

ГРИБЫ — ВОЗБУДИТЕЛИ БОЛЕЗНЕЙ РАСТЕНИЙ

УДК 632.4 : 582.281.14 : 632.934.1

© М. К. Деревягина, С. Н. Еланский, Ю. Т. Дьяков

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *PHYTOPHTHORA INFESTANS*
К ФУНГИЦИДУ ДИМЕТОМОРФУDEREVIAGINA M. K., ELANSKIY S. N., DIAKOV YU. T. RESISTANCE
OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS* TO THE DIMETHOMORPH FUNGICIDE

Диметоморф — новый фунгицид из группы морфолинов. Он обладает высокой токсичностью к оомицетам, системным действием (Cohen et al., 1995; Деревягина и др., 1986), отсутствием перекрестной резистентности к фениламидам (Kuhn et al., 1991). Попытки выделить резистентные клоны из природных популяций *Phytophthora infestans*, *P. cactorum* и *Plasmopara viticola* были безуспешными (Blankenagel, Semmer, 1990; Воробьева и др., 1992). В России диметоморф в чистом виде и в смеси с манкоцебом (акробат) используется в отдельных регионах для борьбы с фитофторозом картофеля и пероноспорозом лука (Голышин и др., 1992). Поэтому важно иметь сведения, каков риск появления резистентных к диметоморфу клонов *P. infestans* при расширении масштабов его применения.

В работе использованы лабораторные штаммы *P. infestans*, чувствительные и резистентные к металаксилу. Оценку чувствительности к диметоморфу проводили методом заражения листовых дисков (Staub, Sozzi, 1984) и методом заражения листьев в кюветах (Дьяков и др., 1988; Деревягина, Дьяков, 1992). Полевые испытания фунгицидов осуществляли в хозяйствах Московской и Тверской областей в 1991 и 1993 гг. Площадь 4-рядковой делянки — 0,5 га. Первое опрыскивание проводили после появления болезни на листьях, последующие — через 7—10 сут. Всего сделали 3 обработки в 4-кратной повторности каждая. Учеты и сбор пораженных листьев проводили на двух средних рядках на делянках (для снижения вклада межделяночных перезаражений).

Для оценки резистентности природных популяций в разных регионах страны (Московская, Омская области, Сахалин) собирали листья картофеля с единичными пятнами фитофтороза, изолировали клоны в чистую культуру и испытывали на чувствительность к диметоморфу по скорости роста на агаризованной овсяной среде с разными концентрациями препарата.

Оценка резистентности к диметоморфу методом листовых дисков

Данный метод не дал возможности выделить резистентные к диметоморфу клоны как из лабораторных штаммов, так и из делянок, обработанных разными фунгицидами, включая диметоморф (табл. 1).

Из приведенных данных следует, что диметоморф менее токсичен для чувствительных штаммов, чем металаксил (концентрация 0,1 мкг/мл не ингибирует рост

Оценка чувствительности *P. infestans* к фунгицидам при заражении листовых дисков

Инокулюм	Количество спороносящих дисков, %			
	в присутствии диметоморфа		в присутствии металаксилы	
	0.1 мкг/мл	1 мкг/мл	0.1 мкг/мл	1 мкг/мл
Лабораторные штаммы				
H-85	100	0	0	0
CG-86	100	0	0	0
Споры из листьев на полянках				
Обработанные				
диметоморфом+манкоцебом	100	0	100	100
диметоморфом+поликарбадином	100	0	100	100
метаксиллом+поликарбадином	100	0	100	100
Без обработок (контроль)	100	0	100	100

чувствительных штаммов на дисках из листьев). В полевых популяциях наблюдается высокая частота штаммов, резистентных к металаксилу, и отсутствуют штаммы, резистентные к диметоморфу.

Оценка резистентности к диметоморфу методом заражения листьев в кюветах

Лабораторные штаммы. Для оценки резистентности к диметоморфу отдельные листья растений картофеля, помещенные обратной стороной вверх в кюветы и предварительно опрыснутые водой или диметоморфом, были инокулированы суспензией чистоспор (10^3 на кювет) (табл. 2). Частота резистентных клонов, возникающих в культуре, представляет собой штаммоспецифический параметр и варьирует у разных штаммов от 0 до 24 % на среде с 25 мкг/мл диметоморфа.

Изоляты из отдельных пятен, возникших после заражения листьев, которые были опрыснуты 25, 50 мкг/мл диметоморфа и водой, выделены в чистую культуру. Их резистентность определяли на агаризованных средах, содержащих разные концентрации диметоморфа (см. рисунок). Изоляты из листьев, опрыснутых водой, были чувствительны к диметоморфу, в то время как у изолятов из листьев, обработанных фунгицидом, отмечена разная степень резистентности.

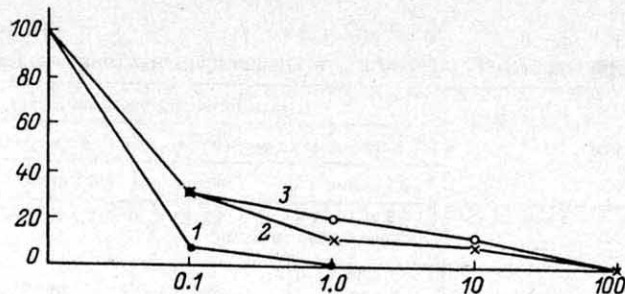
Штаммы, устойчивые к металаксилу и диметоморфу, не обладают перекрестной резистентностью, но не исключено наличие множественной резистентности штаммов к обоим препаратам. Для изучения возможности возникновения полирезистентных штаммов листья, обработанные металаксиллом и водой, были инокулированы резистентными к диметоморфу изолятами (табл. 3).

Таблица 2

Оценка чувствительности *P. infestans* к диметоморфу методом заражения листьев в кюветах

Источник инокулюма (штаммы)	Количество резистентных клонов в инокулюме, %				
	к металаксилу		к диметоморфу		
	50 мкг/мл	1 мкг/мл ¹	10 мкг/мл ¹	25 мкг/мл ¹	50 мкг/мл ²
H-85	10.0	50.1	24.8	—	—
CG-86	11.1	40.3	18.1	24.1	0.01
H-87	100	—	—	—	0
RIF	—	—	—	0	—
134	—	—	—	20.0	—

¹ 10^3 , ² $(2-5) \times 10^5$ спор на кювет. Прочерк — опыт не проводили.



Влияние диметоморфа на линейный рост колоний *P. infestans* на агаризованном овсяном отваре. По оси абсцисс — логарифм концентрации диметоморфа; по оси ординат — диаметр колоний на 10-е сут роста (% к росту на среде без фунгицида). Штаммы: 1 — исходный, 2 — D-1, 3 — D-2.

Выделенные изоляты высокорезистентны к диметоморфу (70—90 % пятен на листьях, обработанных 50 мкг/мл диметоморфа, в сравнении с листьями, опрыснутыми водой). Эффективность клонирования (ЭК) у этих клонов ниже, чем у исходного штамма, что свидетельствует о негативном влиянии резистентности на агрессивность (приспособленность). На листьях, обработанных металаксилом, штаммы D-2 и D-3 образовали единичные пятна, из которых изолированы в чистую культуру 5 клонов. Их спорами также были инокулированы листья, опрыснутые металаксилом, диметоморфом и водой (табл. 4). Все клоны оказались высокоустойчивыми к обоим фунгицидам. Следовательно, полирезистентные клоны могут легко возникать в популяциях, резистентных к металаксилу, после обработки диметоморфом, и наоборот, в популяциях, резистентных к диметоморфу, после обработки металаксилом.

Резистентные к диметоморфу штаммы не только имели пониженную ЭК, но и более медленно, чем чувствительные, росли на агаризованной среде. После 2—3 пересевов их резистентность была утрачена, а высокая скорость роста *in vitro* — восстановлена, что указывает на сильный отбор против резистентности к диметоморфу.

Полевые эксперименты. Оценка коллекции штаммов *P. infestans*, выделенных в 1996—1997 гг. из зараженных листьев картофеля и томатов в разных районах России (56 штаммов из Московской, 11 — из Омской, 43 — из Сахалинской областей), не позволила обнаружить хотя бы один резистентный к диметоморфу штамм, несмотря на то что на Сахалине некоторые поля были обработаны акробатом. Эти данные подтверждают предыдущие сообщения (Воробьева и др., 1992) о высокой чувствительности природных популяций гриба к диметоморфу.

Заражение листьев картофеля в кюветах образцами спор из листьев с делянок, опрыснутых разными фунгицидами, после третьей обработки также показало, что

Таблица 3

Резистентность к фунгицидам клонов *P. infestans*, устойчивых к диметоморфу

Изоляты ¹	ЭК ²	Количество резистентных клонов, %	
		к диметоморфу ³	к металаксилу ⁴
D-1	0.33	72.1	0
D-2	0.19	86.7	0.7
D-3	0.32	89.2	0.1

¹ Изоляты штамма CG-1, выделенные из листьев, которые были обработаны 50 мкг/мл диметоморфа; ² ЭК — эффективность клонирования (отношение числа пятен на листьях, опрыснутых водой, к числу спор в инокулюме; ЭК исходного штамма CG-85 — 0.53); ³ листья опрыснуты 50 мкг/мл диметоморфа и инокулированы 10³ спор; ⁴ листья опрыснуты 50 мкг/мл диметоморфа и инокулированы 10⁵ спор; количество резистентных клонов (%) — отношение числа пятен на обработанных листьях к числу пятен на необработанных (опрыснутых водой) × 100.

Резистентность к фунгицидам потомства устойчивых к диметоморфу клонов *P. infestans*, изолированных из листьев, обработанных металаксилем

Штаммы	ЭК	Количество клонов, %	
		устойчивых к диметоморфу	устойчивых к металаксилу
D-2—1	0.23	94.2	78.1
D-2—2	0.22	86.1	100
D-3—1	0.18	100	96.3
D-3—2	0.15	89.6	100
D-3—3	0.43	91.5	100

Таблица 5

Устойчивость к фунгициду образцов спор *P. infestans* с делянок, обработанных фунгицидами

Варианты опыта	Количество резистентных клонов, %	
	к металаксилу	к диметоморфу
Диметоморф + манкоцеб	53.5	0.5
Диметоморф + поликарбацин	76.0	0.4
Металаксил + поликарбацин	89.3	0.8
Контроль (без обработок)	78.1	0.3

Таблица 6

Влияние фунгицидов на пораженность делянок картофеля фитофторозом

Даты (1997 г.)	Варианты опыта	Распространенность болезни ¹	Интенсивность развития болезни ²
17 08	Диметоморф	2.68	0.83
	Поликарбацин	4.0	0.67
	Металаксил	2.0	0.60
	Контроль	12.0	4.0
25 08	Диметоморф	6.14	3.17
	Поликарбацин	6.64	3.32
	Металаксил	22.6	19.83
	Контроль	21.3	12.50
30 08	Диметоморф	10.14	4.83
	Поликарбацин	9.34	5.50
	Металаксил	31.34	46.17
	Контроль	34.0	39.33
	НСР	3.7	5.5

¹ Число пораженных растений, %; ² среднее число пятен на одно растение.

Агрессивность и резистентность к диметоморфу спор *P. infestans* из листьев на делянках, обработанных разными фунгицидами

Варианты опыта	18 08		24 08		30 08	
	ЭК	Р	ЭК	Р	ЭК	Р
Обработанные						
металаксиллом	0.017	5.5	0.062	1.6	0.079	2.5
поликарбадином	0.015	6.7	0.028	7.1	0.028	7.1
диметоморфом	0.022	9.1	0.040	7.5	0.032	15.6
Без обработок (контроль)	0.042	4.8	0.060	5.0	0.110	3.6

Примечание. ЭК — эффективность клонирования: отношение числа инфекционных пятен к числу спор в инокулюме; Р — резистентность: отношение числа инфекционных пятен на кювете с листьями, опрыснутыми диметоморфом, к числу пятен на кювете, опрыснутой водой (%).

полевая популяция *P. infestans* в Московской обл. высокорезистентна к металаксилу, но содержит небольшое число клонов (0.3—0.8 %), резистентных к диметоморфу (табл. 5). При такой низкой концентрации миграция спор между делянками не играет существенной роли. Поскольку различия между контрольными делянками и обработанными различными фунгицидами несущественны, наличие резистентных штаммов можно рассматривать как фон, обусловленный мутационным процессом. При частоте мутаций не выше 10^{-4} (табл. 2) встречаемость резистентных клонов с частотой 0.003—0.008 в природных популяциях (табл. 5) свидетельствует о достаточно высокой приспособленности мутантов и быстром их накоплении под селективным давлением фунгицида (Skylakakis, 1985). Однако 3-кратное опрыскивание не вызвало увеличения частоты резистентных клонов. Возможно, контактные компоненты смесей сдерживали их накопление.

В связи с этим в опытах 1993 г. были использованы чистые препараты. После каждой из трех обработок учитывали число пораженных растений (распространенность), число пятен на каждом растении (интенсивность), а также оценивали резистентность к диметоморфу сборного образца спор из средних рядков делянок. Эффективность фунгицидов показана в табл. 6.

Высокая дисперсия представленных в табл. 6 данных обусловлена очаговым характером болезни. Металаксил снижал пораженность только в начале эпифитотии, возможно, вследствие того, что концентрация резистентных штаммов уменьшалась в зимний период (Деревягина и др., 1991). В дальнейшем различий между обработанными металаксиллом и необработанными делянками не наблюдалось. Диметоморф ведет себя как контактный фунгицид поликарбадин. Образцы спор из каждой делянки проверяли на устойчивость к диметоморфу (табл. 7).

Из представленных результатов видно, что на опрыснутых делянках рост пораженности сопровождался ростом агрессивности популяции паразита (показатель ЭК за период с 17 по 30 августа вырос в 4.6 раза), что соответствует литературным данным (Рыбакова, Дьяков, 1990). Значительно (в 2.6 раза) выросла ЭК на делянках, обработанных металаксиллом, который, следовательно, не снижает приспособленности выжившей части популяции. Медленнее изменяется ЭК на делянках, обработанных поликарбадином и диметоморфом. Следовательно, кроме летального действия на значительную часть популяции паразита эти фунгициды снижают приспособленность оставшейся доли популяции. Диметоморф оказывает некоторое селективное действие на популяцию, повышая процент устойчивых к нему клонов, однако их низкая приспособленность, по-видимому, смягчает угрозу их накопления.

- Воробьева Ю. В., Кваснюк Н. Я., Шемякина В. П., Гриднев В. В. Мониторинг чувствительности *Phytophthora infestans* к диметоморфу (акробату) // Совр. положение с резистентностью вредителей, возбудителей болезней растений и сорняков к пестицидам: Тез. докл. Уфа, 1992. С. 80—81.
- Голышин Н. М., Маслова А. А., Гончарова Т. Ф. Новый системный фунгицид против пероноспороза // Защита растений. 1992. Вып. 12. С. 13.
- Деревягина М. К., Воловик А. С., Дьяков Ю. Т. Изменение чувствительности к ридомилу в жизненном цикле возбудителя фитофтороза картофеля *Phytophthora infestans* (Mont.) d By. и целесообразность весенних опрыскиваний // Микол. и фитопатол. 1991. Т. 25, вып. 5. С. 426—431.
- Деревягина М. К., Дьяков Ю. Т. Количественная оценка резистентности популяций *Phytophthora infestans* к фунгицидам // С.-х. биология. 1992. Вып. 1. С. 132—135.
- Деревягина М. К., Дьяков Ю. Т., Воловик А. С. Действие фунгицида диметоморфа: системное или контактное // Микол. и фитопатол. 1997. Т. 31, вып. 1. С. 65—67.
- Дьяков Ю. Т., Долгова А. В., Рыбакова И. Н. Оценка резистентности возбудителя фитофтороза картофеля к фунгициду металаксилу // С.-х. биология. 1988. Вып. 1. С. 135—139.
- Рыбакова И. Н., Дьяков Ю. Т. Циклические изменения генотипического состава популяций фитопатогенных грибов на примере возбудителя фитофтороза картофеля // Журн. общей биологии. 1990. Т. 51, вып. 5. С. 651—660.
- Blankenagel R., Semmer H. Dimethomorph — ein fungicide mit wirkung gegen Peronosporales // Mitteilungen Biol. Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. Berlin; Dahlem, 1990. S. 202.
- Cohen Y., Baider A., Cohen H. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens // Phytopathology. 1995. Vol. 85. P. 1500—1506.
- Kuhn P. J., Pitt D., Lee S. A., Wakley G., Sheppard A. N. Effects of dimethomorph on the morphology and ultrastructure of *Phytophthora* // Mycol. Res. 1991. Vol. 95. P. 333—340.
- Skylakakis G. Two different processes for selection of fungicide resistant subpopulations // Bull. OEPP. 1985. Vol. 15. P. 519—525.
- Staub T., Sozzi D. Fungicide resistance: a continuing challenge // Plant Dis. 1984. Vol. 68. P. 1026—1031.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Поступила 18 XII 1997

SUMMARY

Analysis of 110 strains of *Phytophthora infestans* collected in 1996—1997 in Russia revealed a very low concentration (0.3—0.8 %) of dimethomorph resistant isolates.

No cross resistant to metalaxyl and dimethomorph isolates have been found but polyresistant strains appeared in metalaxyl resistant populations after treatment with dimethomorph and vice versa.

In comparison to dimethomorph sensitive strains resistant isolates grew slowly on rye-A agar and lost their resistance after several passages. The growth rate increase correlates with the loss of resistance to dimethomorph.

Repeated treatment of potato plots with dimethomorph has a selective effect on the population increasing the rate of resistant clones. Low adapting capacity of resistant strains reduces the hazard of their accumulation.

Рецензент — М. М. Левитин