

Кравцов Алексей Сергеевич

Некоторые особенности структуры популяции *Phytophthora infestans*
(Mont.) de Bary на Европейской территории Российской Федерации

Специальность 06.01.11 - "Защита растений"

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2003

Работа выполнена в лаборатории грибных болезней картофеля и овощных культур Всероссийского научно – исследовательского института фитопатологии Российской академии сельскохозяйственных наук в 1999 – 2003 г.г.

Научный руководитель: кандидат биологических наук А.В. Филиппов

Официальные оппоненты: Доктор биологических наук Ф.С. Джалилов
Кандидат биологических наук М.К. Деревягина

Ведущая организация: Всероссийский институт растениеводства, г.Пушкино, Ленинградской области.

Защита диссертации состоится «23 июля» 2003 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета К – 006 – 064 – 01 во Всероссийском научно – исследовательском институте фитопатологии по адресу: 143050, Московская обл., Одинцовский район, п/о. Б. Вяземы, ВНИИФ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ВНИИ фитопатологии.

Автореферат разослан «16 июля» 2003 г.

Ученый секретарь диссертационного совета кандидат биологических наук



Яковлева И.Н.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Картофель принадлежит к числу важнейших сельскохозяйственных культур. В мировом производстве продукции растениеводства картофель, занимает одно из ведущих мест, наряду с пшеницей, кукурузой, рисом.

Российская Федерация занимает одно из лидирующих положений в мире по уровню валового производства картофеля. Доля России в мировом производстве этой культуры составляет около 10%. В 2002 г. в хозяйствах всех категорий Российской Федерации картофель выращивался на площади 3,2 млн. гектаров, валовой сбор составил 31,2 млн.т. (данные Министерства сельского хозяйства России).

К числу важнейших проблем в большинстве стран, производящих картофель, относятся существенные потери урожая, из-за поражения культуры различными вредителями, болезнями и, в частности, фитофторозом.

В России потери урожая картофеля от фитофтороза колеблются от 10 до 60% в зависимости от региональных природно-климатических, агрометеорологических условий выращивания, устойчивости сортов и других факторов и составляют в среднем 4 млн. тонн в год (Наумова, 1961; Локтина, 1969; Дорожкин и др., 1976; Попкова, 1989; Филиппов и др., 2001).

Среди основных мероприятий, направленных на сокращение потерь урожая картофеля от фитофтороза, в настоящее время наиболее эффективными являются химические методы защиты и возделывание устойчивых сортов.

Методы химической защиты позволяют существенно сократить потери урожая клубней, однако имеют существенные недостатки. С экономической точки зрения они являются дорогостоящими, так как требуют больших затрат на закупку препаратов и проведение химических обработок значительных площадей, занятых под картофелем. С биологической – могут приводить к нарушению естественных биоценозов, что имеет большое значение с точки зрения охраны окружающей среды.

Создание устойчивых сортов дает возможность существенно сократить применение химических обработок фунгицидами. Однако, как известно, устойчивость к фитофторозу новых сортов, обычно, недолговечна. Сложность задачи заключается, с одной стороны, в недостаточной изученности механизмов устойчивости хозяина, а с другой - в высокой изменчивости самого фитопатогена – возбудителя болезни.

Изменчивость *Phytophthora infestans* проявляется в образовании новых, более вирулентных и агрессивных форм патогена, способных преодолевать защитные реакции ранее устойчивых сортов, а также в приобретении устойчивости к некоторым фунгицидам.

В этой связи, изучение микроэволюционных процессов, протекающих на уровне региональных популяций, позволяет больше приблизиться к пониманию закономерностей формиро-

вания новых популяций патогена, и, на этой основе, прогнозировать динамику его свойств и, с учетом полученных сведений, планировать систему защитных мероприятий.

Целями наших исследований являлось сравнительное изучение популяций фитопатогена *P. infestans* в различных регионах Европейской части Российской Федерации по нескольким характеризующим популяцию генетическим маркерам (признакам), изучение ооспорообразования на примере популяций выделенных в условиях Московской области, сравнение полевого и лабораторного методов оценки частичной устойчивости сортов картофеля к *P. infestans* и сравнение степени агрессивности некоторых региональных популяций.

Основные задачи исследований:

1. Изучение динамики генотипического состава популяций, собранных на территории различных регионов Европейской части Российской Федерации за период с 1999-2002 г.г. по маркерам: тип совместимости (спаривания), полиморфизм митохондриальной ДНК, полиморфизм электрофоретически разделенных белков.
2. Изучение морфологии ооспор на примере популяций, выделенных в природно-климатических условиях Московской области.
3. Сравнение полевого и лабораторного методов оценки агрессивности *P. infestans* и частичной устойчивости к ней сортов картофеля.
4. Сравнение степени агрессивности изолятов некоторых региональных популяций *P. infestans*.

Научная новизна и практическая значимость работы

Выявлено, что исследованные полевые популяции *P. infestans* представлены штаммами обоих типов спаривания. Отмечено значительное варьирование соотношения типов спаривания в различных регионах.

Показано преобладание на Европейской территории России неклональных популяций посредством анализа маркеров, характеризующих популяции.

В результате исследований с использованием молекулярно – генетических маркеров установлено, что широко распространенный в прошлом клональный генотип US 1 не обнаружен среди протестированных нами штаммов *P. infestans*.

Изучен процесс ооспорообразования в природно-климатических условиях Московской области. Показано, что большинство природных ооспор являлись структурами негибридного происхождения.

Выявлено соответствие результатов при полевом и лабораторном испытании признака агрессивности *P. infestans*.

Показано различие в уровне агрессивности штаммов, выделенных из нескольких географически отдаленных регионов Европейской территории Российской Федерации при испытании на наборе сортов картофеля.

Даны научно обоснованные рекомендации по использованию штаммов популяций *P. infestans* при испытании частичной (расонеспецифической) устойчивости сортов картофеля к фитофторозу.

Сделано предположение о независимости локусов, определяющих показатели агрессивности фитопатогена и локусов, определяющих показатели типа спаривания, гаплотипов митохондриальной ДНК и спектра изоферментов.

Результаты исследований могут быть использованы в качестве рекомендаций для усовершенствования интегрированной защиты картофеля от фитофтороза, в том числе в технологиях без применения или с минимальным применением химических средств защиты.

Апробация работы: материалы диссертации представлены на Всероссийском пятом популяционном семинаре «популяция, сообщество, эволюция» (г. Казань, 2001); Научно-практической конференции «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы» (Москва, 2001); Научной конференции «Памяти Грегора Менделя» (Москва, 2001); Международном симпозиуме «Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы» (г. Пенза, 2001); Первом съезде микологов «Современная микология в России» (г. Москва, 2002); Первой всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям (г. Санкт-Петербург, 2002).

Публикации: По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в которых изложено основное содержание диссертации и одна работа сдана в печать.

Структура и объем диссертации: Диссертационная работа изложена на 106 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, экспериментальной части, выводов и рекомендаций производству. Библиография включает 154 наименования, в том числе 116 зарубежных авторов. Диссертация содержит 10 таблиц, 6 рисунков, 12 графических диаграмм, 1 приложение.

Содержание работы

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы освещены современные представления о биологии *P. infestans*, рассмотрены основные гипотезы о происхождении и мировом распространении фитопатогена, обобщены сведения о показателях, характеризующих популяции и методах их исследования.

Глава 2. Условия, материалы и методы исследований

Исследования проведены в 1999 – 2003 г.г. во Всероссийском научно – исследовательском институте фитопатологии РАСХН, а также на кафедре микологии и альгологии Московского государственного университета им. Ломоносова.

Сбор и выделение образцов, пораженных фитофторозом, проводились автором совместно с сотрудниками ВНИИФ и МГУ в следующих регионах:

1999 г. - Одинцовский, Рузский, Подольский районы Московской Области, г. Москва (делянка МСХА), Нефтекумский район Ставропольского края.

2000 г. – Одинцовский, Шаховской, Шатурский, Можайский, Дмитровский районы Московской Области, г. Москва (делянка МСХА), г. Череповец Вологодской области, Рязанская, Архангельская, Воронежская области, Республика Марий Эл, Ставропольский край.

2001 г. - Шаховской, Коломенский районы Московской Области, Республика Северная Осетия, Мордовия, г. Кисловодск Ставропольского края, г. Луга Ленинградской области, Смоленская, Ярославская, Мурманская, Брянская, Гульская, Тамбовская области.

2002 г. – Республика Ингушетия, г. Луга Ленинградской области.

Анализ молекулярных и биологических свойств штаммов *P. infestans* проводился следующими методами: Тип спаривания исследуемых штаммов определяли, используя тестерные штаммы: Б-5, принадлежащий к типу спаривания А1; и ХК-3, принадлежащий к типу спаривания А2.

Гаплотипы митохондриальной ДНК (мтДНК) идентифицировали согласно методике, разработанной Гриффитцем и Шоу (1998).

Выделение ДНК для ПЦР – анализа осуществляли по модифицированной нами методике Гриффитца и Шоу (1998).

Спектр изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы и пептидазы определяли на целлюлозоацетатных гелях по методике описанной Гудвином (Goodwin, et al., 1995) в нашей модификации, с использованием соответствующих красителей, согласно рекомендациям производителя – Helena Laboratories inc. (Hebert et al., 1993). Для опытов использовали наращенный в течение 10-15 дней на жидкой гороховой среде мицелий исследуемых штаммов.

Образцы для анализа ооспор собирали на пораженных фитофторозом листьях картофеля, а также листьях и плодах томатов в Московской области. Каждый из них сразу помещался в отдельную чашку Петри с целью исключить возможность перезаражения. Образцы доставляли в лабораторию и помещали во влажные камеры с относительной влажностью воздуха близкой к 100% при температуре 18° С. Появившийся воздушный мицелий через сутки помещали на питательную среду для получения чистой культуры.

Приготовление препаратов для исследования зигот осуществляли путем кипячения образцов листьев с ооспорами в концентрированном (96 %-ном) растворе этилового спирта в течение 3 мин., с последующей инкубацией в 10%-ом растворе хлорной жидкости в течение 1 ч при комнатной температуре. Обесцвеченные образцы проверяли на присутствие зигот посредством световой микроскопии.

Для изучения параметров агрессивности в полевых условиях опыты закладывали в массиве картофеля. При выращивании данной культуры использовали принятую в Московской области агротехнику.

В эксперименте были использованы сорта картофеля: Брянская новинка, Вэлор, Лина, Луговской, Невский, Санте, Лорх, и др., которые были предоставлены государственной комиссией по испытанию сортов. Сорт New York 121 был предоставлен коллегами из Корнельского университета США.

Степень пораженности растений картофеля фитофторозом в полевом опыте оценивали визуально, путем определения доли поверхности листьев, занятой некротическими пятнами согласно шкале Британского микологического общества (Anonymous, 1947).

С целью получения реизолатов *P. infestans*, и изучения отдельных этапов инфекционного цикла, изучаемые сорта выращивали в климатической камере до фазы развития 5-6 листьев. Режим выращивания: фотопериод - 16 часов, дневная температура – 22°С, ночная температура – 18°С, относительная влажность воздуха – 60-70%, освещенность – 8-10 тыс. люкс, лампы ДНАТ-400. Изолированные с растений каждого сорта листья инокулировали смесью изолятов *P. infestans* (10 изолятов), выделенных в каждом изучаемом географическом регионе. После появления на листьях фитофторозных пятен и спороношения, спорангии переносили на овсяную агаризованную питательную среду для размножения и повторного тестирования.

Измерение результативности заражения проводили на 10 листьях с растений каждого сорта-образца. Листья инокулировали путем опрыскивания суспензией зооспор (5-6 зооспор в поле зрения микроскопа при увеличении X120). После инокуляции листья выдерживали при 18°С во влажной камере. Через 3 суток подсчитывали число некрозов на 1 см² поверхности листа.

Для измерения размеров некрозов, инокулом на листья в виде суспензии зооспор наносили локально (по 1-2 капле на лист). Использовали микродозатор, позволяющий наносить капли объемом 10 мкл (5-6 зооспор в поле зрения микроскопа при увеличении X120). Инокулированные листья выдерживали в течение 18 часов во влажной камере в условиях отсутствия освещенности.

С целью измерения параметра продуктивности спороношения инокуляцию листьев проводили по методике, идентичной методике измерения размеров некрозов.

Интенсивность спорообразования оценивали способом прямого подсчета количества конидий на 1 пятно с помощью камеры Горяева или визуально - в баллах.

Для определения фитофтороустойчивости растений картофеля расчеты проводили с помощью компьютерной программы или по номограмме определения потерь урожая картофеля от фитофтороза в результате преждевременного отмирания ботвы (Гуревич и др. 1977).

В качестве эталонной пары использовали сорт картофеля Санте, и изолят *P. infestans* №161.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили при 95% уровне достоверности, используя пакет статистических функций программы Microsoft Excel 2000.

Результаты исследований

Глава 3. Изучение популяций *P. infestans*

1. Изучение типов спаривания популяций *P. infestans* на Европейской территории Российской Федерации

Тип спаривания определяли у всех собранных штаммов. Всего протестировано 997 штаммов, из них: Московская область (554 с картофеля и 133 с томатов), прочие регионы – 310.

В результате исследований выявлено, что большинство полевых популяций представлены штаммами обоих типов спаривания. Соотношение A1:A2 подвержено значительным колебаниям в различных регионах.

Проявление самофертильности отмечалась очень редко среди картофельных и томатных штаммов.

Для изучения изменчивости соотношения типов спаривания в популяциях *P. infestans* Московской области по годам были усреднены данные по всем обследованным полевым популяциям Московской области за соответствующий год. Для более полной картины приведены данные начиная с 1993 года.

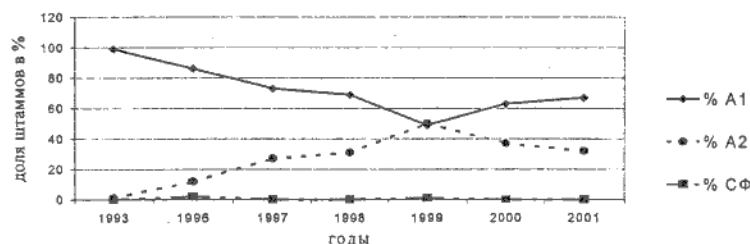


Рисунок 1. Распределение типов спаривания в популяциях *P. infestans* Московской области с *картофеля* (средние значения за сезон; получены усреднением данных по популяциям)

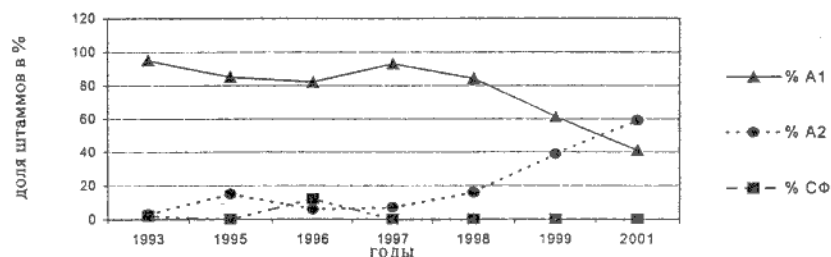


Рисунок 2. Распределение типов спаривания в популяциях *P. infestans* Московской области с *томатов* (средние значения за сезон; получены усреднением данных по популяциям)

Как видно на рисунках, возрастание доли штаммов A2 типа спаривания на картофеле отмечается до 1998 г включительно, после чего в 1999 – 2000 гг. соотношение A1:A2 стабилизировалось примерно на уровне 1:1, а в 2000 - 2001 г.г. среди выделенных штаммов снова преобладал A1 тип спаривания. Среди штаммов *P. infestans*, выделенных с томатов, отмечено возрастание содержания A2 типа спаривания.

В целом можно отметить, что в настоящее время в популяциях *P. infestans* на посадках картофеля и томатов во многих регионах Европейской части Российской Федерации преобладает тип спаривания A1. Отмечаемое в отдельных регионах значение, близкое к 100% одного из типов спаривания можно объяснить преобладанием на данной территории клональной популяции, что в свою очередь может быть связано с использованием для посадки картофеля местных клубней и постоянным сортовым набором в данном регионе. Московская область находится в центре сильно заселенной и хорошо освоенной Европейской части России. Для посадки картофеля здесь используют сорта и семенной материал различного происхождения. Это может способствовать одновременному развитию A1 и A2 типов спаривания.

2. Сравнение гаплотипов митохондриальной ДНК и изоферментных локусов регионально отдаленных популяций *P. infestans* на Европейской территории Российской Федерации

Сравнение гаплотипов митохондриальной ДНК

В процессе исследований выявлено два гаплотипа митохондриальной ДНК. Гаплотип 1а, с двумя фрагментами длиной 720 bp и 350 bp, и гаплотип 2а, с тремя фрагментами длиной 720bp, 203bp и 147bp.

Полученные данные представлены в виде рисунков 3,4, отражающих доли гаплотипов 1а и 2а штаммов, выделенных с картофеля и томатов.

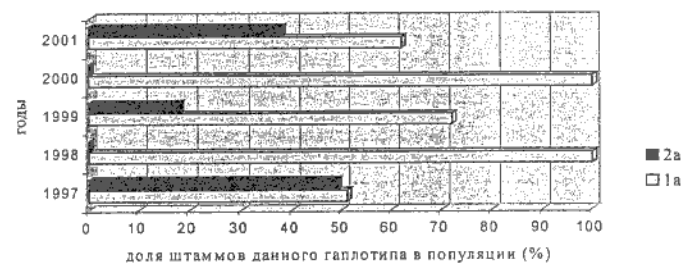


Рисунок 3. Гаплотипы митохондриальной ДНК штаммов, выделенных с картофеля



Рисунок 4. Гаплотипы митохондриальной ДНК штаммов, выделенных с томатов

Как видно на рисунках, гаплотип 1а преобладает в большинстве исследованных полевых популяций.

По данным Еланского и др. (1999) в подмосковных популяциях *P. infestans* до 1995 года преобладал гаплотип 2а.

Согласно литературным источникам, в Российских популяциях *P. infestans* до 1993 года обнаруживался гаплотип 1в с тремя фрагментами длиной 641bp, 350bp и 79bp, характерный для генотипа US 1. Данный гаплотип не был выявлен в протестированной нами коллекции штаммов.

Сравнение изоферментных локусов глюкозо-6-фосфат изомеразы *Gpi-6* и пептидазы *Per-1*

Спектр изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы определен у 214 штаммов, а спектр изоферментов локуса 1 пептидазы у 376 штаммов из сборов 1997 – 2001 г.г.

Результаты тестирования спектров изоферментов локуса 1 пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы штаммов, собранных в 1997 – 2001 г.г. с картофеля и томатов представлены в виде рисунков 5,6.

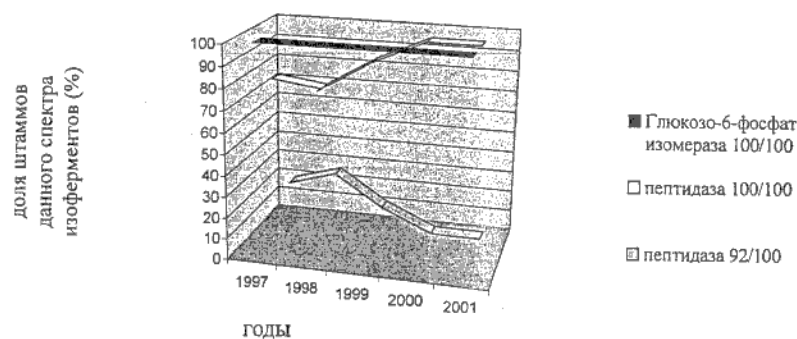


Рисунок 5. Спектр изоферментов локуса 1 пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы штаммов, собранных с картофеля

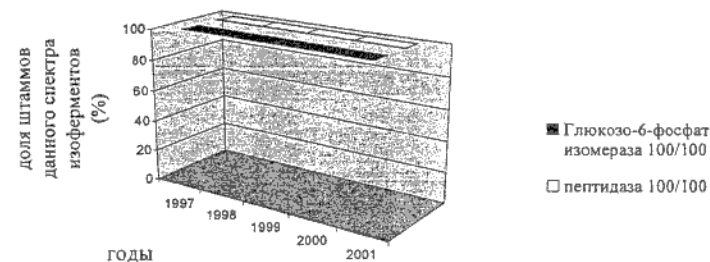


Рисунок 6 Спектр изоферментов локуса пептидазы 1 и глюкозо-6-фосфат изомеразы штаммов, собранных с томатов.

Как видно на приведенных рисунках, спектр изоферментов глюкозо-6-фосфат изомеразы представлен одним изоферментом – 100/100. Применение этого маркера в исследованиях российских популяций *P. infestans* видится малоперспективным по причине того, что все штаммы, исследованные за последние годы, показали исключительную мономорфность по данному маркеру.

Встречавшийся ранее аллель 86/100, характерный для широко распространенного до начала 1990-х годов 20 века клона US 1, не был выявлен в результате наших исследований.

Локус 1 пептидазы представлен двумя аллелями 92 и 100 и их комбинацией в гетерозиготе 92/100.

На картофеле отмечается увеличение доли локуса пептидазы 100/100 и уменьшение 92/100 в 1998 - 1999 г.г. с последующей их стабилизацией.

На томатах преобладал локус пептидазы 100/100. Гетерозигота 92/100 не обнаружена у штаммов, выделенных с посадок томатов.

3. Изучение происхождения и морфологии ооспор в подмосковных популяциях *P. infestans*

Образцы для анализа были выделены на территориях Одинцовского, Рузского, Подольского, Ступинского, Шатурского районов Московской области, делянках МСХА им. Тимирязева, окрестностях городов Дубна и Орехово-Зуево.

Анализ встречаемости ооспор в пораженных фитофторозом образцах, собранных с картофеля и томатов в Московской области в 1997, 1999 и 2000 г.г. приведен на рисунке 7.

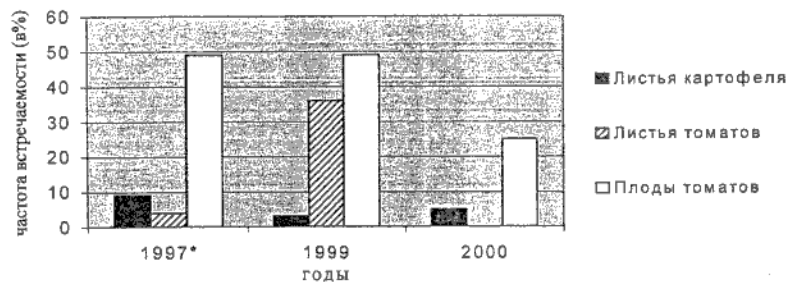


Рисунок 7. Встречаемость ооспор в пораженных фитофторозом образцах картофеля и томатов в Московской области в 1997, 1999, 2000 г.г.

* Прим.: Сбор образцов в 1997 году производили Смирнов А.Н. совместно с Еланским С.Н.

Как видно на рисунке 7, пораженные фитофторозом части растений с ооспорами отмечены в полевых популяциях Подмосквья, как с картофеля, так и с томатов.

Наибольшая доля образцов с ооспорами отмечена среди образцов, выделенных из плодов томатов. Обильные ооспоры отмечены в пораженных листьях томатов. Образцы, выделенные из листьев картофеля, показали сравнительно меньшее число ооспор.

Перед тем, как просматривать пораженный фитофторозом образец на наличие ооспор, из него выделяли в чистую культуру изоляты *P. infestans*.

На рисунке 8 показана встречаемость ооспор в фитофторозных образцах с учетом типа спаривания выделенного штамма патогена.

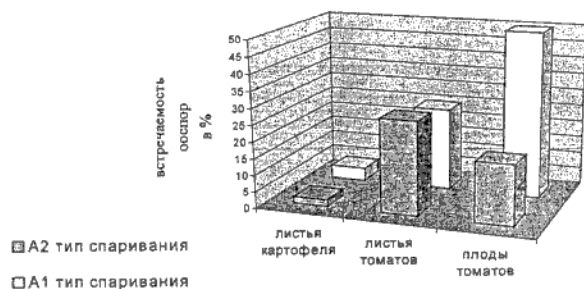


Рисунок 8. Встречаемость ооспор в образцах с мицелиями различных типов спаривания

Как видно на рисунке 8, ооспоры образовывались как в пятнах с мицелиями A1, так и в пятнах с мицелиями A2 типов спаривания.

Какого-то преимущества в образовании ооспор в образцах с мицелиями A1 или A2 не отмечено.

Для описания ооспор в пораженных фитофторозом образцах были выделены некоторые дискретные признаки – размер ооспоры, толщина стенки, наличие или отсутствие антеридия, форма и структура оогония (таблица 1).

Таблица 1

Определение морфологических типов ооспор *P. infestans* *

Позиции признаков			
Первая	Вторая	Третья	Четвертая
Размер ооспор	Толщина стенки	Наличие антеридия	Наличие и структура оогония
1. не более 20 мкм	1. тонкая однослойная	1. есть	1. нет
2. 21-30 мкм	2. средней толщины,	2. нет	2. а. есть, шаровидный, периплазмы почти нет
3. 31-40 мкм	одно-двуслойная, возможно, с наслоениями		2 б. есть, шаровидный, периплазма хорошо выражена
4. более 40 мкм	3. толстая, более чем двуслойная, с наслоениями		3. а. есть, разнообразной, но не шаровидной периплазмы почти нет 3. б. есть, разнообразной, но не шаровидной формы, периплазма хорошо выражена

* Для описания отдельной ооспоры необходимо последовательно, в каждом из четырех позиций признаков выбрать один вариант, обозначенный соответствующей цифрой. Полное описание складывается из четырех цифр, каждая из которых отражает один из вариантов признака.

В соответствии с дискретными градациями признаков, приведенными в таблице 1, были описаны ооспоры в пораженных фитофторозом листьях томатов и картофеля и плодах томатов.

Во всех видах пораженных образцов были отмечены различные морфологические типы ооспор. В пораженных листьях картофеля чаще других встречались морфологические типы 1121, 1221, 2121, и 2221, отличающиеся небольшим размером (менее 30 мкм., тонкой одно- или двухслойной оболочкой, отсутствием оогония и антеридия).

В образцах листьев томатов преобладали типы 2221, 2121, 2123b и 2223a, размером от 20 до 30 мкм, с тонкой одно- или двуслойной клеточной стенкой, отсутствием антеридия; оогоний или отсутствовал, или был не шаровидной формы.

В плодах томатов несколько чаще других были отмечены типы 3321- сравнительно большие образования с толстой оболочкой, без антеридия и с невыраженным оогонием.

Ооспоры, которые по морфологическому критерию принято считать гибридными являются круглыми толстостенными образованиями. По нашей классификации им соответствуют типы 3311, 3312a, 3312b, 4311, 4312a, 4312b.

Анализ полученных данных показывает, что ооспоры, которые по морфологическому критерию относят к гибридным, преобладают в образцах из плодов томатов. В листьях томатов встречаются и те, и другие. В листьях картофеля преобладают ооспоры, не отвечающие морфологическим типам гибридных ооспор.

В исследованных нами популяциях *P. infestans* обнаружены ооспоры как типичной морфологии, так и нетипичной (ооспороподобные тела). Они характеризовались малыми (до 20 мкм) или большими (более 40 мкм) размерами, а также наличием продолговатых оогониев. Антеридии встречались редко.

В результате сопоставления морфологии ооспор и типов спаривания образующих их мигрирующих мицелиев мы заключили, что большинство обнаруженных ооспор, несмотря на присутствие мицелиев A1 и A2 в большинстве популяций патогена могут иметь негибридное происхождение. Они могли образовываться в результате самооплодотворения или партеногенеза.

4. Сравнение полевого и лабораторного методов оценки частичной устойчивости сортов картофеля к *P. infestans*

В данном исследовании мы сопоставили результаты оценки уровней частичной устойчивости, полученные с помощью лабораторного метода и результаты оценки, проведенной в полевых условиях.

Лабораторный метод основан на тестировании основных этапов инфекционного цикла искусственно зараженных изолированных листьев и использовании математической модели развития фитофтороза (Бобкова, Гуревич, Филиппов, 1982).

Процедура оценки включает параллельное измерение результативности заражения, инкубационного периода, продуктивности спорообразования и размера фитофторозных пятен на изучаемой паре "сорт картофеля – штамм патогена" и эталонной паре "сорт картофеля Санте – штамм *P. infestans* № 161". Полученные данные вводятся в модель, реализованную в виде номограммы и компьютерной программы. Модель вычисляет потери урожая изучаемого сорта, зараженного изучаемым штаммом патогена в результате преждевременного отмирания ботвы от фитофтороза при стандартных (среднеблагоприятных) для развития болезни метеоусловиях. Ранее было определено, что при указанных условиях сорт Санте, зараженный штаммом № 161 теряет 35 % урожая.

Указанный показатель был обозначен нами как "индекс вредоносности фитофтороза".

При этом было предложено использовать следующие градации уровней частичной устойчивости сортов и уровней агрессивности *P. infestans*.

Индекс вредоносности < 5%:	сорт – устойчивый (У), изолят(ы) – неагрессивный(ые) (НА);
Индекс вредоносности– 5-15 %:	сорт – умеренно устойчивый (УУ), изолят(ы) – слабоагрессивный(ые) (СА);
Индекс вредоносности-- 16-35 %:	сорт – умеренно восприимчивый (УВ), изолят(ы) – умеренно агрессивный(ые) (УА);
Индекс вредоносности > 35 %:	сорт – восприимчивый (В), изолят(ы) – высоко агрессивный(ые) (ВА).

В наших опытах предложенный лабораторный метод в 2000 году был сравнен с прямыми полевыми наблюдениями за развитием фитофтороза.

Метеорологические условия Московской области вегетационного сезона 2000 года позволили провести указанную работу, так как они были благоприятными для эпифитотийного развития фитофтороза. Первые очаги инфекции на картофельных полях были отмечены в фазу бутонизации ранних сортов, и уже к середине августа ботва многих возделываемых сортов в значительной степени была поражена болезнью.

Исследование проводили на 31 сорте картофеля. По 30 здоровых клубней каждого сорта высадили на опытном поле на участке ВНИИФ. С двух сторон участка высадили клубни сорта Санте (по 10 борозд с каждой стороны). 2% семенных клубней этого сорта в период посадки имели признаки естественного заражения фитофторозом. Указанный семенной материал был выращен в предыдущем году на близлежащем участке. Осенью с листьев картофеля, расположенного на этом участке, были выделены изоляты *P. infestans*, которые использовали в 2000 году для тестирования изучаемых сортов в лабораторных условиях.

Таким образом, в полевых условиях наблюдали за развитием фитофтороза на испытываемых сортах картофеля на естественном инфекционном фоне. В лабораторных условиях искусственно заражали листья растений изолятами патогена, выделенными в 1999 году с полевых растений сорта Санте. Указанное обстоятельство давало основание полагать, что в поле и лаборатории мы имели дело с одними и теми же штаммами *P. infestans*.

Результаты сравнения двух методов представлены в таблице 2.

Таблица 2

Сравнение методов полевой и лабораторной оценки частичной устойчивости сортов картофеля к *P. infestans*

Сорт картофеля	Лабораторная оценка	Полевая оценка
	Потери урожая, %*	Потери урожая, %*
Винета	56	47
Роко	39	39
Русалка	38	36
Самарский	39	43
Горянка	57	55
Ксантия	42	38
КоLETTE	53	32
Легенда	39	19
Успех	39	16
Сату	50	16
Альвара	19	19
Майдас	24	19
Снегирь	32	19
Аргос	24	17
Панда	33	16
Скарлет	30	33
Геноватор	29	27
Розамунда	28	29
Тристар	26	25
Фазан	25	19
Ниван	26	24
Сьерра	24	16
Адлер	21	20
Санте	30	21
Накра	23	7
Вэлор	11	9
Красная роза	15	8
Лена	12	12
Марс	14	8
Олимп	11	3
Победа	12	4

* Потери урожая (%) в результате преждевременного отмирания ботвы от фитофтороза при стандартных (среднеблагоприятных) для развития болезни метеоусловиях и при появлении симптомов ее в фазу бутонизации (индекс вредоносности)

Для сравнения полевой и лабораторной оценок была построена точечная диаграмма, отражающая характер линейной корреляции данных.

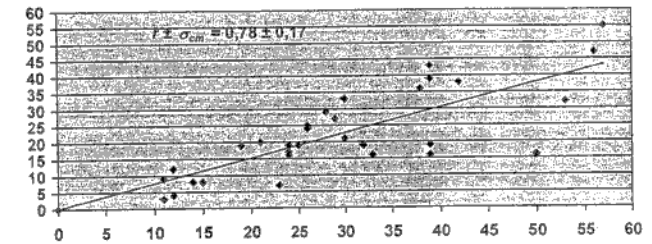


Рисунок 9. Характер линейной корреляции данных, полученных в результате полевого и лабораторного методов оценок частичной устойчивости сортов картофеля к фитофторозу

Как видно на приведенном рисунке, определенные с помощью лабораторного метода данные удовлетворительно коррелируют с результатами, полученными в полевых условиях ($r = 0,78$ при $P = 0,05$).

При лабораторной оценке отмечалось некоторое завышение уровней восприимчивости сортов к фитофторозу. Однако, оно, чаще всего, было систематическим и не выходило за пределы двух соседних градаций.

По-видимому, это обстоятельство можно объяснить тем, что метеорологические и фитосанитарные условия 2000 года не в полной мере соответствовали условиям, введенным в модель. Однако, исходя из полученных данных, мы считаем, что предложенный метод позволяет с достаточной для практических целей точностью отнести испытуемый сорт картофеля к какой-либо группе устойчивости, и, следовательно, испытуемый изолят *P. infestans* к какой-либо из принятых градаций агрессивности.

5. Сравнение степени агрессивности некоторых региональных популяций *P. infestans*

Опыт проводили в 2002 году. Отделенные листья полевых растений картофеля инокулировали штаммами, выделенными в 4-х различных географических пунктах. Использовали инфекционный материал, выделенный в 2001 году.

Места выделения тестируемых штаммов *P. infestans*: Московская, Брянская, Мурманская области, Ставропольский край.

Из изолятов каждой региональной популяции было получено по 10 реизолятов. Тестировали 22 сорта картофеля.

Опыт проводили в 2 этапа:

I Этап. Ранней весной, изучаемые сорта выращивали в климатической камере до фазы развития 5-6 листьев. Изолированные с растений каждого сорта листья инокулировали смесью из 10 изолятов *P. infestans*, выделенных из каждой изучаемой популяции. После появления фитофторозных пятен и спороношения спорангии с листьев каждого сорта отдельно переносили на овсяную агаризованную питательную среду для размножения и повторного тестирования (II Этап). Таким способом из инокулома элиминировали неэффективные части популяции, то есть штаммы, не способные развиваться на изучаемом сорте (в том числе авирулентные к сорту ра-сы).

II Этап. Растения изучаемых сортов и эталонного сорта выращивали в полевых условиях. В фазу развития 7-9 листьев с 30 растений каждого сорта отделяли по одному листу. Листья переносили в лабораторию и инокулировали реизолятами патогена с этого же сорта. Измеряли продуктивность спороношения, длину инкубационного периода и размер некрозов. Каждую тестируемую пару "сорт - патоген" сравнивали с эталонной парой (сорт картофеля Санте, инокулируемый изолятом *P. infestans* № 161). При заданных благоприятных для развития фитофтороза метеорологических условиях растения указанного эталонного сорта, зараженные изолятом № 161 теряют 35% урожая.

Для каждой изучаемой пары "сорт - патоген" с помощью компьютерной программы определяли индекс вредоносности, уровень частичной устойчивости и степень агрессивности.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, используя пакет статистических функций программы Microsoft Excel 2000.

Данные о взаимовлиянии *Phytophthora infestans* – сорт картофеля при заражении листьев различных сортов картофеля реизолятами четырех географически отдаленных популяций патогена представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что штаммы популяций *P. infestans*, выделенные в различных регионах Европейской части России, проявляют неодинаковый уровень агрессивности на испытуемых сортах картофеля.

Как видно, наиболее высокий уровень агрессивности имеют реизоляты брянской популяции (высокоагрессивны на листьях 14 сортов, и умеренно агрессивны на листьях 8 сортов).

Реизоляты Ставропольской, Мурманской и Московской популяций были близки по уровню агрессивности. Ставропольские реизоляты были высокоагрессивны на 9 сортах, умеренно агрессивны на 12 и слабоагрессивны на 1 сорте. Мурманские реизоляты были высокоагрессивны на 8 сортах, умеренно агрессивны на 12 и слабоагрессивны на 2 сортах. Московские реизоляты были высокоагрессивны на 5 сортах, умеренно агрессивны на 16 и оказались неагрессивны к 1 сорту.

Таблица 3
Уровни агрессивности реизолятов *P. infestans* из четырех географически отдаленных пунктов, определенные на основании расчета индексов вредоносности для различных сортов картофеля (НСР 95 = 6,12)

Название сорта	Брянская область		Ставропольский край		Мурманская область		Московская область	
	ИВ*	Уровни агр-ти	ИВ	Уровни агр-ти	ИВ	Уровни агр-ти	ИВ	Уровни агр-ти
Ромула	56	ВА	46	ВА	48	ВА	39	ВА
Виктория	49	ВА	40	ВА	40	ВА	36	ВА
Лорх	44	ВА	45	ВА	47	ВА	41	ВА
Клариса	50	ВА	53	ВА	47	ВА	30	УА
Sante	46	ВА	42	ВА	42	ВА	35	УА
Любав	45	ВА	37	ВА	42	ВА	26	УА
Саурькинский	44	ВА	44	ВА	38	ВА	18	УА
Спирidon	43	ВА	41	ВА	32	УА	44	ВА
Деренка	49	ВА	22	УА	40	ВА	39	ВА
Слава Брянщины	45	ВА	35	ВА	31	УА	16	УА
Невский	41	ВА	20	УА	29	УА	16	УА
Сказка	40	ВА	28	УА	26	УА	27	УА
Дерби	40	ВА	34	УА	25	УА	32	УА
Лина	39	ВА	31	УА	24	УА	32	УА
Ульбка	31	УА	26	УА	22	УА	17	УА
Брянский налужный	31	УА	25	УА	22	УА	22	УА
Удача	31	УА	34	УА	29	УА	26	УА
Большвик	30	УА	19	УА	29	УА	25	УА
New York 121	30	УА	31	УА	29	УА	21	УА
Лугтовской	23	УА	18	УА	8	СА	18	УА
Брянская новинка	34	УА	14	СА	21	УА	16	УА
Валор	23	УА	20	УА	11	СА	1	ВА
Среднее	39	ВА	32	УА	31	УА	26	УА
		ВА – высокоагрессивные		УА – умеренно агрессивные		СА – слабоагрессивные		ВА – неагрессивные

* Индекс Вредоносности (ИВ) – расчетные потери урожая (%) в результате преждевременного отмирания ботвы от фитофтороза при стандартных (среднеблагоприятных) для развития болезни метеоусловиях и при появлении симптомов ее в фазу бутонизации

Результаты указанного опыта дают основание считать, что сорта картофеля, проявляющие какой либо уровень частичной устойчивости к высокоагрессивной популяции патогена (например, брянской), могут проявить сходный или больший уровень устойчивости к менее агрессивным популяциям. В то же время, сорта, показавшие восприимчивость к высокоагрессивным популяциям, не обязательно будут также восприимчивы к другим популяциям. Поэтому, с практической точки зрения фитотроустойчивость сортов картофеля целесообразно оценивать, используя для этих целей штаммы *P. infestans* наиболее агрессивных популяций.

б. Сравнение показателя агрессивности с некоторыми другими признаками, характеризующими популяцию *P. infestans*

С целью сравнения показателей агрессивности изучаемых популяций *P. infestans*, с другими показателями, характеризующими популяцию (тип спаривания, гаплотипы митохондриальной ДНК, спектр изоферментов), полученные данные были сведены в таблицу 4.

Таблица 4

Сравнение показателей агрессивности 4-х региональных популяций *P. infestans* с соотношениями типов спаривания, гаплотипов митохондриальной ДНК и спектром изоферментов *P. infestans*

Исследуемые популяции	Индекс вредоносности/Уровень агрессивности	Тип спаривания		Гаплотип мт ДНК		Спектр изоферментов	
		A 1	A 2	1a	2a	PEP 100/100	GPI 100/100
Брянская	39 / ВА	69	31	76	24	100	100
Ставропольская	32 / УА	39	61	60	40	86	100
Мурманская	31 / УА	79	21	72	28	100	100
Московская	26 / УА	64	36	82	18	100	100

Сокращения: ВА – высокоагрессивные штаммы; УА – умеренно агрессивные штаммы.

Как и следовало ожидать, между уровнем агрессивности *P. infestans* и соотношениями типов спаривания, гаплотипами митохондриальной ДНК и спектром изоферментов *P. infestans* корреляционной зависимости не выявлено ($r = 0.07$; $r = 0.21$; $r = 0.01$; $r = 0.00$), что может свидетельствовать о независимости локусов, определяющих эти показатели.

Выводы

1. В полевых популяциях *P. infestans* исследованных регионов Европейской части Российской Федерации обнаружены штаммы обоих типов спаривания. При этом, отмечено значительное варьирование в соотношении A1 и A2 типов спаривания в различных регионах. Выявлено преобладание типа спаривания A1 в большинстве исследованных полевых популяций.
2. Обнаружены два типа митохондриальной ДНК – 1a и 2a. Показано преобладание 1a типа в протестированных штаммах различных популяций. Гаплотип 1b не был выявлен в протестированной нами коллекции штаммов.
3. Анализ спектра изоферментов показал, что глюкозо-6-фосфат изомераза представлена одним аллелем – 100, а пептидаза (локус 1) – двумя аллелями – 92 и 100. Гомозигота 92/92 выявлена в незначительном количестве, а гомозигота 100/100 преобладала во всех исследованных популяциях. Гетерозигота 92/100 отмечена как на картофеле, так и на томатах.
4. Результаты анализа полевых популяций по признакам типа спаривания, типа митохондриальной ДНК, спектра изоферментов и уровней агрессивности *P. infestans* свидетельствуют о преобладании неклональных популяций на Европейской территории России. При этом наибольшее генетическое разнообразие отмечено в Московской области и на Кавказе.
5. Широко распространенный в прошлом генотип US-1 не выявлен среди российских штаммов, протестированных в 1999-2002 годах.
6. В полевых популяциях *P. infestans* Московской области обнаружены ооспоры. Наличие большой доли ооспор нетипичной морфологии, отсутствие корреляции доли образцов с ооспорами с соотношениями типов спаривания, образование подавляющего числа ооспор мицелиями одного типа спаривания позволило предположить негибридное происхождение большинства исследованных природных ооспор.
7. Установлена положительная корреляция данных, полученных в результате полевого и лабораторного методов испытания признака агрессивности *P. infestans*.
8. Показано различие в уровнях агрессивности штаммов, выделенных в различных географических пунктах. Обнаруженные вариации агрессивности исследуемых популяций патогена означают, что один и тот же сорт картофеля в различных регионах может проявлять различные уровни частичной устойчивости. В связи с тем, что уровни устойчивости сортов картофеля к различным популяциям неодинаковы, рекомендовано сорта и исходный селекционный материал картофеля испытывать с использованием изолятов популяций имеющих наибольший уровень агрессивности. При отсутствии возможности полевых

испытаний, рекомендовано использовать предложенный лабораторный метод. При этом необходимо проводить ежегодный мониторинг агрессивности популяций *P. infestans* в основных картофелеводческих регионах Российской Федерации.

9. Выявлено отсутствие корреляционной зависимости между показателями агрессивности и типом спаривания, гаплотипами митохондриальной ДНК и спектром изоферментов *P. infestans*. Сделано предположение о независимости локусов, определяющих эти показатели.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Кравцов А.С., Еланский С.Н. Гаплотипы митохондриальной ДНК российских штаммов фитопатогенного оомицета *Phytophthora infestans*// V всероссийский популяционный семинар «Популяция, сообщество, эволюция», ч.1, Казань, 2001, с. 116-119.
2. Смирнов А. Н., Кравцов А. С., Кузнецов С. А., Апрышко В.П., Еланский С. Н. Распространение и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской области. // Материалы научно-практической конференции «Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы», М.2001, С. 313-324.
3. Смирнов А. Н., Кравцов А. С., Кузнецов С. А., Апрышко В.П., Еланский С. Н. Встречаемость и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской области в 1999 году // Материалы научной конференции «Памяти Грегора Менделя». М. 2001. С. 122-123.
4. Смирнов А. П., Кравцов А. С., Кузнецов С. А., Апрышко В. П., Побединская М. А., Еланский С. Н. Происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в пораженных фитоптозом образцах в Подмоскowie // Сборник материалов международного симпозиума «Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов европы». Пенза. 2001. С. 135-137.
5. Еланский С. Н., Смирнов А. Н., Кравцов А. С., Апрышко В.П., Дьяков Ю. Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области. // Тезисы докладов первого съезда микологов «Современная микология в России». М. 2002. С. 179.
6. Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Кравцов А.С., Дьяков Ю.Т., Козловская И.Н., Козловский Б.Е., Морозова Е.В., Аमतханова Ф.Х. Популяции *Phytophthora infestans* в Европейской части России // Сборник научных материалов первой всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям. Санкт-Петербург 2002, с. 81-82.
7. Филиппов А.В., Кузнецова М.А., Спиглазова С.Ю., Сметанина Т.И., Кравцов А.С., Смирнов А.Н. Сравнение изолятов *Phytophthora infestans* из различных регионов по агрессивности к картофелю. // Сборник научных материалов первой всероссийской конференции по иммунитету растений к болезням и вредителям. Санкт-Петербург 2002, с. 125-126.