooley P. W., Fry W. E. — Phytopathology, 1986, vol. 76, No 4, p. 407-410. — 11. Shattick R. C., Tooley P. W., Fry W. E. — Phytopathology, 1986, vol. 76, No 4, p. 410-413. — 12. Whittaker S. L., Assinder S. J., Shaw D. S. — Mycological research, 1994, vol. 98, N 5, p. 569—575.

Статья поступила
16 мая 2000 г.

SUMMARY

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary is the fungal agent causing late blight of potato and tomato. In the present article the origin of *P. infestans* oospores is analyzed. The hybrid oospores (zygotes) are formed at cross-fertilization with a participation of *P. infestans* mycelia of different mating types. The other oospores (zygotes) are formed at self-fertilization with participation of only one *P. infestans* mycelium. The third kind of oospores can be formed at parthenogenesis — from unfertilized oogonia. The modern laboratory techniques (tracing of the hyphae, GUS gene transformation, genetic analysis of matings) are shown to be ineffective for determination of these types of oospores in the field *P. infestans* populations. Here we suggest to analyze the oospore morphology (size, thickness of the wall, the form of oogonium, and presence of antheridium) and mating types of the strains producing the investigated oospores. The analysis of these features should allow to distinguish all three kinds of *P. infestans* oospores *in vivo*.