

УДК 582.28:581.9

МЕТОДОЛОГИЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КУЛЬТУР *PHYTOPHTHORA INFESTANS* (MONT.) DE BARY

Мария Дмитриевна Говердовская, Олеся Анатольевна Брагина,
Ирина Анатольевна Лыско

ФГБНУ Федеральный научный центр риса
350921, Россия, Краснодарский край, город Краснодар, поселок Белозерный, 3
E-mail: shagina-95@mail.ru

Фитофтороз является одной из наиболее вредоносных и распространенных болезней на территории России и в других странах мира, потери от которой достигают 90-100% урожая в эпифитотийные годы. Особенно важно знать особенности природной популяции гриба и вирулентность рас в каждом отдельно взятом регионе выращивания пасленовых культур. В работе использовали методы визуальной и иммунологической диагностики, фитопатологического наблюдения развития болезни. В процессе онтогенеза описаны симптомы проявления фитофтороза на растениях томата. В лабораторных условиях проведены исследования по изучению методов выделения и сохранения жизнеспособности *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary при различных способах хранения. Приведен сравнительный анализ наиболее эффективных методов сохранения жизнеспособности патогена: хранение на ломтиках картофеля, на питательных средах в чашках Петри, в пробирках и на семенах ржи. Осуществлен расчет процента жизнеспособности *P. infestans* в контрольные периоды (7 дней, 3 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев). Изученные методы показали высокую жизнеспособность протестированных изолятов *P. infestans* в течение 6 месяцев при температуре 6-8°C, не оказывая существенного влияния на ростовые и морфологические характеристики изолятов. Установлено, что наиболее долговременным способом сохранения спорообразующей способности *P. infestans* томатов является метод семян ржи, средний процент выживаемости спор *P. infestans* составил 65%. Эти данные имеют весомое значение для борьбы с фитофторозом томатов и будут полезными при научно-исследовательских работах, связанных с изучением этого патогена.

Ключевые слова: фитофтороз; патоген; томаты; выделение; сохранение; питательные среды

Введение

Фитофтороз наносит огромный урон сельскому хозяйству во всем мире, приводит к значительным экономическим потерям. Вид *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary – первый определенный представитель этого рода, один из опаснейших патогенов, потери от которого по данным многочисленных исследований составляют до 90-100% урожая в эпифитотийные годы [17, 19].

Фитофтороз томата распространен повсеместно и зарегистрирован почти в 100 странах мира. В России заболевание отмечено в центральных, южных, северных, дальневосточных и высокогорных регионах. Максимальная степень вредоносности отмечается в зонах с умеренным климатом и повышенной влажностью [3, 10, 18].

Описано не менее 100 видов фитофторы, поражающих широкий спектр видов растений. Популяция фитофторы гетерогенна и представлена многочисленными расами, различными типами спаривания, что приводит к быстрой адаптации патогена и появлению новых, более агрессивных и устойчивых рас [13, 14, 16].

Основными факторами, определяющими развитие фитофтороза, являются низкая температура воздуха и резкие колебания ее в течение суток, что способствует образованию повышенной влажности воздуха и капельно-жидкой влаги на растениях. Инкубационный период развития фитофтороза на растениях томатов составляет 3-4 дня при оптимальной температуре для прорастания спорангиев 13-24°C и относительной влажности воздуха 80-90% [5, 11].

Первые признаки фитофтороза проявляются на нижних листьях растения и постепенно распространяются вверх. К таким симптомам относятся: беловатый налет на стеблях и листьях, сопровождаемый темными пятнами; появление пятен на плодах и опадение листьев; потемнение стеблей; выпадение цветов и листьев; гниение плодов и их деформация. Заболевание развивается быстро и за несколько дней может поразить всю рассаду.

К источникам первичной инфекции относятся пораженные этим возбудителем посадки томата, а также ооспоры, сохраняющиеся в почве и растительных остатках [6, 12]. Ооспоры способны выживать в течение 3-4 лет при низких температурах [19].

Таким образом, возникает необходимость в изучении природной популяции гриба и вирулентность рас для отслеживания устойчивости районированных сортов томатов и проведения селекции на устойчивость к этому возбудителю. Но для проведения исследований в лабораторных условиях необходимы эффективные методы выделения и сохранения возбудителя *P. infestans*, что является главной целью данной работы.

Материал и методика исследований

Исследования проводили в лаборатории иммунитета и защиты растений и на овощном сортоиспытательном участке ФГБНУ «Федеральный научный центр риса» (г. Краснодар). Материалом исследований являлись коллекционные и селекционные образцы томата селекции отдела овощекartофелеводства ФГБНУ «Федеральный научный центр риса».

В течение вегетации осуществляли визуальную оценку общего состояния и пораженности фитофторозом растений томата в природно-климатических условиях Краснодарского края.

Учет поражения растений *P. infestans* проводили в динамике, начиная с первого появления симптомов (I декада июня).

Выделение патогена осуществляли путем закладки пораженных участков растений во влажную камеру и методом «контактных стекол», раскладки частей листьев и стебля на агаризованную среду [7].

С целью накопления инфекционного материала возбудителя *P. infestans* использовали классические методы культивирования и хранения изолятов *P. infestans*, адаптированных для лаборатории иммунитета и защиты растений [1, 2, 4, 8, 9, 15]:

Метод выделения и хранения *P. infestans* на ломтиках картофеля. Стерильные картофельные диски (сорт Голландка) помещали в чашки Петри, создавая условия влажной камеры, между дисками раскладывали пораженные фитофторозом части растения и инкубировали в течение 5-7 суток, затем проросший мицелий микроскопировали (определяли идентичность *P. infestans*) и пересевали чистую культуру на свежие ломтики картофеля, помещенные чашки Петри и выдерживали 3-5 дней при температуре 18°C. Затем чашки отправляли на хранение в холодильник при температуре 4-6°C. Пересев производили каждые 8-10 дней.

Овсяная среда. Для приготовления этой среды использовали 60 г овсяных хлопьев, 10 г глюкозы, 20 г агара на 1 литр дистиллированной воды.

Питательная среда на основе томатного сока. Состав питательной среды включает в себя 20% сока, 0,04% CaCO₃ и 2% агара. Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали в течение 20 минут. После чего смесь отстаивали, удаляли осадок и добавляли дистиллированную воду с агаром. Автоклавирование проводили при 120°C в течение 20 минут.

Морковная среда. При приготовлении среды к экстракту моркови объемом 400 мл добавили 20 г агара и довели объем до 1 л дистиллированной водой.

Картофельно-глюкозная питательная среда. Для приготовления этой среды использовали экстракт картофеля, 20 г глюкозы, 20 г агара на 1 л дистиллированной воды.

Среда Чапека-Докса. В состав среды входит нитрат натрия в качестве единственного источника азота. В одном литре дистиллированной воды растворяли 45,4 грамма среды путем кипячения в течение одной минуты с частым помешиванием до полного растворения. Затем раствор стерилизовали в автоклаве при температуре 121 °С в течение 15 минут.

Следующий способ хранения *P. infestans* на твердых питательных средах в пробирках.

Метод посева на «скошенный» агар. Для хранения *P. infestans* в коллекции готовили пробирки со «скошенным» агаром. На пробирки надевали пробки и автоклавировали при 1 атм. 1,5 часа. После автоклавирования в пробирки наливали питательную среду и раскладывали горячими на бортик подноса для получения скоса среды примерно на 45° до застывания агара. Для сохранения культуры использовали растительное масло. Предварительно масло стерилизовали при давлении 1 атм. 20 минут. Масло наливали в пробирку таким образом, чтобы оно покрывало не только скос агара, но и находилось примерно на 2 см выше.

Метод посева на семена ржи. Предварительно очищенные зерна ржи тщательно промывали и высушивали в теплой воде. Высушенные зерна засыпали в пробирки объемом 150 мл, по 20 г зерен в каждую пробирку, и заливали 30 мл дистиллированной воды. Пробирки закрывали пробками и ставили в автоклав для автоклавирования в течение 2 часов при давлении 1,5 атм. Для посева грибов на стерильную рожь использовали суспензию, приготовленную из мицелия, выделенного из пораженных частей листа томата. По 20 мл суспензии наливали в пробирку с зернами. Пробирки с изолятом культивировали при температуре 18°С, в течение 7-10 дней. Затем оставляли на хранение при температуре 6-8°С.

Для определения наиболее эффективного способа хранения *P. infestans* оценку проводили в контрольные периоды – 7 дней, 3 месяца, 6 месяцев и 12 месяцев. Для расчета среднего количества спорангиев *P. infestans* в поле зрения микроскопа использовали микроскоп Nikon eclipse 50i при увеличении 20х. Морфологию колонии *P. infestans*, мицелия и спорангий изолята наблюдали при каждом способе хранения.

Результаты и обсуждение

Гидрометеорологические условия вегетационного периода томатов характеризовались умеренными температурами и обилием осадков (в 2-3 раза превышающими среднемноголетнюю норму). Максимальное значение влажности (81,3%) зафиксировали в третьей декаде мая в период бутонизации томатов. Эти факторы способствовали распространению и развитию патогенов фитофтороза.

Таблица 1

Метеорологические условия в период вегетации томатов

Месяц	Декада	Температура воздуха, °С		Осадки, мм		Относительность влажности воздуха, %
		2023 год	средняя многолетняя	2023 год	средняя многолетняя	
Май	1	13,4	15,0	59,4	18	78,5
	2	16,3	16,8	1,8	19	63,0
	3	19,6	18,5	65,2	20	81,3
За месяц		16,4	16,8	126,4	57,0	74,3
Июнь	1	20,6	19,5	67,0	22	72,0
	2	21,6	20,4	66,8	23	79,4
	3	23,0	21,3	20,4	22	61,6
За месяц		21,7	20,4	154,2	67,0	71,0

В результате мониторинга овощного сортоиспытательного участка на культуре томата было выявлено эпифитотийное развитие возбудителя фитофтороза. Первые симптомы фитофтороза были обнаружены в первой декаде июня во время цветения томатов. Симптомы заболевания проявлялись в виде небольших расплывчатых пятен бурого цвета на нижних листьях куста, которые быстро некротизировались и высыхали (рис. 1).



Рис. 1 Растения томата, пораженные фитофторозом

При этом с нижней стороны листьев отмечались темные мокнущие пятна, окруженные белым кольцом спороношения. Беловатый налет с нижней стороны пятна на листе представляет собой спорангий грибоподобного организма. На стеблях и черешках наблюдались крупные, вытянутые вдоль темно-бурые пятна, иногда с налетом. Зачастую первичные очаги сливались, что приводило к обширному некрозу и гнилоственному внешнему виду. Влажная и жаркая погода способствовали быстрому распространению заболевания [3].

Таблица 2

Оценка полевой устойчивости к фитофторозу образцов томата

№ п/п	Образец	Устойчивость, %
Относительно устойчив		
1	ЛК 2898	42,7
2	ЛК 3000	37,1
Средневосприимчив		
3	УФВ 58х60	32,8
4	ЛК-3017	29,4
Восприимчив		
5	БЛ-19	18,1
6	БЛ-4	12,5
7	БЛ-92	13,8

Продолжение таблицы

8	БЛ-92/1	19,8
9	БЛ-79	22,2
10	БЛ-57	19,4
11	БЛ-76	24,0
12	БЛ-72	18,3
13	24х61	25,0
14	ЛК-3020	12,3
15	ЛК-3022	20,0
16	ЛК-3028	15,0
17	ЛК-3030	11,2
Высоко восприимчив		
18	БЛ-75	7,3
19	БЛ-75/1	10,0
20	БЛ-55	10,0
21	БЛ-82	7,2
22	БЛ-1	5,3
23	УФВ 54х60	10,0
24	ЛК-3018	8,3
25	ЛК-3019	6,8
26	ЛК-3021	1,3
27	ЛК-3023	4,9
28	ЛК-3024	8,7
29	ЛК-3025	6,3
30	ЛК-3026	5,5

На рисунке 2 представлен график интенсивности развития болезни образцов томата.

Иммунологическая оценка устойчивости коллекционных и селекционных образцов томата в полевых условиях проводили морфологическим способом. Она показала, что основная часть изученных образцов томатов восприимчивы и высоко восприимчивы к поражению возбудителем фитофтороза. При этом показатель устойчивости растений составил 17,8 и 7,0% от числа изученных образцов соответственно.

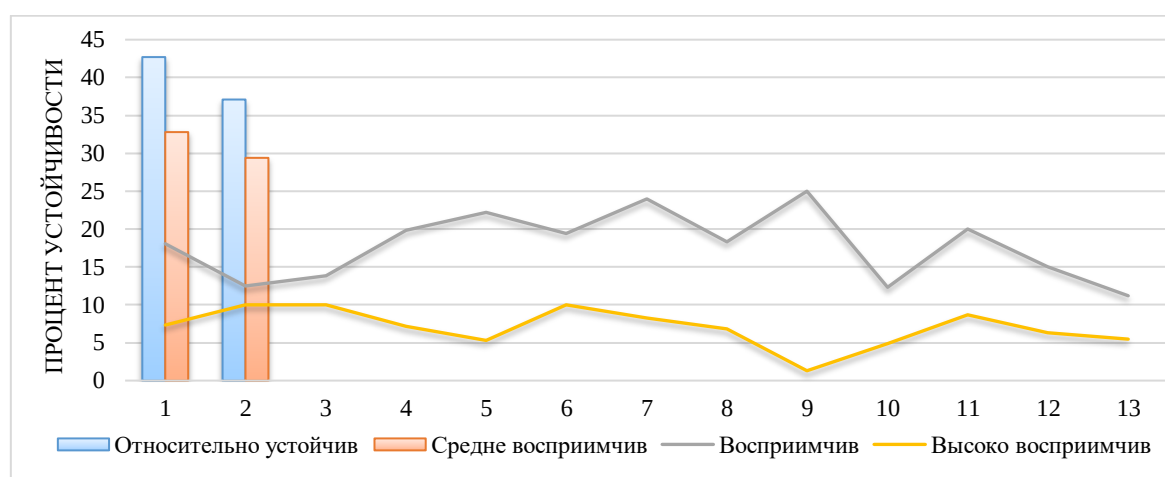


Рис. 2 График устойчивости образцов томата

Из растений томата с симптомами заболевания выделили патоген путем закладки пораженных участков во влажную камеру и методом «контактных стекол», раскладки частей листьев и стебля на агаризованную среду. Инкубационный период

составил 7 суток, при температуре 18⁰С, далее образцы были помещены в камеру искусственного климата. На рисунке 3 представлены выделенные зооспорангии *P. infestans* под микроскопом.



Рис. 3 Спорангии и мицелий *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 20х, Nikon eclipse 50i

Проведен сравнительный анализ различных методов хранения *P. infestans* в лабораторных условиях.

Все четыре метода (метод выделения и хранения *P. infestans* на ломтиках картофеля; метод посева на «скошенный» агар; метод посева на семена ржи; метод хранения на питательных средах: овсяная среда, питательная среда на основе томатного сока, морковная среда, картофельно-глюкозная питательная среда, полусинтетическая среда Чапека-Докса); обеспечивали высокую выживаемость изолятов *P. infestans* (рис. 4-7).



Рис. 4 Метод хранения *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary на ломтиках картофеля

При методе хранения на ломтиках картофеля выживаемость изолятов *P. infestans* сохранялась до 6 месяцев.

Для быстрого роста и образования обильного спороношения рекомендуются применять овсяную среду. Эта среда идеально подходит для проведения масштабных опытов с заражением растений. Для выделения активного мицелия фитопатогенов также использовали посев на среду картофельно-глюкозного агара (КГА). На рассмотренных питательных средах фитофтора сохраняла жизнеспособность при температуре 6-8°C до 6 месяцев.

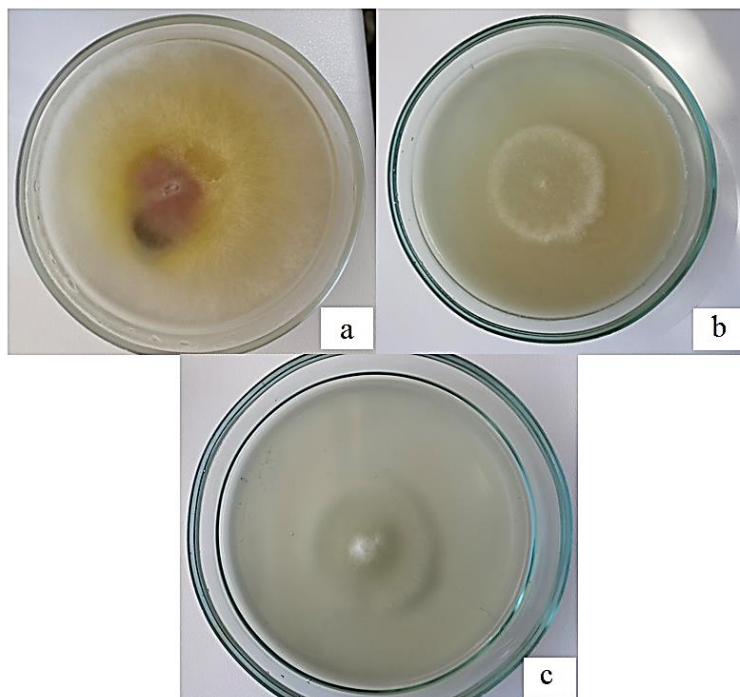


Рис. 5 Метод хранения *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary на питательных средах (а – овсяный агар, б – картофельно-глюкозный агар, с – среда Чапека- Докса)

Более длительное сохранение обеспечивается при развитии гриба на агаризованных синтетических средах. В наших исследованиях была использована полусинтетическая среда Чапека-Докса, в которой срок хранения *P. infestans* достигал до 9 месяцев при температуре 6-8°C.



Рис. 6 Метод хранения *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary в пробирках на твердых питательных средах

При хранении *P. infestans* на твердых питательных средах в пробирках фитогфтора сохраняла свою жизнеспособность около 9 месяцев.

При использовании метода семян ржи наблюдали заметный рост грибов на 7-10 день после посева. Срок хранения составлял до 12 месяцев при температуре 6-8°C.

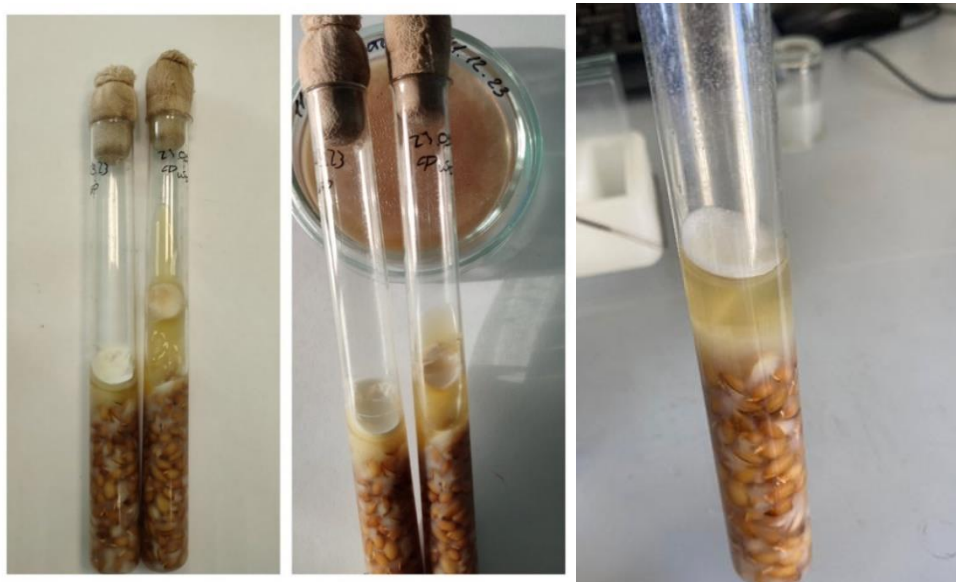


Рис. 7 Метод хранения *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary на семенах ржи

В таблице 3 представлены показатели жизнеспособности *P. infestans* в зависимости от способа хранения.

Таблица 3

Жизнеспособность изолятов *P. infestans* сохраненных различными способами консервирования в течение различных сроков хранения

Срок хранения	Метод хранения			
	На ломтиках картофеля	На питательных средах	В пробирках	На семенах ржи
Среднее количество спорангиев в поле зрения микроскопа, шт				
7 дней	35	20	10	0
3 месяца	24	18	8	0
6 месяцев	28	25	10	5
9 месяцев	40	35	25	18
12 месяцев	35	20	10	0
Процент выживаемости <i>P. infestans</i> , %				
7 дней	100%	100%	100%	100%
3 месяца	57,14%	75%	89,29%	87,5%
6 месяцев	28,57%	33,33%	35,71%	62,5%
9 месяцев	0%	0%	17,86%	45%
12 месяцев	0%	0%	0%	30%
Средний процент выживаемости <i>P. infestans</i> , %	37%	42%	49%	65%

Из представленных данных следует, что все четыре метода поддерживали высокую жизнеспособность протестированных изолятов *P. infestans* в течение 6 месяцев при температуре 6-8°C. Наибольший средний процент выживаемости *P. infestans* выявлен методом семян ржи, который составил 65%.

Заключение

Таким образом при изучении всех четырех методов хранения изолятов *P. infestans* наиболее долговременным способом оказался метод семян ржи. Применение этого метода позволило сохранить спорообразующую способность, выделенной *P. infestans* томатов на протяжении 12 месяцев. Важно отметить, что все методы хранения *P. infestans* не оказывали существенного влияния на ростовые и морфологические характеристики изолятов. В связи с этим рекомендуется использовать несколько различных методов хранения для обеспечения безопасности и стабильности изолятов *P. infestans* для проведения дальнейших научно-исследовательских работ, связанных с изучением этого патогена.

Работа выполнена в соответствии с заданием № FGRG-2022-0010 «Разработка стратегии иммунитета растений риса и овощных культур для усиления селекции на устойчивость к опасным болезням».

Список литературы

1. Азимова Н.Ш., Есенова Д.Б., Хамидова Х.М., Халилов И.М., Кобилев Ф.Б., Мардонов И.Х. Выделение и определение вирулентности местного штамма гриба *Phytophthora infestans* из клубней картофеля // *Universum: химия и биология: электронный научный журнал*. – 2021. – №10(88).
2. Бабак О.Г. Оценка и применение молекулярных маркеров в селекции на устойчивость томата (*Solanum Lycopersicum* L.) к фитофторе (*Phytophthora Infestans*) // *Молекулярная и прикладная генетика*. – 2021. – №31. – С. 22-30.
3. Брагина О.А. Мониторинг развития фитофтороза на томатах в условиях центральной зоны Краснодарского края // *Рисоводство*. – Краснодар, 2023. – №3(60). – С. 76-82.
4. Васильченко В.В., Смирнов А.Н. Краткосрочная жизнеспособность возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля в лабораторных условиях // *Достижения науки и техники АПК*. – 2018. – №6. – С. 49-52.
5. Жученко А.А. Адаптивный потенциал культурных растений: (Эколого-генетические основы). – 1988 – Кишинев: Штиинца. – 766 с.
6. Закутнова В.И., Пилипенко Н.В., Закутнова Е.Б. История изучения *Phytophthora infestans* de Bary закрытого грунта в мировой практике и России // *Астраханский вестник экологического образования*. – 2013. – №2 (24). – С. 137-141.
7. Зотеева Н.М., Косарева О.С. Оценка устойчивости сортов картофеля из коллекции ВИР к фитофторозу (*Phytophthora infestans*) в полевом и лабораторном изучении // *Вестник защиты растений*. – 2021. – №2. – С. 113-119.
8. Коваль Э.З., Горбик Л.Т. Микроскопическое изучение грибов. В кн.: Методы экспериментальной микологии. Справочник. Под ред. В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1982. – 551 с.
9. Кошелева И.П. Селекция растений на устойчивость к болезням и вредителям. – Пенза: Пензенский государственный аграрный университет. – 2023. – 91 с.
10. Левитин М.М. Современные видовые названия фитопатогенных грибов // *Защита и карантин растений*. – 2018. – №38. – С. 8-11.
11. Нековаль С.Н. Оценка устойчивости коллекционных образцов томата к фитофторозу *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary // *Биологическая защита растений – основа стабилизации агроэкосистем*. – Краснодар, 2016. – С. 441-443.
12. Смирнов А.Н., Кузнецов С.А. Определение стратегий размножения и жизнеспособности полевых популяций *Phytophthora infestans* // *Защита и карантин растений*. – 2006. – № 9. – С. 30-31.
13. Akilli S. Involvement of *Phytophthora* spp. in chestnut decline in the Black Sea

region of Turkey // Forest Pathology. – 2012. – № 42. – P. 377-386.

14. Camilo-Alves C.S. Decline of Mediterranean oak trees and its association with *Phytophthora cinnamomi*: a review // European Journal of Forest Research. – 2013. – № 132. – P. 411-432.

15. Haichen C. Simple and inexpensive long-term preservation methods for *Phytophthora infestans* // Microbiol Methods. – 2018. – Vol. 152. – P. 80-85. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.07.020.

16. Harwood T.D. Epidemiological risk assessment using linked network and grid based modelling: *Phytophthora ramorum* and *Phytophthora kernoviae* in the UK // Ecological Modelling. – 2009. – Vol. 220. – №. 23. – P. 3353-3361.

17. Ivanov A.A. *Phytophthora infestans*: An Overview of Methods and Attempts to Combat Late Blight // Fungi (Basel). – 2021. – Vol. 7(12). – P. 1071. DOI: 10.3390/jof7121071.

18. Khamiraev U. *Phytophthora* Potato Disease and Measures to Combat with It in Uzbekistan // XV International Scientific Conference «INTERAGROMASH 2022» Global Precision Ag Innovation 2022. Cham: Springer International Publishing. – 2023. – Vol. 2. – P. 2168-2178.

19. Nowicki M. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding // Plant disease. – 2012. – Vol. 96. – №. 1. – P. 4-17.

Статья поступила в редакцию 10.07.2024 г.

Goverdovskaya M.D., Bragina O.A., Lysko I.A. Methodology of isolation and long-term storage of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary cultures // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. – № 154. – P. 105-114

Late blight is one of the most harmful and widespread diseases in Russia and other countries of the world, losses from which reach 90-100% of the harvest in epiphytotic years. It is especially important to know the characteristics of the natural population of the fungus and the virulence of the races in each individual region where nightshade crops are grown. The work used methods of visual and immunological diagnostics, phytopathological observation of the development of the disease. In the process of ontogenesis, the symptoms of late blight on tomato plants are described. Studies have been carried out in laboratory conditions to study methods for isolating and preserving the viability of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary under various storage methods. A comparative analysis of the most effective methods for preserving the viability of the pathogen is provided: storage on potato slices, on nutrient media in Petri dishes, in test tubes and on rye seeds. The percentage of viability of *P. infestans* was calculated during control periods (7 days, 3 months, 6 months and 12 months). The methods studied showed high viability of the tested *P. infestans* isolates for 6 months at a temperature of 6-8°C, without significantly affecting the growth and morphological characteristics of the isolates. It was found that the most long-term way to preserve the spore-forming ability of *P. infestans* in tomatoes is the rye seed method; the average survival rate of *P. infestans* spores was 65%. These data are of significant importance for the fight against late blight of tomatoes and will be useful in research work related to the study of this pathogen.

Key words: late blight; pathogen; tomatoes; isolation; preservation; nutrient media