

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет**

На правах рукописи



АПРЫШКО ВАЛЕНТИНА ПЕТРОВНА

**ОСПОРООБРАЗОВАНИЕ В ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЯХ
*PHYTOPHTHORA INFESTANS (MONT.) DE BARY***

Специальность 03.02.12 - микология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук
профессор Дьяков Юрий Таричанович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Терехова Вера Александровна
кандидат биологических наук
Деревягина Марина Константиновна

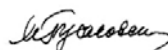
Ведущая организация: Татарский НИИ Сельского Хозяйства
Россельхозакадемии, г. Казань

Защита диссертации состоится 26 октября 2012 г. в 15.30 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический ф-т, тел./факс (495) 939-39-70.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «21» сентября 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.А. Гусаковская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Оомицет *Phytophthora infestans* является возбудителем широко распространенного заболевания растений – фитофтороза, которое представляет серьезную опасность для картофеля и томата. Потери урожая картофеля в России вследствие заболевания фитофторозом превышают 4 млн. тонн, что составляет более 10% урожая.

Борьба с фитофторозом затруднена из-за высокой вариабельности возбудителя, его легкой адаптации к выращиваемым сортам растений и появления устойчивых к фунгицидам штаммов. Появление генетически разнообразных штаммов патогена с высоким потенциалом адаптивности к условиям среды, отличающихся повышенной агрессивностью и способностью вызывать раннее наступление болезни, может быть обусловлено, в частности половой рекомбинацией. В результате полового процесса образуются ооспоры, способные выживать при неблагоприятных условиях и служить первичным инокулюмом при возобновлении эпифитотий.

Наиболее интенсивно ооспоры образуются при встрече мицелиев разного типа спаривания. Поэтому предпринятое нами изучение распределения штаммов с разными типами спаривания в популяциях разных регионов важно с точки зрения потенциальной возможности образования ооспор и гибридизации в пораженных фитофторозом образцах. Изучение встречаемости ооспор в разных органах растений, в образцах с одним и несколькими очагами болезни может позволить лучше понять основные закономерности ооспорообразования в российских популяциях и его взаимосвязь с интенсивностью развития болезни, растениями-хозяевами, распределением в популяции штаммов с разными типами спаривания.

Цель работы: изучение ооспорообразования в природных популяциях и роли полового процесса в жизненном цикле *P. infestans*. Для выполнения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи:**

1. Выделение изолятов *P. infestans* в чистую культуру и создание коллекции штаммов.

2. Изучение распределения изолятов *P. infestans* разных типов спаривания в разных органах картофеля и томата в разные периоды эпифитотии. Сравнительный анализ агрессивности изолятов разного типа спаривания.

3. Изучение ооспорообразования в различных органах картофеля и томата в природных популяциях *P. infestans*.

4. Изучение распространения самофертильных штаммов в полевых популяциях *P. infestans* и оценка образования ооспор в природных образцах картофеля и томата с одним очагом заболевания и с самофертильным мицелием *P. infestans*.

5. Проверка возможности образования гибридных ооспор штаммами *P. infestans* популяций Московской области *in vitro* и анализ гибридности их моноооспоровых потомков.

Научная новизна.

Впервые на большом фактическом материале исследовано наличие ооспор в пораженных фитофторозом органах картофеля и томата из разных регионов, с разным количеством очагов заболевания; проведено сравнение наличия ооспор в образце с типом спаривания выделенных из него штаммов; исследована зависимость присутствия образцов с ооспорами от распределения штаммов разного типа спаривания в популяции; разработан оригинальный метод получения моноооспоровых изолятов, отличающийся от аналогов меньшей трудоемкостью в применении и позволяющий исключить прорастание других структур мицелия, кроме ооспор.

Практическая значимость работы.

Возможность ооспорообразования и гибридизации в полевых популяциях обязательно следует учитывать при планировании защитных мероприятий. Поэтому предпринятое нами изучение присутствия ооспор в пораженных фитофторозом образцах картофеля и томата из разных регионов

и связь ооспорообразования с распределением штаммов разных типов спаривания в популяции имеет высокую практическую значимость.

Апробация работы.

Основные положения работы обсуждались на Научно-практической конференции "Научное обеспечение картофелеводства России: состояние, проблемы" (Москва, 2001), Международном симпозиуме "Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы" (Пенза, 2001), Международной научной конференции "Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах" (Минск, 2004), Втором съезде микологов России (Москва, 2008).

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, в том числе 1 в изданиях по перечню, рекомендованному ВАК РФ.

Объем и структура диссертации.

Работа изложена на 152 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и 25 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, содержащего 206 отечественных и зарубежных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

В обзоре литературы приведены сведения по систематике, биологии, вредоносности возбудителя фитофтороза, особенностях полового процесса и образования ооспор *P. infestans* в природе и *in vitro*. Приведен обзор работ по анализу некоторых маркеров, применяемых для популяционных исследований *P. infestans*.

Глава 2. Материалы и методы исследований

Сбор пораженных фитофторозом образцов проводили в 1999–2006 годах в различных районах России. С одного растения брали не более одного

образца, по возможности на поле выбирали растения, отстоящие друг от друга не менее чем на 10 м.

Выделение изолятов *P. infestans* производили в лабораторных условиях из пораженных фитофторозом органов растений (листьев, плодов, стеблей, клубней) с использованием метода влажных камер.

Определение типов спаривания проводили методом попарного культивирования исследуемого изолята с тестерными штаммами с известными типами спаривания (A1 либо A2) на агаризованной овсяной среде. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры только с тестером A2 типа спаривания и не образовывал их с A1, то его относили к типу совместимости A1. Если исследуемый штамм образовывал обильные ооспоры с A1 и не образовывал их с A2, то его относили к типу совместимости A2. В случае, если исследуемый штамм образовывал ооспоры с обоими тестерами, его учитывали как A1A2, если не образовывал ооспоры ни с одним тестером, то его считали стерильным (00).

Определение встречаемости ооспор в пораженных образцах. Пораженные фитофторозом листья и стебли обесцвечивали с использованием хлорсодержащих препаратов. Плоды и клубни разрезали, срезы с фитофторозными пятнами оставляли во влажных камерах до их сгнивания. Образцы микроскопировали.

Оценка образования ооспор *P. infestans* в монокультуре. Изоляты *P. infestans* инкубировали в монокультуре 2 месяца на агаризованной овсяной среде при комнатной температуре, затем микроскопировали. Штаммы, образовавшие ооспоры, считали самофертильными.

Оценку агрессивности изолятов *P. infestans* проводили на клубнях двух сортов картофеля с разным уровнем неспецифической устойчивости к фитофторозу: Луговской и Сантэ. Индекс агрессивности патогена вычисляли по формуле $X = \frac{\sum a_i \times b_i}{n}$, где X - индекс агрессивности; a_i - средняя величина поражения, мм; b_i - средняя интенсивность спороношения, балл; n -

количество заражений по методу, разработанному во ВНИИ Фитопатологии (Filipov et al, 2000).

Определение устойчивости к металаксилу проводили на овсяной агаризованной среде. Чувствительность изолятов оценивали по скорости радиального роста колонии на среде с фунгицидом металаксилем и без него. Чувствительность изолятов оценивали по скорости радиального роста колонии на среде, содержащей 10 мкг/мл фунгицида, и без него. Изолят считался чувствительным (S), слабоустойчивым (SR) или устойчивым (R), если относительная скорость роста его колонии на среде с фунгицидом в сравнении со средой без фунгицида была менее 0,1; от 0,1 до 0,4 или более 0,4, соответственно. При этом устойчивые штаммы должны были расти на среде с концентрацией действующего вещества 100 мкг/мл. Для каждого изолята тест повторяли трижды.

Получение ооспор *P. infestans* проводили путем попарного скрещивания изолятов, различающихся по типу спаривания и по изоферментам локуса 2 пептидазы, на агаризованной овсяной среде с добавлением лецитина. Пары культивировали 14–30 суток при 18°C в темноте, в другом варианте в темноте 15 суток, затем 30 суток под голубым флюоресцентным светом лампы «Black light fluorescent F20T12/BLB», Philips. Для созревания ооспор культуры выдерживали 2–4 недели при 4°C. Затем из чашек вырезали содержащие ооспоры агаровые блоки и гомогенизировали их. Суспензию фильтровали через нейлоновое сито, центрифугировали, супернатант отделяли.

Анализ жизнеспособности ооспор *P. infestans* проводили по методу окрашивания метилтиазолилдифенил-тетразолиума бромидом (МТТ) (Medina, Platt, 1999).

Получение моноооспоровых потомков *P. infestans*. Предварительно сравнили несколько методов стимуляции прорастания ооспор и уничтожения вегетативных структур *P. infestans*, описанных в литературе (Turkensteen et al., 2000, Rastas et al., 2006, Аникина, 1994; Багирова, Дьяков, 1998) и

разработанных нами. Наилучшие результаты показал разработанный нами метод, заключающийся в обработке ооспор коммерческой смесью ферментов, обладающих α -глюканолитической, целлюлозолитической, протеолитической и хитинолитической активностью, Lising Enzymes from *Trichoderma harzianum*, Novozyme Corp., Sigma #L1412. В концентрации 1,7% в течение 12 часов раствор Lising Enzymes уничтожал все вегетативные структуры *P. infestans*. Все анализируемые в нашей работе потомки получены с использованием данного метода.

Проращивание ооспор. Обработанную вышеуказанным методом суспензию ооспор распределяли с помощью шпателя по поверхности тонкого слоя голодного агар-агара. Ооспоры инкубировали 14-30 дней при 15°C под голубым флюоресцентным светом с фотопериодом 16 часов. Чашки просматривали через каждые 24 часа под микроскопом. Вырезали агаровые блочки с одной проросшей ооспорой, помещали на агаризованную овсяную среду, культивировали при 18°C в темноте.

Спектр изоферментов определяли методом электрофореза на целлюлозоацетатных гелях согласно рекомендации производителя Helena Laboratories Inc. (Hebert, Beaton, 1993) с небольшими модификациями (Elansky, Smirnov, 2003).

Статистическую обработку данных проводили при помощи электронных пакетов программы Excel.

Глава 3. Результаты и обсуждение

Встречаемость изолятов *P. infestans* с типами спаривания A1 и A2

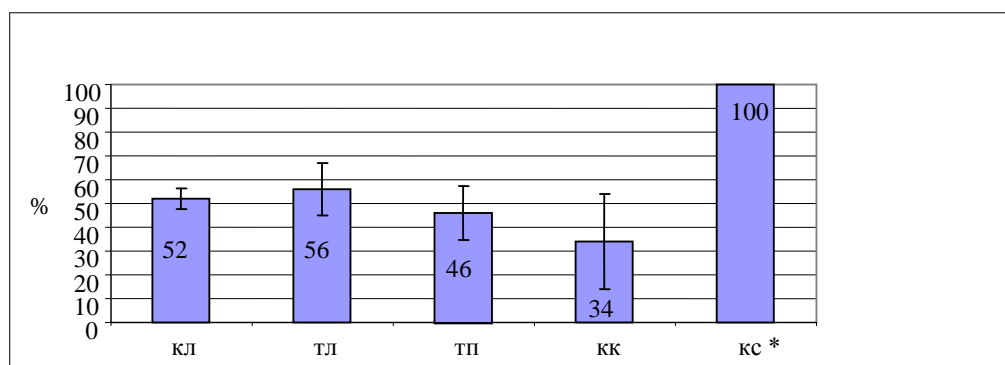
Тип спаривания определяли у изолятов, собранных в течение восьми лет. Всего протестировано 2000 изолятов, из них: Московская область - 1638 (из картофеля и томата), прочие регионы – 362.

Большинство протестированных полевых популяций *P. infestans* Московской области представлены изолятами обоих типов спаривания. В среднем за период измерений соотношение типов спаривания A1 и A2 составило 52% и 48%, соответственно. Изоляты, образующие ооспоры с

тестерами обоих типов спаривания (далее А1А2), встречались редко и в картофельных, и в томатных популяциях. В группе изолятов *P. infestans* Московской области, выделенных из картофеля, все типы спаривания присутствовали приблизительно в равном соотношении: $A1 : A2 : A1A2 = 1 : 1,08 : 0,01$, а на томате А1 тип спаривания слегка преобладал над А2 – $A1 : A2 : A1A2 = 1 : 0,68 : 0,006$.

Разница встречаемости изолятов *P. infestans* А2 типа спаривания на картофеле и томате была статистически значима (коэффициент Стьюдента, $t = 3,9$, $t_{0,05;v263} = 1,97$).

Изучение типа спаривания изолятов *P. infestans*, выделенных из разных органов картофеля и томата (листья, стебли, плоды и клубни). На участках, удаленных от прочих посадок картофеля и томата, были заложены в непосредственной близости друг от друга делянки картофеля сорта *Синеглазка* и томата сорта *Талалихин – 186*. Органотропной специализации у изолятов *P. infestans* разных типов спаривания не было выявлено. В целом по Московской области встречаемость изолятов *P. infestans* А2 типа спаривания была спаривания была приблизительно одинакова в группах изолятов, выделенных с листьев картофеля и томата, плодов томата и клубней картофеля. Выявленные различия в долях изолятов А2 типа спаривания были статистически недостоверны (Рис. 1).



Сокращения в рисунке: кл – листья картофеля, тл – листья томата, тп – плоды томата, кк – клубни картофеля, кс – стебли картофеля.

* Для данных по типу спаривания изолятов *P. infestans*, выделенных из стеблей картофеля, стандартная ошибка не вычислялась, так как эта группа представлена всего одной популяцией.

Рисунок 1.

*Встречаемость изолятов *P. infestans* А2 типа спаривания на органах картофеля и томата за 1999 - 2006 гг, Московская обл.*

Тип спаривания изолятов *P. infestans*, собранных в разные периоды эпифитотии. На тестовых участках постоянного мониторинга (Московская обл.) сбор пораженных образцов проводили несколько раз за сезон. На всех участках в течение эпифитотии отмечены значительные изменения доли изолятов *P. infestans* A2 типа спаривания, что выразилось как в увеличении доли изолятов с типом спаривания A2 на одних делянках, так и в ее уменьшении на других (рис. 2). В большинстве популяций присутствуют изоляты обоих типов спаривания. Полученные данные свидетельствуют о возможности полового процесса *P. infestans* в течение длительного периода эпифитотии. Значимых изменений в распределении типов спаривания в течение болезни не выявлено.

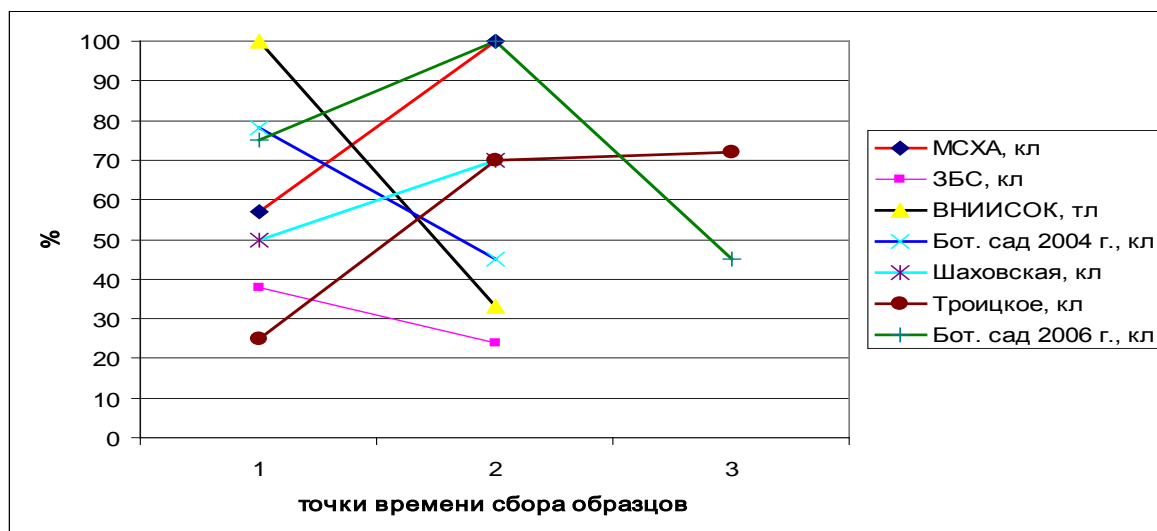


Рисунок 2

*Динамика частоты встречаемости изолятов *P. infestans* A2 типа спаривания в течение эпифитотии*

Для изучения годовой динамики соотношений типов спаривания в полевых популяциях *P. infestans* Московской обл. усреднены данные по всем обследованным популяциям за соответствующий год.

Во всех группах изолятов выявлено присутствие обоих типов спаривания. Различия в доле изолятов A2 типа спаривания в разные годы выявлены только между группами изолятов, выделенных из органов картофеля. В томатных популяциях различий не выявлено (Рис. 3).

При сравнении встречаемости изолятов *P. infestans* A2 типа спаривания на картофеле и томате значимых различий не обнаружено (коэффициент Стьюдента, $t < 1,9$, $\min t_{0,05;v45} = 2,01$). При сравнении данных за отдельные годы статистически достоверных отличий также не обнаружено (рис. 3).

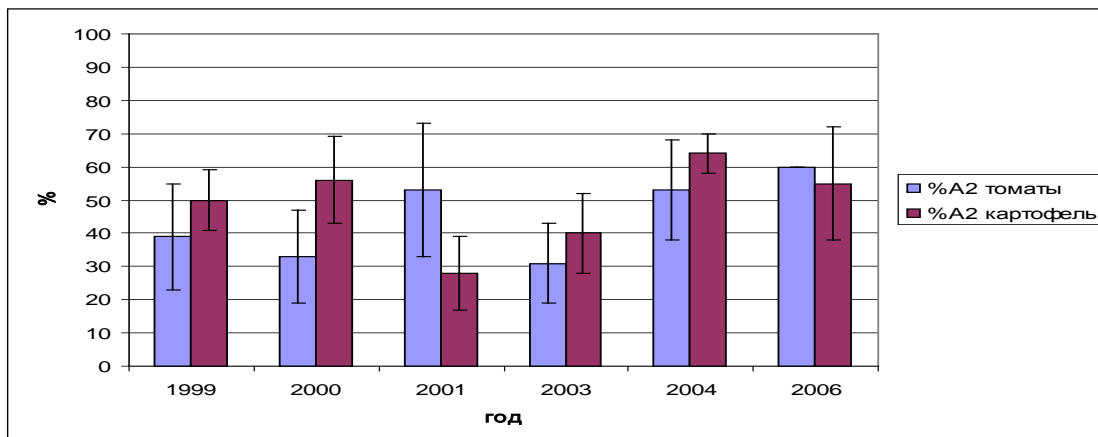


Рисунок 3

Доли штаммов с типом спаривания A2 на картофеле и томате

Встречаемость A2 типа спаривания в группах изолятов *P. infestans*, выделенных из томата, колеблется по годам от 31% до 60%, однако эти различия статистически не достоверны из-за высокой вариабельности в отдельных полевых популяциях (рис. 3).

Сравнение паразитических свойств изолятов, имеющих тип спаривания A1 и A2 проведено на 46 изолятах *P. infestans*, выделенных из листьев картофеля в 6 удаленных точках Московской области в 2004 г. Различий по степени агрессивности между изолятами разных типов спаривания с обоих сортов картофеля не выявлено (табл. 1).

Таблица 1

Результаты анализа агрессивности изолятов A2 и A1 типа спаривания

Тип спаривания	Количество протестированных изолятов	Индекс агрессивности, Сантэ*	Индекс агрессивности, Луговской**
A1	21	47,57	20,79
A2	25	46,95	22,16

*Среднее по всем изолятам из популяции, протестированным на ломтиках картофеля сорта Сантэ

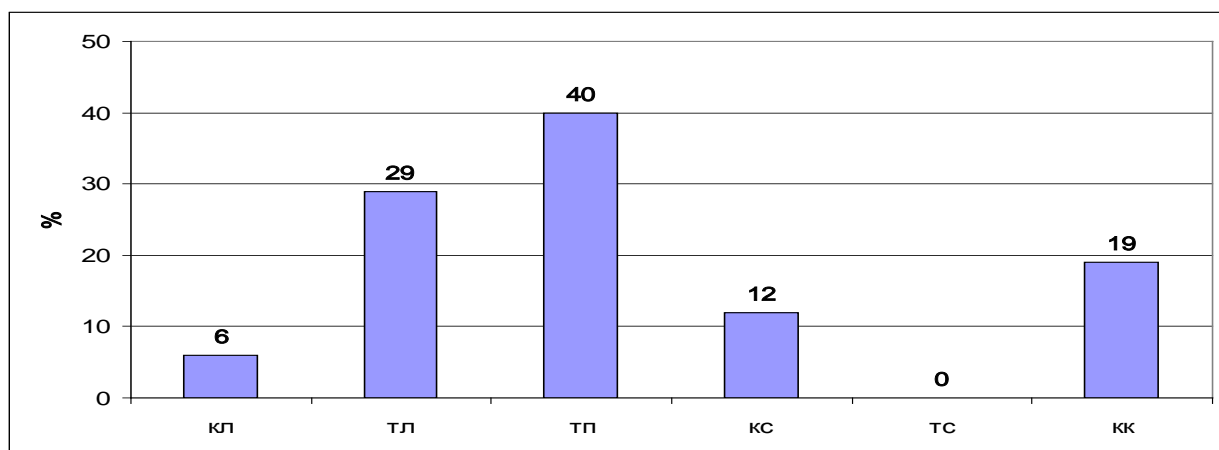
** Среднее по всем изолятам из популяции протестированным на ломтиках картофеля сорта Луговской

Изучение ооспорообразования в природных популяциях *P. infestans*

Результаты мониторинга ооспор в полевых популяциях P. infestans.

Для оценки встречаемости ооспор в природе в разных органах картофеля и томатов с мицелиями *P. infestans* разных типов спаривания и с различным числом фитофторозных пятен изучено присутствие ооспор в 1055 образцах органов картофеля и томата.

Ооспоры *P. infestans* обнаружены в образцах пораженных фитофторозом листьев картофеля и томата, стеблей картофеля, клубней картофеля и плодов томата в большинстве исследованных полевых популяций (рис. 4). Не найдено ооспор в стеблях томата, возможно, в связи с малым числом исследованных образцов. В листьях и плодах томата ооспоры встречались значительно чаще, чем в остальных исследованных группах образцов. Различий в частоте встречаемости ооспор в разных органах картофеля не обнаружено (табл. 2).



Сокращения в рисунке: кл – листья картофеля, тл – листья томата, тп – плоды томата, тс – стебли томата, кк – клубни картофеля.

Рисунок 4

Частоты (%) встречаемости ооспор P. infestans в органах картофеля и томата

Таблица 2

Достоверность различий между частотами встречаемости ооспор в разных органах картофеля и томата

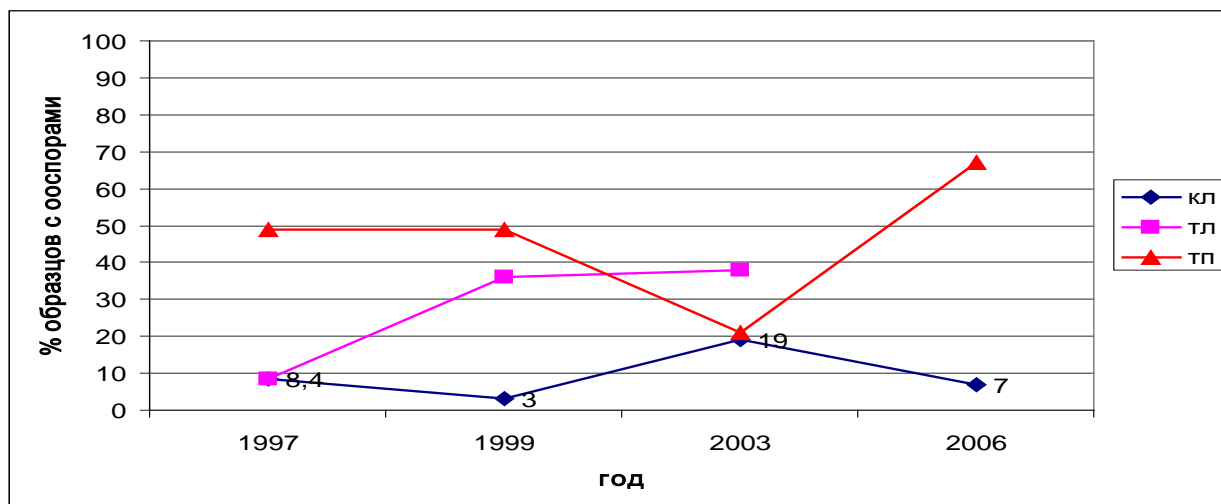
Сравниваемые группы образцов	Коэффициент Стьюдента, <i>t</i>	Критическое значение коэффициента Стьюдента
Картофель листья – томаты листья	5,8	$t_{0,05;v22} = 2,07$
Картофель листья – томаты плоды	8,0	$t_{0,05;v24} = 2,06$
Картофель листья – картофель клубни	1,4	$t_{0,05;v18} = 2,1$
Картофель листья – картофель стебли	0,78	$t_{0,05;v18} = 2,1$
Томаты листья – томаты плоды	2,06	$t_{0,05;v14} = 2,1$
Томаты листья – картофель клубни	1,08	$t_{0,05;v7} = 2,4$
Томаты листья – картофель стебли	2,3	$t_{0,05;v7} = 2,4$
Томаты плоды – картофель клубни	2,2	$t_{0,05;v9} = 2,2$
Томаты плоды – картофель стебли	3,7	$t_{0,05;v9} = 2,2$
Картофель клубни - картофель стебли	0,9	$t_{0,05;v3} = 3,2$
Картофель (листья+клубни+стебли) – томаты листья	3	$t_{0,05;v24} = 2,06$
Картофель (листья+клубни+стебли) – томаты плоды	4,9	$t_{0,05;v26} = 2,06$

Результаты показывают, что в плодах томата ооспоры образуются чаще всего. Возможно, разница в частотах встречаемости ооспор в картофеле и плодах томатов связана с различным содержанием в них β -ситостерола (в плодах томата β -ситостерола содержится примерно в пять раз больше, чем в листьях картофеля), который *P. infestans* не способен самостоятельно синтезировать и от которого зависят процессы ее бесполого и полового размножения (Marshall et al., 2001).

За время исследований выявлена заметная межгодовая динамика встречаемости образцов с ооспорами (рис. 5).

Общие закономерности годового тренда встречаемости ооспор, отмеченные нами суммарно для всех популяций Московской области,

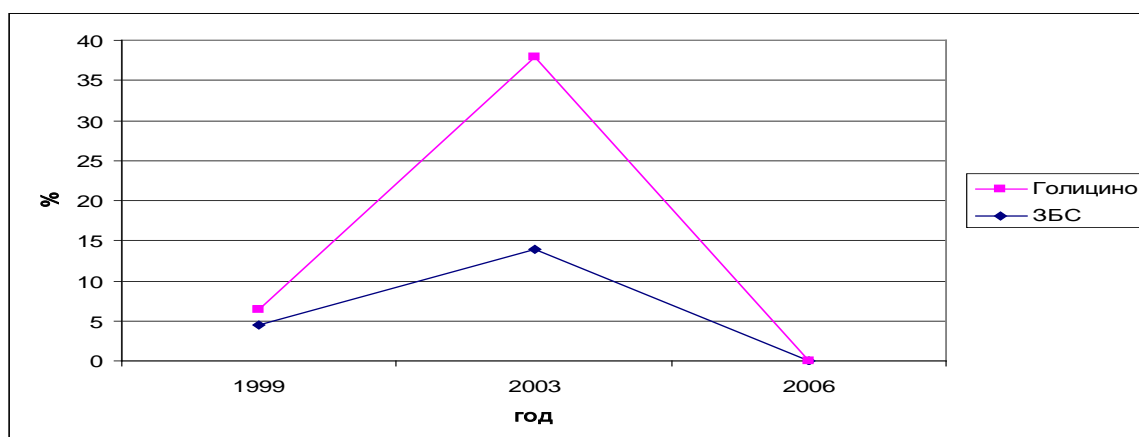
сохраняются и для отдельных популяций. Данные по встречаемости образцов с ооспорами на картофеле для двух популяций из Одинцовского района приведены на рис. 6. К сожалению, оценить динамику встречаемости ооспор внутри одной природной популяции томата не представилось возможным за недостаточностью данных.



Сокращения в рисунке: КЛ – литья картофеля, ТЛ – листья томата, ТП – плоды томата.

Рисунок 5

Годовая динамика встречаемости ооспор в органах картофеля и томата 1997, 1999, 2003, 2006 годов



Сокращения в рисунке: Голицыно – Одинцовский р-н МО, пос. Голицыно, ЗБС - Одинцовский р-н МО, ЗБС.

Рисунок 6

Годовая динамика встречаемости ооспор в листьях картофеля внутри одной популяции

Многие исследователи отмечают влияние температуры и уровня влажности окружающей среды на образование ооспор *P. infestans*. В листьях картофеля в природных условиях ооспоры *P. infestans* образуются при температуре 5-25°C (оптимум 8-10°C) и влажности более 80%. Можно предположить, что межгодовые различия во встречаемости ооспор в органах картофеля и томата связаны с погодными условиями в Московской области. Сборы образцов органов картофеля и томата проводились в августе и в меньшем объеме в сентябре. Отмечается связь между количеством осадков, средней минимальной температурой и встречаемостью образцов листьев картофеля с ооспорами. Наиболее приближенными к идеальным условиям для образования ооспор были погодные условия 2003 года (табл. 3, рис. 6).

Таблица 3

Средняя температура воздуха, °С и среднее количество осадков, мм в Москве

(http://meteo.infospace.ru/win/wcarch/html/r_sel_stn.sht?adm=596)

Год	% образцов с ооспорами, КЛ	Август				Сентябрь			
		Мин. темп. °С	Макс. темп. °С	Средн. темп. °С	Осадки, мм	Мин. темп. °С	Макс. темп. °С	Средн. темп. °С	Осад ки, мм
1997	8,4	6,7	28,4	17,1	62	-3	21	8,5	54
1999	3	6,1	27,5	16,4	86	1,6	25,6	7,4	48
2003	20	8,6	29,6	16,9	145	1	23	11,3	100
2006	7	7,2	27,4	17,5	129	2,1	22,8	13,3	60

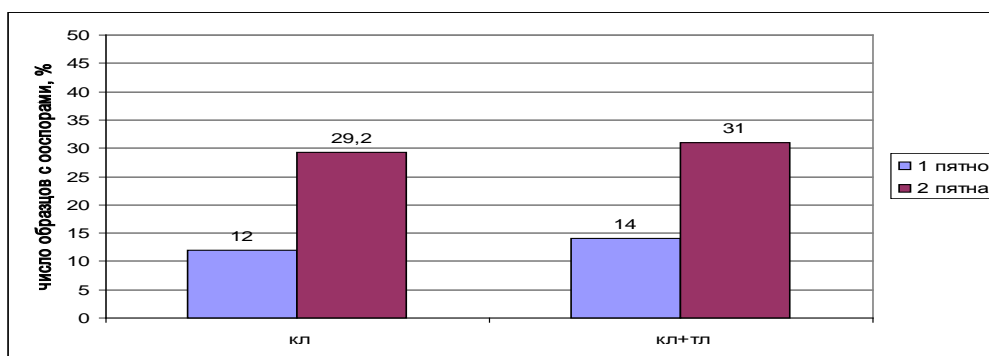
Особое внимание уделялось исследованию ооспорообразования в образцах с одним фитофторозным очагом. Перед исследованием материала на наличие ооспор из образцов выделяли изоляты *P. infestans* и определяли тип спаривания.

Ооспоры в образцах с одним очагом фитофтороза встречались как в тех полевых популяциях, в которых были выявлены изоляты только одного типа спаривания, так и в тех, из которых были выделены изоляты обоих типов спаривания в сравнимых соотношениях.

Проведено сравнение присутствия ооспор в образцах с одним очагом заболевания и типом спаривания штамма, выделенного из этого очага. Преимуществ в образовании ооспор мицелием какого-либо типа спаривания не обнаружено.

Для популяций *P. infestans* на листьях картофеля не удалось выявить корреляции между частотой встречаемости образцов с ооспорами и долей А2 типа спаривания (коэффициент корреляции $0,117 \pm 0,009$), обнаружена отрицательная корреляция между долей А2 типа спаривания и частотой встречаемости листьев томата с ооспорами (коэффициент корреляции $-0,5712 \pm 0,15$), а в популяциях на плодах томата эта корреляция существовала (коэффициент корреляции $0,720347 \pm 0,04$).

Встречаемость ооспор в образцах листьев картофеля и томата с разным числом очагов фитофтороза. Исследовано присутствие ооспор в собранных в 2003 году образцах с несколькими очагами фитофтороза на одной листовой пластинке. Показано, что образцы листьев картофеля с двумя и более пятнами значительно чаще содержат ооспоры, чем образцы с одним пятном (рис. 7), данные статистически достоверны ($t = 2,32$; $t_{0,95;60} = 2,0$). Это свидетельствует в пользу того, что при интенсивном развитии фитофтороза значительная часть ооспор может иметь гибридную природу.



Сокращения в рисунке: кп – листья картофеля, тл – листья томата, 1 пятно – образцы с одним фитофторозным пятном, 2 пятна – образцы с множественными фитофторозными пятнами.

Рисунок 7

Встречаемость ооспор в листьях картофеля и томатов с различным числом очагов фитофтороза

На результаты анализа встречаемости ооспор в органах картофеля и томата может влиять методика выполнения анализа. Так, при микроскопировании образцов плодов томата выявлен факт очагового образования ооспор. Следственно, даже при анализе встречаемости ооспор в большом количестве полей зрения можно получить недостоверную информацию.

При изучении особенностей развития *P. infestans* на листьях картофеля установлено, что на образование ооспор может влиять влажность, положение листа растения-хозяина над землей, контакт листа с почвой и водой, сорт растения-хозяина (Колесар, 2008; Cohen et al., 1997; Cohen et al., 1999; Cohen et al., 2000). Также может влиять дата сбора образцов, т.к. при более длительном культивировании *P. infestans* образуется больше ооспор. Учитывая эти факторы, требуется разработка унифицированного метода оценки встречаемости ооспор *P. infestans* в природе.

Распространение самофертильных штаммов в полевых популяциях P. infestans и образование ооспор в природных образцах картофеля и томата с самофертильным мицелием P. infestans проанализированы на 846 изолятах из различных органов картофеля и томата, собранных в разных районах Подмосковья.

Ооспоры образовывались в монокультурах изолятов *P. infestans*, выделенных из большинства изученных популяций Московской области. Преимущества образования ооспор в монокультуре изолятами, выделенными из органов картофеля или томата, не выявлено.

Не обнаружено разницы образования ооспор в монокультуре изолятами, выделенными из плодов и листьев томата.

Самофертильность отмечена у штаммов из всех трех групп типов спаривания. Самофертильными были все изоляты, принадлежащие к группе A1A2; штаммы с типом спаривания A2 были способны образовывать ооспоры в монокультуре чаще, чем штаммы с типом спаривания A1 (табл. 4).

Таблица 4

Доли штаммов, определенных как A1, A2 и A1A2 в пробах с тестерами, образовавших ооспоры в монокультуре

Год	Тип спаривания		
	A1	A2	A1A2
2003	9	56	100
2004	27	39	-
2006	4	9	-

Интересно, что в этих условиях самофертильными оказались преимущественно штаммы с мицелиями A2 типа спаривания. Максимальное число самофертильных изолятов отмечалось в тех популяциях, где преобладали штаммы с типом спаривания A2 (табл. 5). Известно, что изоляты *P. parasitica*, *P. cinnamomi*, *P. palmivora* A2 типа спаривания способны образовывать ооспоры в монокультуре, при том, что изоляты данных видов A1 типа спаривания не образовывали ооспоры в монокультуре. Нами отмечена слабая связь между выборками % самофертильных штаммов в популяции и % штаммов с типом спаривания A2, (коэфф. корреляции = $0,463 \pm 0,041$) и между выборками % самофертильных штаммов в популяции и % штаммов с типом спаривания A1A2, (коэфф. корреляции = $0,345 \pm 0,023$).

Таблица 5

Распределение штаммов разного типа спаривания 2003, 2004 и 2006 годов

Год	Проба с тестерами			Образовали ооспоры в монокультуре (%)
	%A1	%A2	%A1A2	
2003	53	43	4	27
2004	38	62	0	34
2006	45	55	0	11

Для оценки эпидемиологического значения самофертильных штаммов изучали образование ооспор самофертильными изолятами из природных образцов с одним фитофторозным пятном. Показано, что связь между

самофертильностью и ооспорообразованием в природных условиях практически отсутствует. Достоверной корреляции между выборками во встречаемости самофертильных штаммов в популяции и образцов с ооспорами не выявлено (коэфф. корреляции = $0,023 \pm 0,0001$).

Скрещивание изолятов *P. infestans*, выделенных из тканей картофеля и томата, in vitro и анализ их монооспоровых потомков.

Присутствие штаммов *P. infestans* обоих типов спаривания делает возможным протекание полового процесса в природных условиях Московской области, в результате чего образуются гибридные ооспоры. Однако присутствие обоих типов спаривания не всегда приводит к половой рекомбинации. Так, в Японии и Бразилии встречаются оба типа спаривания, но в этих странах обнаружены только клональные популяции *P. infestans*.

Исследована возможность образования гибридных ооспор штаммами *P. infestans* из природных популяций Московской области, оценена продуктивность образования и жизнеспособность ооспор, изучены маркерные фенотипические признаки монооспоровых потомков отобранных пар штаммов *P. infestans*.

Получение монооспоровых изолятов *P. infestans*. Для скрещивания были отобраны 9 штаммов *P. infestans* с известными характеристиками (тип спаривания, устойчивость к фунгициду металаксилу, спектр изоферментов второго локуса пептидазы) из коллекции кафедры микологии и альгологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и нашей коллекции (табл. 6), из которых были составлены 8 пар.

Родительские штаммы в каждой паре различались по типу спаривания и спектру изоферментов второго локуса пептидазы. Изоферментные маркеры обычно не зависимы от внешних условий, показывают менделевское наследование и являются кодоминантными, позволяя различать гомо- и гетерозиготы.

Характеристика штаммов, использовавшихся для скрещивания

<i>Штамм</i>	<i>Дата выделения, год</i>	<i>Орган растения хозяина</i>	<i>Устойчивость к металаксилу</i>	<i>Тип спаривания</i>	<i>Изоферменты локуса 1 пептидазы</i>	<i>Изоферменты локуса 2 пептидазы</i>
7СК49	1997	лист картофеля	R	A1	100/100	100/100
3МОБТС1	2003	стебель томата	S	A2	100/100	112/112
6МОБТП16	1996	плод томата	SR	A1	100/100	100/100
06МШаТП1	2006	Плод томата	S	A1	100/100	112/112
06МШаТП5	2006	Плод томата	SR	A2	100/100	100/100
06МШаТП2	2006	Плод томата	S	A1	92/100	112/112
06МШаТП4	2006	Плод томата	S	A2	100/100	100/100
06МЗКЛ22*/1	2006	Лист картофеля	S	A2	100/100	100/100
06МБКС366	2006	Лист картофеля	SR	A2	100/100	100/100

Из этих штаммов были составлены родительские пары:

7СК49 x 3МОБТС1, 3МОБТС1 x 6МОБТП16, 06МШаТП1 x 06МШаТП5, 06МШаТП2 x 06МШаТП4, 06МШаТП1 x 06МЗКЛ22*/1, 06МШаТП1 x 06МБКС366, 6МШаТП2 x 06МЗКЛ22*/1, 06МШаТП2 x 06МБКС366

Всего проведено по 200 скрещиваний каждой пары. Все изоляты росли хорошо и формировали ооспоры. Отобранные пары штаммов при скрещивании образовывали разное число ооспор - от 324 до 925 на мм² (среднее на 200 скрещиваний). Пары изолятов, выделенных из томата, образовывали больше ооспор, чем выделенных из разных растений. Жизнеспособность полученных ооспор существенно различалась между парами штаммов. У смешанных пар (штамм *P. infestans*, выделенный из картофеля, x штамм *P. infestans*, выделенный из томата) процент жизнеспособных ооспор был ниже, чем у пар штаммов, выделенных из томата (табл. 7).

Обнаружена связь между интенсивностью образования ооспор и их жизнеспособностью (до стимуляции прорастания). Процент жизнеспособных ооспор был ниже у тех пар, которые образовывали меньшее количество ооспор (табл. 7). Это наблюдение может свидетельствовать о половой несовместимости штаммов *P. infestans* или присутствии каких-либо факторов, приводящих к образованию недоразвитых или нежизнеспособных ооспор.

Таблица 7

Продуктивность формирования ооспор и оценка жизнеспособности ооспор до и после обработки раствором Lising Enzymes

<i>Исследуемая пара</i>	<i>Количество ооспор на 1 мм² (среднее на 200 скрещиваний)</i>	<i>% жизнеспособных ооспор до обработки</i>	<i>% жизнеспособных ооспор после обработки</i>
3МОБТС1 x 7СК49	556	13	5
3МОБТС1 x 6МОБТП16	324	9	3
06МШаТП1 x 06МШаТП5	847	20	20
06МШаТП2 x 06МШаТП4	926	71	71
06МШаТП1 x 06МЗКЛ22*/1	428	18	7
06МШаТП1 x 06МБКС366	533	17	13
06МШаТП2 x 06МЗКЛ22*/1	489	14	10
06МШаТП2 x 06МБКС366	358	15	4

После обработки ооспор раствором ферментов оценивали их жизнеспособность. Процент жизнеспособных ооспор снижался во всех парах, кроме одной, однако во всех парах сохранялись жизнеспособные ооспоры.

Процент проросших ооспор был очень низким во всех парах (в половине пар он был нулевым). Ооспоры, образовавшиеся в результате скрещивания томатных штаммов, прорастали гораздо чаще. Однако ни одного потомка от этих ооспор не было получено, при переносе проросших ооспор на овсяный агар-агар роста мицелия не было (табл. 8).

Результаты проращивания ооспор *P. infestans* *in vitro*

<i>Родительская пара</i>	<i>Число исследованных ооспор</i>	<i>Число и доля (в процентах) проросших ооспор</i>	<i>Число и доля (в процентах) полученных потомков</i>
3МОБТС1 x 6МОБТП16	400	2 (0,5%)	1 (0,25%)
3МОБТС1 x 7СК49	584	7 (1,2%)	4 (0,7%)
06МШаТП1 x 06МШаТП5	601	18 (3%)	0
06МШаТП2 x 06МШаТП4	658	31 (5%)	0
06МШаТП1 x 06МЗКЛ22*/1	452	0	0
06МШаТП1 x 06МБКС366	412	0	0
06МШаТП2 x 06МЗКЛ22*/1	508	0	0
06МШаТП2 x 06МБКС366	258	0	0

Анализ моноооспоровых потомков *P. infestans*. В результате скрещивания отобранных пар штаммов *P. infestans* получено только пять моноооспоровых потомков. Все потомки получены от штаммов, выделенных из разных органов растений.

У полученных потомков было обнаружено разделение по всем исследованным маркерным фенотипическим признакам (тип спаривания, устойчивость к фунгициду металаксилу, спектр изоферментов второго локуса пептидазы) (табл 9).

Результаты анализа моноооспоровых потомков

<i>Родительская пара</i>	<i>Тип спаривания</i>	<i>Устойчивость к металаксилу</i>	<i>Изоферменты локуса 2 пептидазы</i>
3МОБТС1 x 6МОБТП16	A1	S	100/112
3МОБТС1 x 7СК49	A2	S	100/112
3МОБТС1 x 7СК49	A2	SR	112/112
3МОБТС1 x 7СК49	A2	S	112/112

К сожалению, полученных данных недостаточно для исследования распределения частот данных признаков. Однако тот факт, что у двух потомков обнаружена гетерозигота 100/112, может свидетельствовать об их гибридном происхождении. Хотя в наших экспериментах процент

прорастания ооспор был низким, в естественных условиях он может быть гораздо выше.

В результате работы получены данные, свидетельствующие как о возможности протекания полового размножения в подмосковных популяциях *P. infestans* с образованием гибридных ооспор, что может повышать генетическое разнообразие популяции, так и об образовании ооспор самофертильными изолятами *P. infestans* в подмосковных популяциях, что может служить механизмом выживания при неблагоприятных условиях и механизмом распространения патогена без участия полового размножения.

ВЫВОДЫ

1. Большинство популяций *P. infestans* представлено изолятами обоих типов спаривания. Соотношение изолятов А1 и А2 типов спаривания в различных регионах и даже популяциях не постоянно и подвержено колебаниям; отмечается сезонная динамика распределения типов спаривания. Изоляты А1А2 типа спаривания встречаются редко как среди картофельных, так и томатных популяций.

2. Различий в агрессивности между исследованными изолятами с типами спаривания А1 и А2 не выявлено.

3. Ооспоры *P. infestans* обнаружены в листьях картофеля и томата, стеблях картофеля, плодах томата в полевых популяциях *P. infestans* Московской области. В органах томата ооспоры встречались чаще, чем в органах картофеля, в плодах томата ооспоры встречались чаще, чем в листьях.

4. Изучение образцов с одним очагом фитофтороза показало, что преимущества в образовании ооспор мицелием какого-либо типа спаривания не обнаружено. В образцах листьев картофеля и томата с несколькими очагами фитофтороза ооспоры встречались чаще, чем в образцах листьев с одним фитофторозным пятном, что может свидетельствовать об их гибридном происхождении.

5. В популяциях *P. infestans* Московской области обнаружены самофертильные изоляты, способные образовывать ооспоры в монокультуре. Не обнаружено связи между встречаемостью ооспор *P. infestans* в монокультуре штаммов *P. infestans* и встречаемостью ооспор в природных образцах органов картофеля и томата, из которых были выделены эти штаммы.

6. Оработан метод получения монооспоровых потомков *P. infestans*. По результатам наших экспериментов, для прорастания ооспор требуется стимуляция, без обработки ферментами ооспоры не прорастали. У двух потомков обнаружена гетерозигота 100/112 по изоферментам локуса 2 пептидазы, что свидетельствует об их гибридном происхождении.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных положений по теме диссертации

1. Еланский С.Н., **Апрышко В.П.**, Милютин Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к фунгицидам металаксил и диметоморф // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2007. – № 1. – С. 14-18.

Прочие статьи

2. Уланова Т.И., Еланский С.Н., Филиппов А.В., Козловский Б.Е., Дьяков Ю.Т., **Апрышко В.П.**, Смирнов А.Н., Коффей М.Д. Устойчивость к фитофторозу некоторых перспективных линий диких *Lycopersicon hirsutum* // Журнал Российского фитопатологического общества, 2003, 4, с. 9-15.
3. Elansky S.N., Dyakov Yu.T., Milyutina D.I., **Apryshko V.P.**, Pobedinskaya M.A., Filippov A.V., Kozlovsky B.E., Kuznetsova M.A., Rogozhin A.N., Statsyuk N.V. Late blight of potato in Russia // Potato production and innovative technologies. Ed. A.J. Havenkort, B.V. Anisimov, Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. – 2007. – P. 262-274.

Материалы конференций, тезисы

4. Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., Кравцов А.С., **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", Москва, 2001. – С. 313-324.
5. Смирнов А.Н., Кравцов А.С., Кузнецов С.А., **Апрышко В.П.**, Еланский С.Н. Встречаемость и возможное происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в Московской обл. в 1999 г. // Материалы научной конференции "Памяти Грегора Менделя", Москва, изд. МСХА, 2001. – С. 122-123.
6. Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., Кравцов А.С., **Апрышко В.П.**, Побединская М.А., Еланский С.Н. Происхождение ооспор *Phytophthora infestans* в пораженных фитофторозом образцах в Подмоскowie // Международный симпозиум "Проблемы изучения и охраны биоразнообразия и природных ландшафтов Европы" Сборник материалов. Пенза, 2001, с. 135.
7. Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Кравцов А.С., **Апрышко В.П.**, Дьяков Ю.Т. Популяции *Phytophthora infestans* в Московской области // Современная микология в России. Тезисы докладов первого съезда микологов, Москва, 2002. – С. 179.
8. Еланский С.Н., Смирнов А.Н., Кузнецов С.А., **Апрышко В.П.**, Дьяков Ю.Т. Возможные причины изменения структуры популяций *Phytophthora infestans* в европейской части России на рубеже 20-21 веков // Материалы международной научной конференции "Биология, систематика и экология грибов в природных экосистемах и агрофитоценозах", Минск, 2004. – С. 96-100.
9. **Апрышко В.П.**, Петрунина Я.В., Побединская М.А., Еланский С.Н. Ооспоры *Phytophthora infestans* в природных очагах фитофтороза в Московской области в 2003 у // Сб. материалов юбилейной конференции Микология и альгология 2004, М., Прометей, 2004. – С. 21-22.

10. Еланский С.Н., **Апрышко В.П.** Самофертильные штаммы *Phytophthora infestans* в природных популяциях // Труды конференции "Грибы в природных и антропогенных экосистемах", С. Петербург, 2005. – С. 186-189.
11. Еланский С.Н., **Апрышко В.П.**, Милютина Д.И., Козловский Б.Е. Устойчивость российских штаммов *Phytophthora infestans* к фунгицидам Металаксил и Диметоморф // Материалы конференции "Грибы и водоросли в биоценозах", М., 2006. – С. 56–58.
12. Милютина Д.И., Шеин С.А., **Апрышко В.П.**, Еланский С.Н. Популяции *Phytophthora infestans* в республике Марий Эл // Современная микология в России. Том 2. Тезисы докладов второго съезда микологов, М., 2008. – С. 193-194.

Автор работы выражает глубокую благодарность научному руководителю д. б. н. профессору Дьякову Ю. Т. и ведущему научному сотруднику каф. микологии и альгологии к. б. н. Еланскому С. Н. за неоценимую помощь при выполнении и написании работы, д. б. н. профессору Смирнову А. Н. и младшему научному сотруднику каф. микологии и альгологии Побединской М. А. за консультации и помощь в совместных исследованиях; сотрудникам каф. микологии и альгологии к. б. н. Инсаровой И. Д., к. б. н. Гололобовой М. А., к. б. н. Благовещенской Е. Ю., к. б. н. Ворониной Е. Ю. за ценные советы при подготовке диссертационной работы, научному сотруднику каф. микробиологии Шестакову А. И. за техническую помощь в выполнении некоторых экспериментов.