

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы** (пәнаралық) = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный). - 2019. - №3 (102). - С.185-193

ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПЕРТИЗА СЕМЕННОГО МАТЕРИАЛА ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР СЕВЕРНОГО И ЦЕНТРАЛЬНОГО КАЗАХСТАНА

*Смагулова А.М., Никулина А.И.,
Киян В.С.*

Аннотация

Авторы статьи на основе собственных исследований доказывают, что фитосанитарное состояние семян зерновых культур влияют на качество и количество будущего урожая. В статье представлены результаты фитопатологической экспертизы на наличие в зернах злаковых культурах наличие патогенных грибов и бактериальной обсемененности с четырех областей Северного и Центрального Казахстана. По результатам исследований было выявлено, что семена заражены альтернариозом, гельминтоспориозом, фузариозом, бактериозом, а так же было выявлено наличие сапрофитной обсемененностью. Идентификацию полученных культур проводили по культуральным особенностям роста колоний грибов и бактерий, а так же морфологическим признакам с помощью микроскопических методов исследований мазков, а для подтверждения видовой принадлежности проводили молекулярно-генетические исследования на основе геномного участка *ITS1*.

Ключевые слова: фитосанитарный анализ, зерновые культуры, грибковая обсемененность, бактериальная обсемененность, альтернариоз, гельминтоспориоз, фузариоз, бактериоз, микроскопия, молекулярно-генетическое исследование.

Введение

Мы живем в эпоху, когда изобилие продуктов питания и сельскохозяйственной продукции принимается как нечто обычное и даже, в большей степени, должное. Несмотря на неуклонный рост населения, работники сельского хозяйства, прикладывают максимум усилий для того, чтобы

производить достаточное количество продукции для обеспечения растущих потребностей в продовольствии. Тем не менее, вопросы продовольственной безопасности все еще остаются очень важными и не должны позволять ослаблять нашу работу и усилия. Болезни и вредители сельскохозяйственных

культур представляют большую угрозу продовольственной безопасности, особенно для пшеницы, которая обеспечивает 20% всех потребляемых в мире калорий [1].

В последнее время, в связи с существующими системами земледелия, многообразием сортов и последствиями изменения климата нагрузка от болезней на зерновые культуры все больше возрастает. Болезни растений приводят к потерям урожая в среднем 20% зерна. Среди патогенной микрофлоры зерновых культур семенная инфекция занимает особое место. Общеизвестно, что с семенами распространяется более 60% всех возбудителей болезней зерновых культур [2].

По данным ученых международного центра СИММИТ на пшенице встречаются 25 грибных, 3 бактериальных, 1 вирусное, 3 нематодных, 4 физиолого-генетических болезней и 8 заболеваний, обусловленных недостатком минерального питания и другими абиотическими факторами. Видовой состав возбудителей болезней озимой и яровой пшеницы особо не различается, за исключением отдельных. Она поражается четырьмя видами головни, тремя ржавчинами, мучнистой росой, септориозом и гельминтоспориозными пятнистостями, корневыми гнилями, альтернариозом и фузариозом. На этой культуре

встречаются: бактериальные, желтые или слизистые, базальные и вирусные болезни [3].

Как известно, семена являются источником и участвуют в передаче инфекций многих болезней растений. Основными патогенами пшеницы, передающимися семенами, являются возбудители пыльной, твердой и карликовой головни, септориоза, гельминтоспориозной (*Bipolaris sorokiniana*) и фузариозной (виды *Fusarium*) корневых гнилей и бактериоза. Кроме того, в период формирования, уборки и хранения семена заселяются многочисленными эпифитными и сапрофитными грибами, в т.ч. *Alternaria*, *Cladosporium*, *Trichotecium* и др., а также плесневыми – виды *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*. Последние интенсивно развиваются при высокой влажности семян (15-16%) и снижают полевую их всхожесть. Возбудители «черного зародыша» пшеницы грибы *A. tenuis* и *A. alternata*. Первый вид существенно не влияет на посевные качества семян и технологические свойства муки в связи с его локализацией в плодовой оболочке, а второй проникает глубже, поражая зародыш и снижает всхожесть [4].

Группа фитопатогенных микроорганизмов, поражающих зерна, разнообразна. В настоящее время известно, что среднемировой уровень потерь урожая вследствие поражения посевов фитопатогенными микроорганизмами оценивается в

пределах 15–20%. Из всех известных ныне инфекционных болезней растений 83% вызываются грибами, 9% – вирусами и 7% – бактериями [5, 6]. Среди микроорганизмов, заселяющих семена зерновых культур, встречаются как сапротрофные, так и патогенные формы, многие из которых являются фитотоксичными. Сапротрофные микроорганизмы выявляются почти во всех партиях семян и численно преобладают. В определенных условиях некоторые из них переходят к паразитированию, частично или полностью разрушая зерно, изменяя его физические свойства и состав. Особенно значительный вред сапротрофы наносят в период хранения зерна, снижая его качество и даже вызывая гибель.

Фитопатологическая экспертиза семян имеет немаловажное значение. Суть фитоэкспертизы заключается в определении в лабораторных условиях состава патогенов,

Материалы и методы исследования

Объектом исследования послужил семенной материал 15 хозяйств из 4 областей Казахстана на общей площади 609 тысяч гектар (рисунок 1). Были проанализированы следующие виды сельскохозяйственных культур: яровая мягкая пшеница (класс элита, 1 и 2 класса), яровая твердая пшеница (класс супер

передающихся с посевным материалом. С практической точки зрения эта информация помогает не только правильно выбрать протравитель, но и подойти к протравливанию дифференциально, т.е. при недостатке средств защиты перераспределить их, обратив внимание на наиболее сильно зараженные партии семян [7].

В связи с изложенным необходимо определение зараженности семян инфекционными зачатками возбудителей болезней. Они присутствуют в виде примесей к семенам: телиоспор головни, конидий грибов, клеток и спор бактерий. Наиболее распространенными методами фитоэкспертизы семян являются визуальный, центрифугирование, биологический, бактериологический и анатомический анализы. В отдельных случаях применяют серологический и люминесцентный методы [8].

элита, элита, 1 и 2 репродукция), ячмень (класс супер элита, элита, 1-ая репродукция), овёс (класс супер элита, элита, 3-я репродукция).

Семенной материал отбирался и доставлялся в лабораторию сотрудниками кафедры «Защиты и карантин растений».



Рисунок 1 – Карта областей, в которых проводили отбор изучаемого материала зерновых культур

При анализе семян использовался ГОСТ 12044-93, в частности биологический метод [9], который применяют для выявления внешней и внутренней зараженности семян болезнями. Он основан на стимуляции развития и роста микроорганизмов в зараженных семенах. Зараженность семян определяли при проращивании их на питательных средах: картофельно-глюзный агар (20 г картофельный экстракт, 2 г глюкоза, 2 г агар-агар, 1000 мл дистиллированной воды) и среда Чапека (30 г сахарозы, 1 г K_2HPO_4 , 0,5 г $MgSO_4$, 0,5 г KCl , 0,01 г $FeSO_4$, 15 г агар-агар, 1000 мл дистиллированной воды). Перед посевом проводили пробоподготовку. Семена промывали струей воды под водопроводным краном в течение 1-2 ч и дезинфицировали 96%-ным спиртом в течение 1-2 мин. Затем

семена промывали в стерильной воде и просушивали между листами стерильной фильтровальной бумаги. Семена помещали в чашки Петри по 10 шт. и ставили их для проращивания в термостат при температуре 22-25°C. В течение всего периода исследования проводили ежедневный контроль.

Морфологическую идентификацию проводили методом придавленной капли. Суть метода заключается в том, что на предметное стекло в небольшое количество воды вносится мицелий гриба, сверху накрывается покровным стеклом, так, чтобы не образовывался воздух. Затем просматривается под микроскопом при увеличении в 20 раз.

Для подтверждения морфологической идентификации, дополнительно была проведена

молекулярно-генетическая идентификация.

Для выделения ДНК наращивается биомасса гриба в течение 3 суток на жидкой питательной среде Сабуро при 28°C, с добавлением витаминов и антибиотиков. Биомасса отделяется от культуральной жидкости, биомасса переносится в ступки с пестиком и растирается в жидком азоте, до образования однородной массы. Затем инкубируют в термостате при 55°C в течение 1,5 часа. По истечении времени пробирки убирают с термоблока и дают остыть до комнатной температуры. Далее в пробирки добавляют 600 мкл фенол-хлороформ-изоамил в соотношении 25:24:1. Образцы центрифугируют в течение 5 мин при 10000 об/мин. Затем к осадку добавляют 380 мкл изопропанола (10 мин при -20°C) и центрифугируют в течение 5 мин при 12 000 об/мин. Полученный осадок ДНК промывают 75% этанолом, высушивают, после чего растворяют в 50 мкл 1% *TE* буфера. На конечном этапе проводится измерение концентрации ДНК на приборе *NanoDrop* [10].

Аmplификацию маркерных генов проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 1× Phusion HF-буфер, 2,5 mM MgCl₂, 1U Phusion ДНК-полимеразу и 200 мкМ dNTP (*New England BioLabs Inc.*), 25 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного

Результаты исследования

Первым этапом фитопатологической экспертизы – подготовка семян к посеву на

образца. ПЦР проводили при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 50 с, 65°C в течение 50 с, 68°C в течение 7 мин, и окончательная элонгация 5 мин при 72°C. Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1% агарозном геле с использованием 1×*TAE* буферного раствора и *EtBr*. Параметры протекания электрофореза – 120V, 250 мА, 50W, время реакции – 30 мин.

Аmplифицированные фрагменты ДНК секвенируют с помощью метода Сэнгера с использованием набора для определения последовательности терминатора *BigDye* в соответствии с техническими характеристиками производителя.

Последовательности праймеров используют такие же, как и для ПЦР. Для обеспечения точности секвенирования амплифицированные фрагменты секвенируют с двумя праймерами: прямым (*ITS 4 TCCT-CCGC-TTAT-TGAT-ATGC*) и обратным (*ITS5 GGAA-GTAA-AAGT-CGTA-ACAA-GG*). Продукты секвенирования изучают на генетическом анализаторе ABI 3130XL (*Applied Biosystems*). Анализ и редактирование хроматограммы проводят с использованием *Sequencing Analysis 5.2, Patch 2* (*Applied Biosystems*).

агаризованные питательные среды. Пробоподготовку и посев проводили по ГОСТу 12044-93.

Анализ результатов проводили на 10-е сутки (рисунок 2).

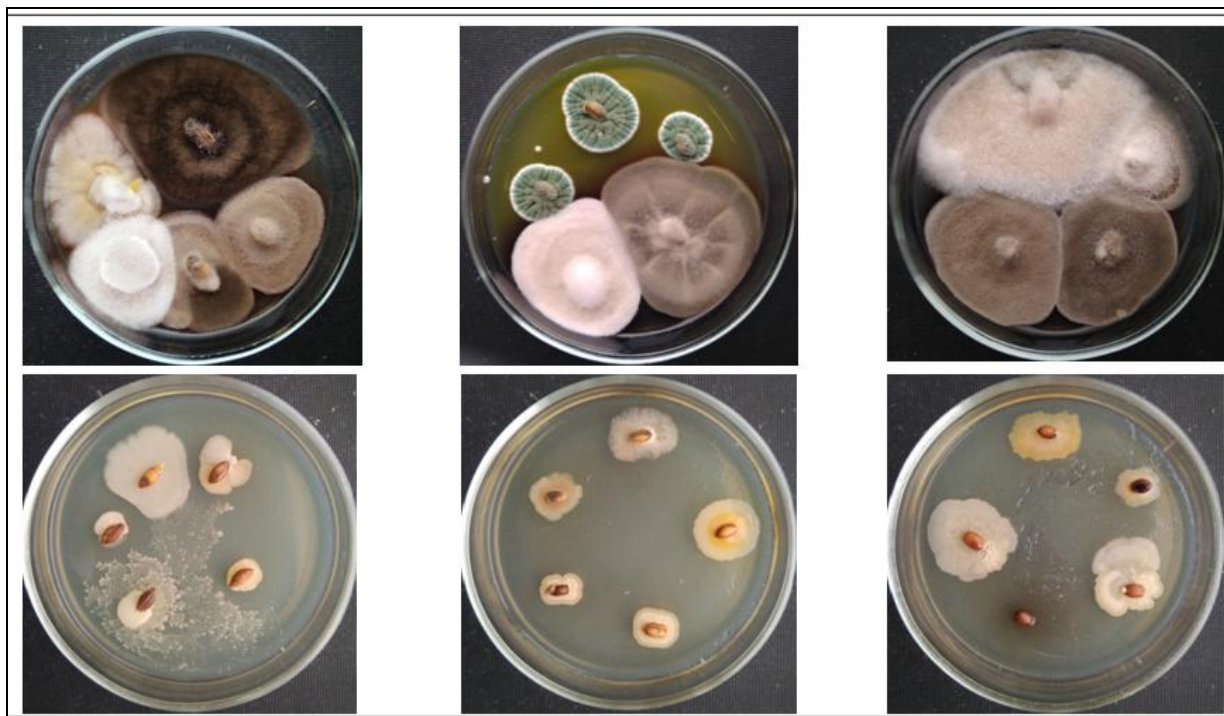
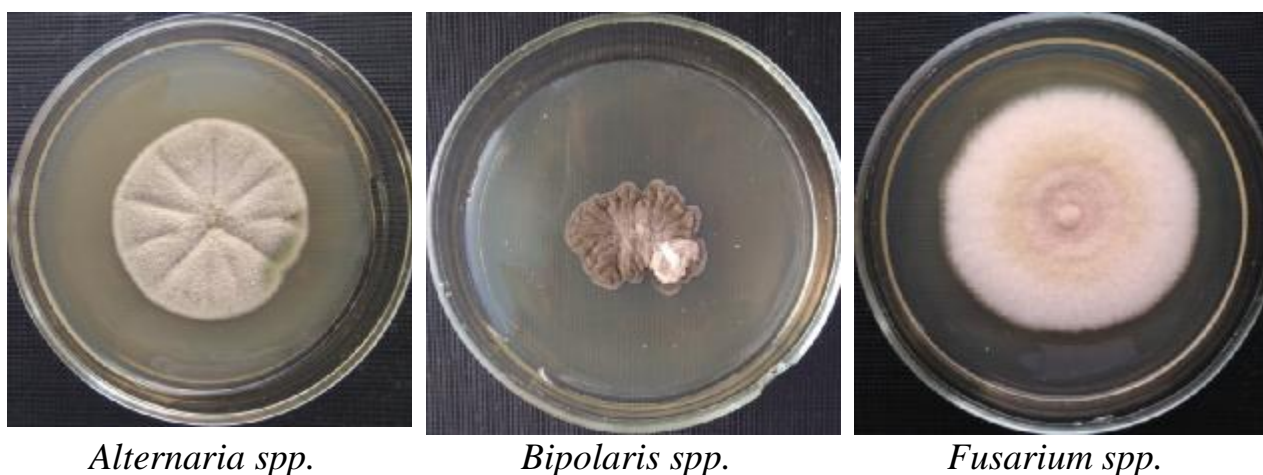


Рисунок 2 – Результаты фитопатологической экспертизы зерновых культур

На рисунке 2 показана грибковая и бактериальная обсемененность семян различных зерновых культур, полученных с разных регионов. На фото изображены основные культуры

грибов и бактерий, часто встречаемых на исследованных зерновых культурах. Для морфологической идентификации грибов выделяли чистые культуры (рисунок 3).



Alternaria spp.

Bipolaris spp.

Fusarium spp.

Рисунок 3 – Чистые культуры грибов

На рисунке 3 изображены сформировавшиеся колонии

чистых культур грибов *Alternaria spp.*, *Bipolaris spp.*, *Fusarium spp.*,

которые по морфологическим признакам отличаются друг от друга.

Alternaria spp. – колония с ровными краями, бархатистая поверхность светло-оливкового цвета, ярко выраженные радиальные борозды от центра к краю колонии, скорость роста умеренная.

Bipolaris spp. – колония с неровными краями, бархатистая поверхность от серой до черного цвета, колония морщинистая, скорость роста умеренная.

с помощью определителей.

Таблица 1 – Результаты микроскопии чистых культур грибов

Микроскопия мицелия	Микроскопия спор	Примечание
		<p>Гифы септированные, от светло- до темно-коричневого цвета. Конидии золотисто-коричневые по 10 или больше в длинных, ветвящихся цепочках. Конидии муральные, с 3-8 поперечными и 1-2 продольными перегородками, гладкостенные или с небольшими выпуклостями.</p>
		<p>Гифы септированные, коричневые. Конидии с 3-9 (обычно 7-8) дистосептами, чаще всего слегка изогнутые, наиболее широкие в середине и сужающиеся к закругленным концам. Прорастание конидии биполярное.</p>

Fusarium spp. – колония с ровными краями, ватообразная поверхность от светло-пурпурного до пурпурного оттенка, поверхность колонии ровная с небольшой возвышенностью в центре, скорость роста умеренная.

Для идентификации грибов и бактерий использовали микроскопическое исследование мазков под микроскопом (таблица 1) и дальнейшее определение видовой принадлежности



В таблице 1 приведена микроскопия и описание морфологических особенностей строения грибов. Полученные грибы являются основными возбудителями заболеваний зерновых культур, таких как:

корневые гнили, стеблевая пятнистость и болезни зародышей.

Идентификацию бактериальной обсемененности проводили микроскопическим исследованием мазков с предварительной окраской по Граму (рисунок 4).



Bacillus spp.



Pseudomonas spp.



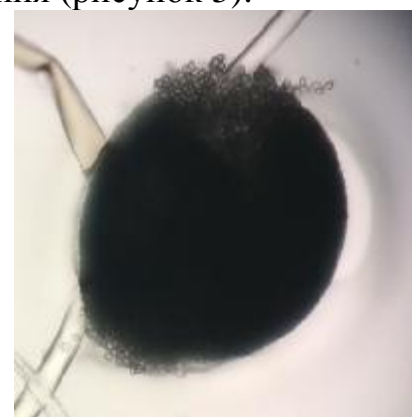
Clostridium spp.

Рисунок 4 – Микроскопия бактерий, выделенных из семенного материала

По результатам микроскопии были определены бактерии *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Clostridium spp.*

Помимо фитопатогенных грибов были обнаружены

сапрофитные плесневые грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, которые были идентифицированы микроскопическим методом исследования (рисунок 5).



Penicillium spp.

Aspergillus spp.

Mucor spp.

Рисунок 5 – Результат идентификации сапрофитных грибов

На основе полученных результатов была предоставлена диаграмма распространности грибковой зараженности по областям (рисунок 5).

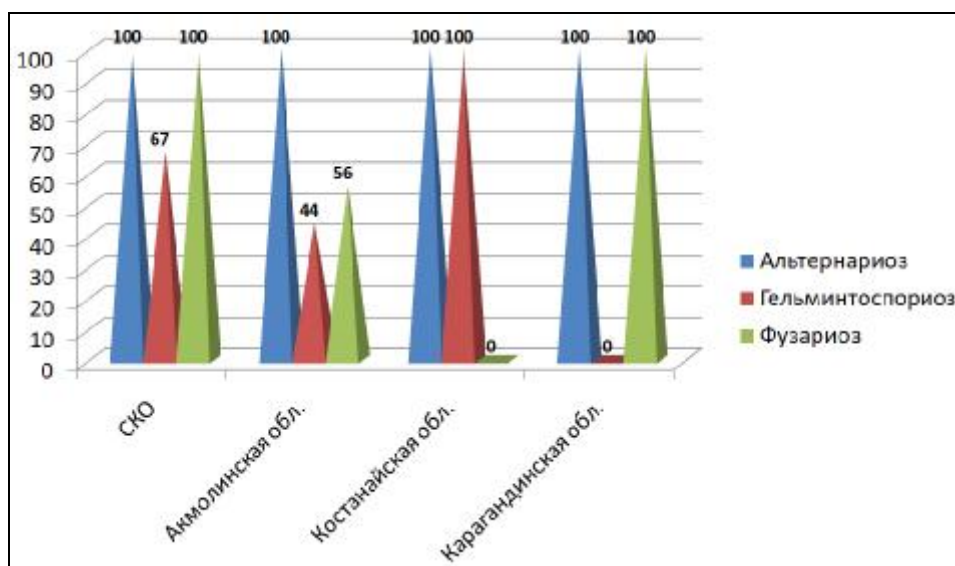


Рисунок 5 – Распространение грибковой зараженности по областям

На рисунке 1 видно, что альтернариоз 100% распространен по всем областям. Гельминтоспориоз: СКО – 67%, Акмолинская обл. – 44%, Костанайская обл. – 100%, Карагандинская обл. – 0%. Фузариоз: СКО – 100%, Акмолинская обл. – 56%, Костанайская обл. – 0%, Карагандинская обл. – 100%.

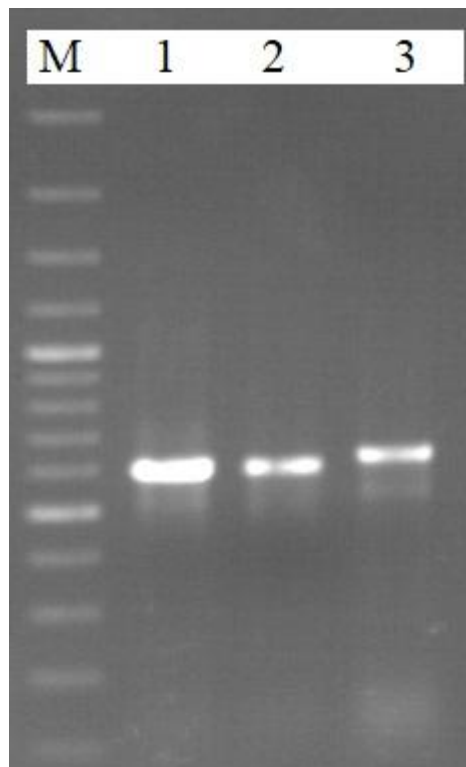
Анализ видовой структуры популяций возбудителей в разных агрозонах Северного и Центрального Казахстана свидетельствует о видовой стабильности грибного патоконплекса на посевах зерновых культур.

Для определения видовой принадлежности грибковой

обсемененности семян проводили молекулярно-генетический анализ. С использованием специфических праймеров ядерного участка *ITS4-ITS5*.

Аmplификацию маркерных генов проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл. ПЦР проводили следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 25 с, 55°C в течение 30 с, 72°C в течение 40 с, и окончательная элонгация 5 мин при 72°C.

Детекцию результатов проводили в 1% агарозном геле с использованием 1×TAE буферного раствора и *EtBr* (рисунок 6).



М – молекулярный маркер 100 bp Gene Ruler (Thermo Scientific, США); 1 – *Alternaria spp.*; 2 – *Bipolaris spp.*; 3 – *Fusarium spp.*

Рисунок 6 – Результат ПЦР анализа

Полученные нуклеотидные последовательности идентифицировали путем сравнения с данными базы *GenBank* (www.ncbi.com), определив видовую принадлежность

Заключение

Таким образом был проанализирован семенной материал 15 хозяйств из 4 областей Казахстана на бактериальную и грибковую обсемененность. В результате исследований были выявлены патологические грибы, которые являются возбудителями таких болезней зерновых культур, как альтернариоз, фузариоз и гельминтоспориоз. Так же были выявлены сопутствующие микроорганизмы, как бактерии: *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*,

патогенных грибов относящиеся к *Alternaria tenuis*, *Bipolaris sorokiniana* и *Fusarium graminearum*.

Clostridium spp. и сапрофитные плесневые грибы родов *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*.

Работа была выполнена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан в рамках программы BR06349506 ПЦФ МСХ РК по теме «Трансферт и адаптация технологий по точному земледелию при производстве продукции растениеводства по принципу «демонстрационных хозяйств (полигонов)» в Северо-

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чулкина В.А., Торопова Е.Ю. Научное и практическое обеспечение защиты растений на пороге XXI века // *Агро XXI*. – 2000. – № 6. – С. 35–40
2. Kamoun S., Talbot N.J., Islam M.T. Plant health emergencies demand open science: Tackling a cereal killer on the run. // *PLoS Biol.* – 2019. – P. 300-302
3. Койшыбаев М. Мониторинг и прогноз развития особо опасных болезней в Казахстане. Материалы третьего Всероссийского Съезда по защите растений. – СПб, 2014. – С.242-245
4. Perkowski J., Kiecana I., Chelkowski J. Susceptibility of barley cultivars and lines to *Fusarium* infection and mycotoxin accumulation in kernels // *J. Phytopathol.* – 1995. – V. 143, No 9. – P. 41–46.
5. Хасанов Б.А., Мостовой В.А., Выприцкая А.А. Болезни яровой пшеницы в Северном Казахстане // *Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана*, 1990, №11. – С.37-42.
6. Richardson M.J. Seed mycology // *Mycol. Res.* – 1996. – V. 100, No 4. – P. 385–392.
7. Олейник А.Т., Рожкова Г.И., Молдахметова Г.Т., Бейшова И.С. Роль защиты растений в сохранении урожайности зерновых культур в условиях Северного Казахстана // *Инновационные технологии в сельском хозяйстве: материалы Междунар. науч. конф. (г. Москва, июнь 2015 г.)*. – М.: Буки-Веди, 2015. – С. 30-32.
8. Чумаков А.Е. и др. Основные методы фитопатологических исследований. – М.: «Колос», 1974. – 189 с.
9. ГОСТ 12044-93. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения зараженности болезнями. – Введ. 1995-01-01. – М.: Изд-во стандартов, 1995. – 152 с.
10. Кашкин П.Н., Лисин В.В. Практическое руководство по медицинской микологии. – Ленинград: Медицина, 1983. – С. 5-111.

REFERENCES

1. Chulkina V.A., Toropova E.Yu. Nauchnoe i prakticheskoe obespechenie zaschityi rasteniy na poroge XXI veka // *Agro XXI*. – 2000. – № 6. – P. 35–40
2. Kamoun S., Talbot N.J., Islam M.T. Plant health emergencies demand open science: Tackling a cereal killer on the run. // *PLoS Biol.* – 2019. – P. 300-302
3. Koyshyibaev M. Monitoring i prognoz razvitiya osobo opasnyih bolezney v Kazahstane. Materialyi tretogo Vserossiyskogo S'ezda po zaschite rasteniy. – SPb, 2014. – P.242-245
4. Perkowski J., Kiecana I., Chelkowski J. Susceptibility of barley cultivars and lines to *Fusarium* infection and mycotoxin accumulation in kernels // *J. Phytopathol.* – 1995. – V. 143, No 9. – P. 41–46.

5. Hasanov B.A., Mostovoy V.A., Vyipritskaya A.A. Bolezni yarovoy pshenitsyi v Severnom Kazahstane // Vestnik selskohozyaystvennoy nauki Kazahstana, 1990, № 11. – P.37-42.

6. Richardson M.J. Seed mycology // Mycol. Res. – 1996. – V. 100, No 4. – P. 385–392.

7. Oleynik A.T., Rozhkova G.I., Moldahmetova G.T., Beyshova I.S. Rol zaschityi rasteniy v sohranenii urozhaynosti zernovyih kultur v usloviyah Severnogo Kazahstana // Innovatsionnyie tehnologii v selskom hozyaystve: materialyi Mezhdunar. nauch. konf. (g. Moskva, iyun 2015 g.). – M.: Buki-Vedi, 2015. – P. 30-32.

8. Chumakov A.E. i dr. Osnovnyie metodyi fitopatologicheskikh issledovaniy. – M.: «Kolos», 1974. – P. 189.

9. GOST 12044-93. Semena selskohozyaystvennyih kultur. Metodyi opredeleniya zarazhennosti boleznyami. – Vved. 1995-01-01. – M.: Izd-vo standartov, 1995. – P. 152.

10. Kashkin P.N., Lisin V.V. Prakticheskoe rukovodstvo po meditsinskoj mikologii. – Leningrad: Meditsina, 1983. – P. 5-111.

PHYTOPATOLOGICAL EXPERTISE OF SEED MATERIAL OF GRAIN CROPS OF NORTH AND CENTRAL KAZAKHSTAN

*Smagulova A.M., Nikulina A.I.,
Kiyasova V.S.*

Summary

The article presents the results of phytopathological examination about the presence of pathogenic fungi and bacterial contamination in four parts of Northern and Central Kazakhstan. Cereals such as spring soft wheat, spring durum wheat, barley and oats were provided for examination. The study was carried out in accordance with the requirements of the interstate standard for microbiological research. According to the results of studies, it was revealed that the seeds are infected with alternariosis, helminthosporiosis, fusariosis, bacteriosis, as well as the presence of saprophytic contamination. Identification of the cultures was carried out according to the cultural characteristics of the growth of colonies of fungi and bacteria, the article provided a detailed description of the formation of colonies. Identification by morphological characters was carried out using microscopy, with a detailed description of the structure of the obtained fungi and bacteria. To confirm the species affiliation, molecular genetic studies were carried out on the basis of the ITS1 genomic region.

Key words: phytosanitary analysis, crops, fungal contamination, bacterial contamination, alternariosis, helminthosporiosis, fusariosis, bacteriosis, microscopy, molecular genetics research.

ҚАЗАҚСТАННЫҢ СОЛТҮСТІГІНДЕ ЖӘНЕ ОРТАЛЫҚ БӨЛІГІНДЕ ДӘНДІ ДАҚЫЛДАРДЫҢ ТҰҚЫМДЫҚ МАТЕРИАЛЫН ФИТОПАТОЛОГИЯЛЫҚ ЗЕРТТЕУ

*Смагулова А.М., Никулина А.И.,
Киян В.С.*

Қысқаша мазмұны

Мақалада Солтүстік және Орталық Қазақстанның төрт аймағынын тұқымдандыруы бойынша дәнді дақылдардың патогендік саңырауқұлақтар мен бактериялардың ластануы жағдайында фитопатологиялық зерттеу нәтижелері. Сараптамаға жаздық жұмсақ бидай, жаздық бидай, арпа және сұлы сияқты дәнді дақылдар алынды. Зерттеу мемлекетаралық стандарттың микробиологиялық зерттеулердің талаптарына сәйкес жүргізілді. Зерттеулердің нәтижелері бойынша тұқымдарда альтернатиоз, гельминтоспориоз, фузариоз, бактериоз, сонымен қатар сапрофитпен ластанудың болуы анықталды. Мәдениеттерді сәйкестендіру саңырауқұлақтар мен бактериялардың өсуінің мәдени сипаттамаларына сәйкес жүргізілді, мақалада өсу аймағынын пайда болуы жете сипаттамасы келтірілген. Морфологиялық белгілер бойынша идентификация микроскопия көмегімен жүргізілді, алынған саңырауқұлақтар мен бактериялардың құрылымы толық сипатталды. Түрлердің туыстығын растау үшін ITS1 геномдық аймағының негізінде молекулалық-генетикалық зерттеулер жүргізілді.

Түйінді сөздер: фитосанитарлық талдау, дақылдар, саңырауқұлақтармен ластану, бактериалды ластану, альтернариоз, гельминтоспориоз, фузариоз, бактериоз, микроскопия, молекулалық-генетикалық зерттеу.