

УДК 635.21:632.44.2 (476)

В. Н. ВИКТОРОВИЧ, А. М. ХОДОСОВСКАЯ, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ

**ВСТРЕЧАЕМОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ СПАРИВАНИЯ
PHYTOPHTHORA INFESTANS В ПОПУЛЯЦИЯХ
НА ТЕРРИТОРИИ БЕЛАРУСИ С 2007 ПО 2012 г.**

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
e-mail: victorovich200@mail.ru, hodosovskaya@bsu.by, evtyshenkov@bsu.by

В данной работе показано, что в период с 2007 по 2012 г. соотношение основных типов спаривания A1:A2 у 367 исследованных изолятов возбудителя фитофтороза оказалось близким к 1:1 с небольшим доминированием A2, а с учетом выявленного редкого типа A1A2 суммарное соотношение A1:A2:A1A2 составило 153 (41,7 %):208 (56,7 %):6 (1,6 %). В указанные годы сбора оба основных половых типа обнаружены на большинстве полей всех областей республики, что свидетельствует о их достаточно равномерном пространственном и временном распределении. Полученные данные являются важным показателем, указывающим на возможность протекания полового процесса в природных популяциях *P. infestans*. Отмечены заметные различия в соотношении A1 и A2 типов спаривания для штаммов патогена, выделенных с картофеля и томата. Для картофеля преобладающим являлся A2 тип, для томата – A1. Кроме того, показано, что соотношение типов спаривания в пределах одного поля и сезона могут существенно варьироваться в зависимости от времени сбора.

Ключевые слова: *Phytophthora infestans*, A1 и A2 типы спаривания, встречаемость типов спаривания, соотношение A1:A2.

V. N. VICTOROVICH, A. M. KHODOSOVSKAYA, A. N. EVTUSHENKOV

**OCCURRENCE OF DIFFERENT *PHYTOPHTHORA INFESTANS* MATING TYPES IN POPULATIONS
AT THE TERRITORY OF BELARUS SINCE 2007 TO 2012**

Belarusian State University, Minsk, Belarus,
e-mail: victorovich200@mail.ru, hodosovskaya@bsu.by, evtyshenkov@bsu.by

It was shown that in the period 2007 and 2009–2012 ratio of basic mating types A1:A2 for 367 isolates of *Phytophthora infestans* was close to 1:1 with a slight predominance of A2, and taking into account a rare type A1A2 also marked in this work total ratio A1:A2: A1A2 was 153 (41.7 %): 208 (56.7 %):6 (1.6 %). Both main types of sex were marked during all years of collecting in all regions of the country in most fields, indicating that they were fairly uniformly distributed in space and time. These data are an important indicator and the main condition for the possibility of occurrence of sexual reproduction in natural populations of *P. infestans*. It is noted significant differences in the ratios A1:A2 for potatoes and tomatoes isolates of pathogen. In the case of potato A2 was predominant type, as for tomato – A1 type. Furthermore it was revealed that the ratio of mating types within one field, and within the season vary substantially depending on the time of collection.

Keywords: *Phytophthora infestans*, occurrence of A1 and A2 mating types, ratio A1:A2.

Введение. Оомицет *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – возбудитель фитофтороза, наиболее вредоносной болезни картофеля и томатов. Ежегодные общие потери сельхозкультур от заболевания и затраты на борьбу с ним стремительно растут и на данный момент оцениваются примерно в 3–6 млрд долларов [1, 2]. В условиях, благоприятных для развития болезни, потери урожая картофеля в Беларуси могут в годы эпифитотий превышать 50 %, причем эпифитотийное развитие болезни в последнее время наблюдается регулярно, с интервалом 1–1,5 года [3].

Основной путь распространения заболевания связан с переносимыми ветром и водными потоками зооспорангиями и вышедшими из них бесполовыми зооспорами. Половой процесс также

является одним из способов размножения в жизненном цикле патогена. Для его осуществления необходимо взаимодействие специализированных структур, принадлежащих различным мицелиям, которые относятся к А1 и А2 типам спаривания. Крайне редко у этого гетероталлического организма выявляются самофертильные изоляты [4, 5]. До конца 1970-х годов у возбудителя фитофтороза повсеместно выявлялся один тип спаривания (А1), а половой процесс имел место только в популяциях патогена на его родине – в Центральной Мексике. Появление возможности половой репродукции у *P. infestans* на территории европейских стран и США благодаря миграции «новых» штаммов привело к увеличению генетического разнообразия в популяции оомицета [6, 7].

Тип спаривания является одним из важнейших фенотипических признаков *P. infestans*. Соотношение различных типов спаривания используется в качестве характеристики популяций патогена, позволяющей оценить возможность половой рекомбинации, которая обеспечивает высокую изменчивость возбудителя и является предпосылкой к быстрым приспособительным реакциям и повышению вредоносности заболевания [8]. В результате полового размножения образуются устойчивые к неблагоприятным условиям структуры – ооспоры, которые являются важным дополнительным источником первичной инфекции [9].

Таким образом, всестороннее изучение особенностей структуры популяций и жизненного цикла патогена на той или иной территории имеет существенное практическое значение, так как позволяет более эффективно прогнозировать динамику развития болезни и планировать мероприятия по защите картофеля и томатов от фитофтороза [8].

В ряде работ показано, что для различных популяций соотношение половых типов может сильно отличаться – от полного доминирования одного из них до сосуществования их в равновесном соотношении [10–13].

Цель данной работы – изучение встречаемости и соотношения различных типов спаривания среди изолятов *P. infestans* в Беларуси в период с 2007 по 2012 г.

Материалы и методы исследования. В работе использовали 367 изолятов, собранных в течение 5 полевых сезонов с растений картофеля и томатов в 2007 и 2009–2012 гг. Сбор проводили как с малых делянок личных подсобных хозяйств, так и с крупных полей фермерских хозяйств на территории различных районов всех областей республики. В окрестностях каждого населенного пункта собирали образцы листьев с нескольких участков. В зависимости от характеристик каждого участка собирали от 1 до 27 изолятов, в среднем – по 3–5.

Изоляты выделяли из листьев картофеля и томатов методом картофельных дисков. Листовую пластинку с зоной поражения патогеном помещали между двумя ломтиками картофеля, которые инкубировали во влажных камерах в течение 5 дней. Далее небольшой фрагмент проросшего через ломтик мицелия переносили на селективную среду, приготовленную на основе *РyeA* агара и дополнительно содержащую 0,3 г/л ампициллина, 0,06 г/л рифампицина, 0,1 г/л нистатина. Через 5 дней агаровый блок, содержащий развившийся мицелий *P. infestans*, переносили в пробирки с ржаной агаризованной средой *РyeA*, приготовленной по методике Кейтона [14].

Определение типов спаривания проводили методом попарного скрещивания исследуемых изолятов на ржаной агаризованной среде с тестерными штаммами с известными типами спаривания. Чашки инкубировали в темноте при 18 °С в течение 14 дней, после чего с помощью светового микроскопа определяли наличие или отсутствие ооспор в месте контакта гиф между штаммами. Если исследуемый изолят образовывал ооспоры с тестером А2 и не образовывал их с тестером А1, его относили к типу совместимости А1, если наоборот – к типу А2. Изолят относили к А1А2 типу, если он образовывал ооспоры с обоими тестерами, либо считали стерильным, если он не образовывал ооспоры ни с одним из тестеров [8].

Результаты и их обсуждение. Из 367 исследованных изолятов тип спаривания А1 обнаружен у 153, А2 – у 208. Кроме того, на разных полях и в разные годы были обнаружены 6 изолятов редкой группы А1А2. Таким образом, суммарное соотношение А1:А2:А1А2 составило 153 (41,7 %): 208 (56,7 %):6 (1,6 %). Полученное соотношение А1 к А2 близко к 1:1 (частота половой рекомбинации – 0,74), что является важным показателем и основным условием для возможности протекания полового процесса в природных популяциях [4].

Таблица 1. Встречаемость различных типов спаривания *P. infestans* в 2007, 2009–2012 гг.

Год сбора	К-во всех изолятов	К-во изолятов с определенным типом спаривания			Соотношение A1:A2 или A1:A2:A1A2, %	Частота половой рекомбинации
		A1	A2	A1A2		
2007	25	14	11	0	56,0:44,0	0,79
2009	64	19	45	0	29,7:70,3	0,42
2010	181	74	103	4	40,9:56,9:2,2	0,72
2011	83	35	46	2	42,2:55,4:2,4	0,76
2012	14	11	3	0	78,6:21,4	0,27
Все годы	367	153	208	6	41,7:56,7:1,6	0,74

В табл. 1 представлены данные о количестве выявленных штаммов с различными половыми типами за отдельные годы.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что изоляты обоих типов спаривания были распространены в течение 5 сезонов сбора. При этом в течение двух сезонов на разных полях были выявлены самофертильные изоляты A1A2. Очевидно, что преобладающим типом спаривания в рассмотренный период на территории республики являлся тип A2: доля его составила 56,7 % от общего количества проанализированных образцов. В 2007 и 2012 гг. доминирующим оказался не A2, а A1 тип спаривания. Можно предположить, что на точность полученных данных оказали влияние объем и равномерность выборки. Так, в 2007 г. было собрано только 25 изолятов, а в 2012 г. – всего 14 изолятов на двух полях. Тем не менее, очевидно, что от сезона к сезону соотношение типов половой совместимости для большей части выборки оставалось достаточно близким к 1:1, что обеспечивало высокую вероятность половой репродукции патогена в данных популяциях.

В 2010 г. доля собранных штаммов была максимальной – 181, среди них были представлены образцы, полученные из всех областей республики. В Минской области сбор был проведен в окрестностях 9 населенных пунктов из равноудаленных друг от друга районов, в Брестской области аналогичным образом были выбраны для сбора образцов 7 населенных пунктов, в Витебской, Гомельской, Гродненской и Могилевской областях – по 4 населенных пункта. В окрестностях каждого из них сбор проводили с 1–5 полей (или делянок), по несколько изолятов с каждого. С учетом размера и равномерности выборки для группы изолятов этого года сбора была оценена приуроченность отдельных типов спаривания к определенным территориям. В табл. 2 представлена информация о встречаемости различных типов спаривания на территории отдельных областей в 2010 г.

Таблица 2. Встречаемость различных типов спаривания *P. infestans* на территории отдельных областей в 2010 г.

Область	К-во изолятов	К-во изолятов с определенным типом спаривания			Соотношение A1:A2 или A1:A2:A1A2, %	Частота половой рекомбинации
		A1	A2	A1A2		
Брестская	57	36	21	0	63,2:36,8	0,58
Витебская	16	7	9	0	43,7:56,3	0,78
Гомельская	11	2	9	0	18,2:81,8	0,22
Гродненская	15	5	10	0	33,3:66,7	0,50
Минская	70	21	46	3	30,0:65,7:4,3	0,46
Могилевская	12	3	8	1	25,0:66,7:8,3	0,38
Вся республика	181	74	103	4	40,9:56,9:2,2	0,72

Как следует из полученных данных, оба типа половой совместимости *P. infestans* обнаружены повсеместно. При этом, как правило, изоляты обоих типов спаривания встречались во всех населенных пунктах, причем чаще всего на одном поле или делянке одновременно. Соотношение различных типов спаривания обеспечивало частоту полового процесса в популяции фитопатогена на территориях отдельных областей и населенных пунктов в диапазоне от 0,22 до 0,78.

В изучаемой выборке изолятов *P. infestans* 2010 г. сбора наблюдалось небольшое преобладание в общей численности A2 типа спаривания. Результаты исследования изолятов из Брестской

области отличались от показателей, которые были характерны для других регионов республики: соотношение A1 и A2 типов половой совместимости было смещено в сторону A1 типа спаривания. Однако некоторую погрешность в регистрируемое соотношение, возможно, внесли показатели, полученные с отдельных делянок, на которых было собрано достаточно много штаммов, причем с выраженным доминированием A1 типа половой совместимости. Исходя из результатов анализа выборок штаммов с одного участка, населенного пункта или района, в том числе и в другие годы, можно отметить, что чем более крупные и равномерные выборки штаммов были рассмотрены, тем больше регистрируемое соотношение A1:A2 стремилось к 1:1. Так, например, для Гомельской области, где количество собранных штаммов было минимальным, соотношение типов спаривания было максимально удалено от 1:1. Отсутствие штаммов одного из типов спаривания в конкретных районах сбора образцов на фоне примерно равного их соотношения на всей анализируемой территории показано также для популяций данного фитопатогена в России, Эстонии, Венгрии [12, 13, 15].

Большинство изолятов *P. infestans*, использованных в работе, были собраны с растений картофеля, однако 28 изолятов (11 – в 2010 г., 17 – в 2011 г.) были собраны с растений томата. Анализ полученных данных показал, что для томатных штаммов доминирующим типом спаривания оказался именно A1, соотношение A1:A2 составило 19 (67,9 %):9 (32,1 %). Штаммы, выделенные из листьев томата, были собраны с 15 изолированных делянок в 8 районах республики. A1 тип был отмечен на 10 делянках, A2 – на 7. Полученная выборка томатных изолятов не так велика, как картофельная, тем не менее, учитывая ее равномерность (с одной делянки собирали не более 1–3 изолятов), на основании полученных данных о встречаемости типов половой совместимости *P. infestans* можно предположить, что среди штаммов патогена существует некоторая специализация на картофельные и томатные, что было отмечено также и другими авторами [16]. Однако эта специализация, вероятно, не является очень четкой, учитывая тот факт, что все изоляты, в том числе и из листьев томата, при выделении в чистые культуры успешно прорастали через картофельные диски, причем полученные из картофеля разных сортов.

Несмотря на имеющиеся в литературе данные о специализации штаммов возбудителя фитофтороза, высказывается мнение, что в современных популяциях, в которых половой процесс и рекомбинация – частые явления, нет выраженной приуроченности изолятов к растению томата либо картофеля, штаммы с картофеля успешно поражают растения томата, и наоборот. Изучение структуры популяции возбудителя фитофтороза картофеля и томатов в 1991–2011 гг. в России позволило сделать заключение о возникновении единой популяции патогена на двух растениях-хозяевах с одинаковой агрессивностью к обоим видам [8, 11].

Соотношения типов спаривания в пределах одного поля и сезона могут существенно варьироваться в зависимости от времени сбора образцов [17]. Так, для двух из трех исследованных нами участков показано, что в течение вегетационного сезона происходит выраженное смещение соотношения типов спаривания изолятов *P. infestans* в сторону одного из них при исходном соотношении, очень близком к 1:1. В случае первого сбора для одного участка у 16 проанализированных штаммов типы спаривания A1 и A2 были представлены в равном количестве, в случае второго сбора из 18 изолятов 15 имели тип спаривания A1 (83,3 %) и 3 – A2 (16,7 %). Для другого участка в случае первого сбора соотношение A1:A2:A1A2 составило 13 (48,2 %):13 (48,2 %):1 (3,6 %), в случае второго сбора – 6 (25,0 %):17 (70,8 %):1 (4,2 %). Еще на одном из участков не отмечено существенных изменений в соотношении типов половой совместимости в течение вегетационного периода. На основании этих результатов и с учетом данных литературы [8] можно предположить, что чаще всего для одного поля соотношение половых типов будет ближе к 1:1 именно в начале сезона, при появлении первых симптомов заражения. Из полученных нами данных следует, что соотношение типов спаривания на отдельных полях и делянках может быть значительно сдвинуто в сторону одного из типов и может отличаться в зависимости от времени сбора.

Соотношение типов спаривания, близкое к 1:1, обеспечивает возможность половой репродукции в природных популяциях *P. infestans*. Однако подобное соотношение в популяциях может быть также следствием определенного влияния полового процесса на динамику численности патогена, особенно в начале сезона, так как множественные прорастающие ооспоры, вероятно,

дают штаммы в соотношении, близком к 1:1, по типу спаривания. Следовательно, можно предположить, что соотношение половых типов 1:1 – это и условие, и следствие полового размножения.

Таким образом, результаты определения типов спаривания 367 изолятов *P. infestans*, собранных в 2007 и 2009–2012 гг. на территории Республики Беларусь, свидетельствуют о том, что в рассмотренный период соотношение типов половой совместимости патогена в белорусских популяциях сохранялось близким к 1:1 с некоторым преобладанием доли А2 типа и не претерпело резких изменений, связанных, например, с исчезновением одного из типов спаривания. Учитывая результаты, полученные в РУП «НПЦ НАН Беларуси по картофелеводству и плодоовощеводству» под руководством члена-корреспондента НАН Беларуси В. Г. Иванюка в 1990-е годы и в начале 2000-х годов [3, 18], когда доминирующим типом спаривания был А1, можно говорить о том, что в период 2007–2009 гг. произошло изменение структуры белорусской популяции возбудителя фитофтороза, связанное с распространением и некоторым преобладанием А2 типа спаривания. Увеличение доли штаммов этого типа спаривания в популяциях *P. infestans* за последние 10–15 лет характерно и для других европейских стран [10, 13, 19, 20].

Последние популяционные исследования возбудителя фитофтороза показали, что размножение патогена происходит преимущественно в клональной манере, а половой процесс для него остается достаточно редким явлением для большинства регионов мира, за исключением части Мексики и стран Северной и Северо-Восточной Европы, в том числе и европейской части России [11, 20–22]. В указанных странах популяции *P. infestans* характеризуются сбалансированным соотношением типов спаривания, что делает возможным половую репродукцию патогена. Это приводит к повышению генетической вариабельности возбудителя, усилению его вирулентности и часто – к появлению резистентности к фунгицидам [8].

Заключение. Полученные нами результаты являются важным аргументом в пользу утверждения о том, что современные белорусские популяции *P. infestans* характеризуются регулярным протеканием полового процесса, который может оказывать заметное влияние на изменчивость патогена и определенное влияние на динамику его численности. Формирующиеся в результате данного способа размножения ооспоры способны сохраняться в течение длительного времени вне тканей растения и переживать неблагоприятные условия, что, помимо инфицированных мицелием клубней, делает их серьезным источником первичной инфекции на поле и может обеспечить более раннее начало эпидемии.

Изучение и понимание указанных особенностей популяции *P. infestans* имеет существенное практическое значение, так как полученные результаты могут быть использованы в более взвешенном и грамотном планировании севооборота и защитных мероприятий при выращивании картофеля и томатов на территории Республики Беларусь.

Список использованной литературы

1. Kamoun, S. Molecular genetics of pathogenic oomycetes / S. Kamoun // Eukar. Cell. – 2003. – Vol. 2. – P. 191–199.
2. Duncan, J. M. Phytophthora – an abiding threat to our crops / J. M. Duncan // Microbiol. Today. – 1999. – Vol. 26. – P. 114–116.
3. Иванюк, В. Г. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков / В. Г. Иванюк, С. А. Банадысев, Г. К. Журомский. – Минск: Белпринт, 2005. – 696 с.
4. Fry, W. E. Cloning and genetic analyses of two highly polymorphic, moderately repetitive nuclear DNAs from *Phytophthora infestans* / W. E. Fry, S. B. Goodwin // Plant Dis. – 1997. – Vol. 81. – P. 1349–1357.
5. Brasier, C. M. Evolutionary biology of *Phytophthora*. I. Genetic system, sexually and generation of variation / C. M. Brasier // Annu. Rev. Phytopathol. – 1992. – Vol. 30. – P. 153–177.
6. Drenth, A. Population genetic structure of *Phytophthora infestans* in the Netherlands / A. Drenth, L. J. Turkensteen, F. Govers // Netherlands J. Plant Pathol. – 1993. – Vol. 99. – P. 57–67.
7. Goodwin, S. B. Origin of the A2 mating type of *Phytophthora infestans* outside Mexico / S. B. Goodwin, A. Drenth // Phytopathology. – 1997. – Vol. 87. – P. 992–999.
8. Дьяков, Ю. Т. Популяционная генетика *Phytophthora infestans* / Ю. Т. Дьяков, С. Н. Еланский // Микология сегодня. – 2007. – № 1. – С. 107–139.
9. Oospore production of *Phytophthora infestans* in potato and tomato leaves / Y. Cohen [et al.] // Phytopathology. – 1997. – Vol. 87, N 2. – P. 191–196.
10. *Phytophthora infestans* population structure: a worldwide scale / M. Cardenas [et al.] // Acta biol. Colomb. – 2012. – Vol. 17, N 2. – P. 227 – 240.

11. Еланский, С. Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата: автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.02.12 / С. Н. Еланский; МГУ им. М. В. Ломоносова. – М., 2012. – 46 с.
12. Современное состояние популяции *Phytophthora infestans* и защита картофеля от фитофтороза / М. А. Кузнецова [и др.] // Защита и карантин растений. – 2013. – № 3. – С. 12–15.
13. The structure of mating type, virulence, metalaxyl resistance of *Phytophthora infestans* in a long-term phenotypic study in distinct location in Eastern Estonia / E. Runno-Paurson [et al.] // J. Plant Pathol. – 2014. – Vol. 96, N 1. – P. 85–95.
14. Caten, C. E. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans* / C. E. Caten, J. L. Jinks // Can. J. Bot. – 1968. – Vol. 46. – P. 329–348.
15. Characterisation of isolates of *Phytophthora infestans* from Hungary / J. Bakonyi [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2002. – Vol. 108. – P. 139–146.
16. Population studies on *Phytophthora infestans* on potatoes and tomatoes in southern Germany / K. Möller [et al.] // Eur. J. Plant Pathol. – 2009. – Vol. 124. – P. 659–672.
17. Викторovich, В. Н. Внутрисезонная селекция генотипов *Phytophthora infestans* / В. Н. Викторovich, А. Н. Евтушенков // Вестн. БГУ. Сер. 2. – 2013. – № 2. – С. 47–52.
18. Пляхневич, М. П. Современные методы прогноза развития фитофтороза картофеля / М. П. Пляхневич // Вестн. НАН Беларуси. Сер. биол. наук. – 2006. – № 5. – С. 138–140.
19. Occurrence and Distribution of Mating Types A1 and A2 of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary in Czech Republic / Mazakova J. [et al.] // Plant Protect. Sci. – 2006. – Vol. 42, N 2. – P. 41–48.
20. Genome Analyses of an Aggressive and Invasive Lineage of the Irish Potato Famine Pathogen / D. E. L. Cooke [et al.] // PLOS Pathogens. – 2012. – Vol. 8, N 10. – Published online 2012 Oct 4. – doi: 10.1371/journal.ppat.1002940.
21. Limited Sexual Reproduction and Quick Turnover in the Population Genetic Structure of *Phytophthora infestans* in Fujian, China / W. Zhu [et al.] // Sci. Rep. – 2015. – N 5. – doi: 10.1038/srep10094.
22. Genetic analysis of *Phytophthora infestans* populations in the Nordic European countries reveals high genetic variability / M. B. Brurberg [et al.] // Fungal Biol. – 2011. – Vol. 115. – P. 335–342.

Поступила в редакцию 28.10.2015