

УДК 632.4.01/.08:632.934.1

## УСТОЙЧИВОСТЬ РОССИЙСКИХ ШТАММОВ *PHYTOPHTHORA INFESTANS* К ФУНГИЦИДАМ МЕТАЛАКСИЛ И ДИМЕТОМОРФ

С.Н. Еланский<sup>1</sup>, В.П. Апрышко<sup>1</sup>, Д.И. Милютин<sup>1</sup>, Б.Е. Козловский<sup>2</sup><sup>(1)</sup>кафедра микологии и альгологии биологического факультета МГУ,<sup>(2)</sup>ВНИИ фитопатологии РАСХН)

Металаксил — системный ацилаланиновый фунгицид, относящийся к фениламидам и разработанный специалистами фирмы “Сиб-Гейги” против пероноспорных грибов. Действие металаксилла обусловлено блокированием РНК-полимеразы-1, что вызывает подавление полимеризации рибосомной РНК из-за невозможности вставок уридинового нуклеотида в цепь молекулы (Davidse et al., 1991). Показано, что устойчивость к металаксилу контролируется одним кодоминантным ядерным локусом. Для появления устойчивости к металаксилу достаточно одной или нескольких мутаций (Gisi, Cohen 1996). Частота мутаций —  $6,9 \times 10^{-6}$ , что намного выше частоты мутаций устойчивости к таким широко известным антибиотикам, как окситетрациклин ( $6,9 \times 10^{-8}$ ) или бластицидин S ( $7,2 \times 10^{-8}$ ). Мутации устойчивости к металаксилу резко повышают уровень устойчивости штамма и при этом не влияют на его конкурентоспособность в агроценозе.

Резистентность к фунгицидным соединениям на основе фениламидов (действующие вещества металаксил, мефеноксам, оксадиксил, которые входят в состав различных смесевых препаратов, таких как ридомил, сандофан, ридомил-голд и др.); впервые была отмечена в популяциях возбудителя фитофтороза в Нидерландах и Израиле (Davidse et al., 1981, 1983; Cohen, Reuveni, 1983) в начале 80-х гг. XX в. С тех пор во многих странах мира ведется постоянный мониторинг встречаемости устойчивых к фениламидным препаратам штаммов в популяциях *Phytophthora infestans*. Кроме практической оценки перспектив применения фениламидосодержащих препаратов, устойчивость к ним стала одним из широко используемых маркерных признаков, в том числе и при сравнительном анализе популяций этого патогена.

Диметоморф — трансламинарный фунгицид, обладающий защитным, лечебным и антиспорирующим действием. Он обладает пролонгированным действием и эффективен в малых концентрациях (Cohen et al, 1995), не имеет перекрестной устойчивости с фениламидными фунгицидами.

Диметоморф воздействует на синтез клеточной стенки и не оказывает фунгицидного воздействия на лишённые клеточной стенки протопла-

ты, а также на образование и движение зооспор. Устойчивость к диметоморфу полигенна и аддитивна. Мутации отдельных генов, происходящие с частотой  $6,3 \times 10^{-7}$ , незначительно повышают летальную дозу фунгицида, а увеличение степени резистентности происходит лишь у двойных или множественных мутантов (Bagirova et al., 2001). Резистентные мутанты отличаются более частым ветвлением гиф и малым числом образуемых зооспорангиев (обычно неправильной формы). Появление мутации устойчивости к диметоморфу сопровождается снижением приспособленности как *in vitro*, так и *in planta*. Скорость роста устойчивых мутантов на овсяном агаре меньше скорости роста дикого типа (чувствительного к диметоморфу). Слабоустойчивые мутанты легко теряют устойчивость, и при этом скорость роста на среде без фунгицида восстанавливается. Резистентные штаммы крайне редко встречаются в природных популяциях.

За период с 1991 по 2004 г. устойчивость к металаксилу была изучена у 2000 изолятов *P. infestans*, происходящих из различных регионов России. Определение устойчивости к металаксилу проводили на овсяной агаризованной среде с добавлением фунгицида. Чувствительность изолятов к фунгицидам оценивалась по скорости радиального роста колонии на среде с фунгицидом и без него. Изолят считался чувствительным (S), если относительная скорость роста его колонии на среде с фунгицидом (при концентрации действующего вещества 10 мкг/мл) в сравнении со средой без фунгицида была менее 0,1; слабоустойчивым (SR) — при относительной скорости роста от 0,1 до 0,4 и устойчивым (R) — более 0,4, причем устойчивые штаммы должны были расти на среде с концентрацией действующего вещества 100 мкг/мл. Тест проводился в трех повторностях для каждого изолята.

В большинстве обследованных регионов России после 1995 г. в популяциях возбудителя фитофтороза преобладали чувствительные к металаксилу штаммы. Однако ранее, в конце 80-х — начале 90-х гг. в подмосковных популяциях преобладали устойчивые к металаксилу штаммы (табл. 1). Структурные изменения в картофелеводстве в на-

чале 90-х гг. привели к значительному снижению количества обработок посадок фунгицидами вообще и фениламидами в частности. Вследствие этого произошло постепенное падение долей устойчивых штаммов в подавляющем числе полевых популяций. Начиная с 1993 г. в большинстве полевых популяций устойчивые к фениламидам штаммы отсутствовали или встречались единично, доля слабоустойчивых не превышала 20–30%. В то же время на полях тех хозяйств, которые применяли фениламидные фунгициды, доля устойчивых штаммов была значительно выше: на полях Шатурского р-на в 2000 г. была найдена популяция, представленная исключительно устойчивыми штаммами, на поле Рузского р-на доля устойчивых изолятов составила 31% и т.д. Увеличение использования фениламидных фунгицидов вызвало рост устойчивых штаммов в 2004 г. Аналогичная ситуация наблюдалась также на посадках томата, различий в этом отношении между изолятами с листьев картофеля и томата не отмечено. Интересно, что доля устойчивых изолятов на плодах томата была значительно ниже, чем на листьях. Возможно, при заражении плодов томата чувствительные штаммы имеют преимущество.

Таблица 1

Годовая динамика слабоустойчивых (SR) и устойчивых (R) к металаксилу штаммов в Московской обл.

| Год  | SR (%) | R (%) |
|------|--------|-------|
| 1988 | 34     | 61    |
| 1991 | 19     | 65    |
| 1993 | 2      | 85    |
| 1996 | 13     | 44    |
| 1997 | 21     | 10    |
| 1998 | 6      | 3     |
| 1999 | 19     | 0     |
| 2000 | 9      | 20    |
| 2001 | 0      | 0     |
| 2003 | 24     | 2     |
| 2004 | 25     | 22    |

Те же закономерности были отмечены при исследовании штаммов из регионов европейской части России. Чувствительные изоляты преобладали в полевых популяциях из Ставропольского края; республик Марий Эл, Северная Осетия, Мордовия; Архангельской, Вологодской, Владимирской, Рязанской, Тульской, Ярославской, Рязанской, Костромской областей (сборы 2000–2002 гг.). Только в Мурманской, Брянской и Ленинградской областях суммарное содержание SR + R штаммов составляло более 50% популяции (табл. 2). Итак, пос-

Таблица 2

Слабоустойчивые и устойчивые к металаксилу штаммы в регионах РФ

| Регион              | SR (%) | R (%) |
|---------------------|--------|-------|
| Архангельская обл.  | 6      | 0     |
| Брянская обл.       | 50     | 25    |
| Владивосток         | 40     | 50    |
| Владимирская обл.   | 0      | 0     |
| Вологодская обл.    | 11     | 11    |
| Екатеринбург        | 7      | 40    |
| Ингушетия           | 24     | 20    |
| Иркутск             | 0      | 0     |
| Костромская обл.    | 0      | 0     |
| Красноярск          | 8      | 0     |
| Ленинградская обл.  | 15     | 55    |
| Марий Эл            | 0      | 0     |
| Мордовия            | 0      | 0     |
| Московская обл.     | 16     | 20    |
| Мурманская обл.     | 8      | 92    |
| Омск                | 0      | 100   |
| Рязанская обл.      | 45     | 0     |
| Сахалин, 1997       | 0      | 100   |
| Сахалин, 2003       | 18     | 80    |
| Северная Осетия     | 5      | 5     |
| Ставропольский край | 38     | 12    |
| Тульская обл.       | 0      | 0     |
| Хабаровск           | 100    | 0     |
| Чита                | 0      | 100   |
| Ярославская обл.    | 0      | 0     |

ле сокращения использования фениламидных препаратов произошло восстановление чувствительной популяции *P. infestans* в большинстве регионов России. В то же время на полях хозяйств, практикующих применение этого типа препаратов, встречается значительная часть устойчивых штаммов, что позволяет прогнозировать рост доли устойчивых изолятов вместе с увеличением промышленного производства картофеля.

В моноклональных популяциях азиатской части России, представленных штаммами одной клональной линии Sib1 (выделенной на основании сходства ряда независимых маркерных признаков: типа спаривания, типов митохондриальной ДНК, гибридационной пробы RG 57, спектра изоферментов пептидазы и глюкозо-6-фосфат изомеразы), обнаружено разнообразие штаммов по отношению к металаксилу (Elansky et al., 2001). Устойчивые штаммы этой клональной линии преобладали в подмосковных популяциях в начале 90-х гг.

Только устойчивыми штаммами представлены популяции с о. Сахалин, окрестностей Владивостока, Читы и Омска (табл. 3). В то же время не обнаружено устойчивых изолятов в популяциях той же клональной линии из окрестностей Иркутска; в популяциях из окрестностей Красноярска и Екатеринбурга отмечены как устойчивые, так и чувствительные штаммы примерно в равном соотношении. Это показывает, что потеря и приобретение устойчивости в сибирских и дальневосточных популяциях происходит благодаря мутациям, а не вытеснению штаммов клональной линии Sib 1 вновь появившимися штаммами с другими генотипами.

Таблица 3

Слабоустойчивые и устойчивые к металаксилу штаммы из мономорфных популяций, все штаммы в которых принадлежат к клональной линии Sib 1

| Регион       | SR (%) | R (%) |
|--------------|--------|-------|
| Сахалин      | 0      | 100   |
| Владивосток  | 40     | 50    |
| Чита         | 0      | 100   |
| Иркутск      | 0      | 0     |
| Красноярск   | 8      | 0     |
| Екатеринбург | 7      | 40    |
| Омск         | 0      | 100   |

На о. Сахалин повторное обследование было проведено в 2003 г. По сообщениям специалистов службы защиты растений, в течение последних лет фениламидные фунгициды там не применялись. Однако зарегистрированный еще в 1997 г. высокий уровень резистентности *P. infestans* продолжает сохраняться до настоящего времени совершенно без изменения. Заслуживает внимания тот факт, что в мурманской и сахалинской популяциях среди резистентных изолятов количественно преобладают высокоустойчивые ( $R > SR$ ). По нашему мнению, появление большого количества IR-изолятов свидетельствовало бы о процессе реверсии популяции, что наблюдалось, например, в московской популяции после сокращения использования фениламидных препаратов. Возможно, резистентные штаммы *P. infestans* в Мурманской обл. и на Сахалине характеризуются высокой конкурентной способностью, что позволяет им доминировать в региональных популяциях длительное время.

Сильные различия долей устойчивых и чувствительных изолятов наблюдаются между популяциями *P. infestans* на крупных коммерческих полях и на частных огородах (ЛПХ). Устойчивые и слабоустойчивые штаммы встречаются в ЛПХ значительно реже, чем на коммерческих полях (табл. 4, 5).

Таблица 4

Устойчивость к металаксилу штаммов в регионах РФ (выделение с крупных полей)

| Регион                   | SR (%) | R (%) |
|--------------------------|--------|-------|
| Одинцово, 1993           | 3      | 97    |
| Сер. Пруды, 2000         | 46     | 0     |
| Шелковский р-н, 2000     | 0      | 14    |
| Рузский р-н, 2000        | 6      | 31    |
| Одинцово, 2000           | 22     | 25    |
| Вологодская обл., 2000   | 11     | 11    |
| Марий-Эл, 2000           | 0      | 0     |
| Коломенский р-н, 2001    | 0      | 0     |
| Тульская обл., 2001      | 0      | 0     |
| Брянская обл., 2001      | 50     | 25    |
| Ленинградская обл., 2001 | 15     | 55    |
| Мурманская обл., 2001    | 8      | 92    |
| Кисловодск, 2001         | 46     | 16    |
| Ингушетия, 2002          | 24     | 20    |
| Ленинградская обл., 2002 | 7      | 0     |
| Среднее                  | 15,9   | 25,7  |

По-видимому, это связано с тем, что Ридомил МЦ не продавался в мелких фасовках и до сих пор практически не применяется в ЛПХ. Если учесть, что в ЛПХ производится более 92% урожая картофеля в России, то частные огороды мож-

Таблица 5

Устойчивость к металаксилу штаммов в регионах РФ (выделение с частных огородов, ЛПХ)

| Регион               | SR (%) | R (%) |
|----------------------|--------|-------|
| Звенигород, 1993     | 13     | 0     |
| Воскресенск, 1993    | 0      | 13    |
| ЗБС, 1997            | 18     | 2     |
| Глубокое, 1997       | 22     | 7     |
| Одинцово, 1998       | 6      | 0     |
| Шихово, 1998         | 6      | 6     |
| Одинцово, 1999       | 3      | 0     |
| Москва, 1999         | 25     | 0     |
| Колюбакино, 1999     | 38     | 0     |
| Подольский р-н, 2000 | 0      | 0     |
| Можайский р-н, 2000  | 0      | 0     |
| Дубна, 2000          | 0      | 0     |
| Чеховский р-н, 2000  | 14     | 0     |
| Шаховской р-н, 2000  | 10     | 0     |
| Среднее              | 11,1   | 2,0   |

но рассматривать как существенный ресурс чувствительных генотипов.

Таблица 6

Рост изолятов на средах с различными концентрациями диметоморфа (количество изолятов)

| Область             | Всего изолятов | Рост на 0,5 мкг/мл | Рост на 1 мкг/мл | Рост на 2 мкг/мл |
|---------------------|----------------|--------------------|------------------|------------------|
| Московская          | 184            | 25                 | 5                | 1 (1993 г.)      |
| Тульская            | 10             | 0                  | 0                | 0                |
| Костромская         | 11             | 4                  | 0                | 0                |
| Брянская            | 10             | 2                  | 1                | 0                |
| Вологодская         | 10             | 2                  | 0                | 0                |
| Ленинградская       | 6              | 1                  | 0                | 0                |
| Рязанская           | 10             | 6                  | 2                | 0                |
| Мурманская          | 10             | 0                  | 0                | 0                |
| Ставропольский край | 9              | 5                  | 2                | 0                |
| Мордовия            | 10             | 1                  | 0                | 0                |
| Ингушетия           | 4              | 0                  | 0                | 0                |
| Омская              | 20             | 0                  | 0                | 0                |
| Хабаровский край    | 25             | 0                  | 0                | 0                |
| Сахалин             | 60             | 5                  | 0                | 0                |

Чувствительность к диметоморфу исследована у 379 изолятов *P. infestans*, выделенных в 1993—2003 гг. из пораженных фитофторозом растений картофеля в 12 регионах России. В опыты были включены изоляты с посадок картофеля на о. Сахалин, где активно применяли содержащий диметоморф препарат Акробат-МЦ. Для тестирования использовали агаризованную овсяную среду с содержанием диметоморфа 0,5, 1 и 2 мкг/мл. Чувствительность изолятов оценивалась по степени подавления роста колоний изолятов *P. infestans* в сравнении со средой, не содержащей фунгицид.

Результаты тестирования показывают, что развитие большей части изолятов в значительной степени было подавлено уже при концентрации диметоморфа в среде, равной 0,5 мкг/мл. Небольшое количество изолятов росло при концентрации 1 мкг/мл диметоморфа, однако размеры колоний таких изолятов находились в диапазоне 15—40% от контроля, один изолят рос на концентрации 2 мкг/мл (табл. 6). Таким образом, в изученных региональных популяциях не были обнаружены устойчивые к диметоморфу изоляты.

\* \* \*

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 07-04-96622).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bagirova S.F., An Zsan Li, Dolgova A.V., Elansky S.N., Shaw D.S., Dyakov Y.T. 2001. Mutants of *Phytophthora infestans* resistant to dimethomorph fungicide // J. Russ. Phytopathol. Soc. 2. 19—25.
- Cohen Y., Baider A., Cohen B. 1995. Dimethomorph activity against oomycete fungal plant pathogens // Phytopathology. 85. N 12. 1500—1506.
- Cohen Y., Reuveni V. 1983. Occurrence of metalaxyl — resistant isolates of *Phytophthora infestans* in potato fields in Israel // Phytopathology. 73. 925—927.
- Davidse L.C., Danial D.L., Van Westen C.J. 1983. Resistance to metalaxyl in *Phytophthora infestans* in The Netherlands // Neth. J. Plant Pathol. 89. 1—20.
- Davidse L.C., Looijen D., Turkens-teen L.J., van der Val D. 1981. Occurrence of metalaxyl — resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato fields // Neth. J. Plant Pathol. 97. 65—68.
- Davidse L.C., Van den Berg-Velthuis, Mantel B.C., Jespers A.B.K. 1991. Phenylamides and *Phytophthora* // *Phytophthora*. Cambridge. P. 234—241.
- Elansky S., Smirnov A., Dyakov Y., Dolgova A., Filippov A., Kozlovsky B., Kozlovskaya I., Russo P., Smart C., Fry W. 2001. Genotypic analysis of Russian isolates of *Phytophthora infestans* from the Moscow region, Siberia and Far East // J. Phytopathol. 149. N 10. 605—611.
- Gisi U., Cohen Y. 1996. Resistance to phenylamide fungicides: a case study with *Phytophthora infestans* involving mating type and race structure // Ann. Rev. Phytopathol. 34. 549—572.

RESISTANCE OF RUSSIAN *PHYTOPHTHORA INFESTANS* STRAINS TO FUNGICIDES METALAXYL AND DIMETHOMORPH

S.N. Elansky, V.P. Apryshko, D.I. Milyutina, B.E. Kozlovsky

In total, 2000 *P. infestans* isolates collected during 1988—2004 in different regions of Russia were tested for resistance to metalaxyl. In the majority of field populations frequency of resistant strains decreased after 1993—1994. Possibly it was connected with changes in potato industry in Russia: potato producing was concentrated in small private gardens. The part of resistant strains in populations from small private patches was less than at a big commercial potato fields. Small

private gardens became the great source of sensitive genotypes. Last years the part of resistant strains in the majority of field populations was less than 30%. Small number of resistant strains in population occurs even if there was no treatment with metalaxyl—containing preparations during a long time. In some populations the frequency of resistant strains increased, it would be connected with treatments. A variation in the level of resistance to metalaxyl in one clonal lineage is shown. Resistant strains occurred in potato leaves and tubers, in tomato leaves; they were rare in tomato fruits. Probably, the sensitive strains affecting fruits have selective advantage.

More than 370 strains from different regions were tested for resistance to dimethomorph. In several fields isolates were collected after treatment with dimethomorph—containing preparations. Resistant strains were not detected.