

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ФУЗАРИОЗА КАРТОФЕЛЯ НА ЮГО-ВОСТОКЕ КАЗАХСТАНА

А.М Асылбек, Е.В.Рахимова, Н.В.Мироненко, С.Е. Сулейменова, В.Ф. Красавин, Б.А. Ертаева

Аннотация

В Казахстане повсеместно распространено увядание картофеля – заболевание инфекционного характера, вызываемое грибами из рода *Fusarium*, вредоносность которого выражается в уменьшении урожая клубней. Идентификация видов рода достаточно трудна из-за перекрывающегося диапазона признаков. Целью работы являлась идентификация возбудителей фузариоза картофеля на основе как морфологических признаков, так и данных ПЦР. Были собраны и проанализированы образцы листьев и клубней 19 сортов и одного гибрида картофеля, получены 9 моноклониальных изолятов. Учитывая культуральные и морфологические признаки, выделенные нами изоляты идентифицированы как *Fusarium oxysporum* Schltdl. При проведении ПЦР установлено, что размер диагностического фрагмента у выделенных нами изолятов и у контрольных изолятов *F. oxysporum* 58284 и 58285 составляет 70 п.о. Молекулярно-генетическое исследование подтверждает, что возбудителем фузариоза картофеля на юго-востоке Казахстана является *F. oxysporum*.

Введение

Грибы рода *Fusarium* (класс *Hyphomycetes*) широко распространены в природе. Для этого вариабельного рода характерны как сапрофиты, так и факультативные паразиты. Представители рода поражают более 200 видов культурных и дикорастущих растений, вызывая их трахеомикозное увядание, задержку роста, корневые и стеблевые гнили, черную ножку сеянцев. По некоторым данным [1], в различных регионах видовой состав патогенных фузариев специфичен. В более влажных и теплых условиях доминируют представители рода: *Fusarium culmorum*, *F. sporotrichiella*,

F. oxysporum, гораздо реже встречаются *F. heterosporum*, *F. nivale* [2].

В Казахстане повсеместно распространено увядание картофеля – заболевание инфекционного характера, вызываемое грибами из рода *Fusarium*, вредоносность которого выражается в уменьшении урожая клубней в 2-3 раза [3]. Диагностическим признаком болезни является увядание, пожелтение и последующее засыхание листьев, начиная с верхнего яруса. Пораженные стебли на высоте 10-12 см буреют, размягчаются и часто

надламываются. В местах поражения появляется интенсивное розовое спороношение гриба. Болезнь активно проявляется в жаркую погоду, когда растения ослаблены недостатком влаги [4]. Клубни картофеля поражаются фузариозом через повреждения: ушибы, ссадины, порезы. Быстрое заживление ран препятствует проникновению гриба. Оптимальная температура для его развития +10 - +20°, влажность имеет небольшое значение. Распространение гриба происходит с помощью образующихся многочисленных конидий, а так же путем контакта пораженных клубней со здоровыми [4]. Пораженные фузариозом клубни картофеля становятся полностью или частично морщинистыми и складчатыми и покрываются паутистым или пленчатым налетом различной окраски, чаще розовым и желтым. При небольшой влажности клубень ссыхается, превращаясь в комок затвердевшей порошкообразной крахмалистой массы. При высокой влажности пораженные ткани размягчаются, в клубне образуются полости, заполненные светло окрашенным мицелием; в таких случаях сухая

гниль часто переходит в мокрую. Фузариозная сухая гниль является опасной болезнью картофеля в период хранения и потери урожая только от нее составляют 20-30% [5].

У многих видов *Fusarium* имеется только конидиальное спороношение, разнообразное поморфологии и способу образования конидий. У отдельных видов в мицелии образуются: хламидоспоры – одноклеточные части гиф, обособляющиеся от остальных клеток толстой оболочкой; на растительных остатках в тканях субстрата образуются склероции – тесное скопление гиф. В таком покоящемся состоянии гриб зимует в почве, на растительных остатках, переживая неблагоприятные погодные условия [6].

Поскольку использование обычного морфометрического анализа не всегда дает возможность точно идентифицировать виды рода *Fusarium*, имеющие перекрывающийся диапазон признаков, целью нашей работы являлась идентификация возбудителей фузариоза картофеля на основе как морфологических признаков, так и данных ПЦР.

Материалы и методы

Сбор листьев и клубней растений картофеля, пораженных фузариозом, осуществляли в 2015-2016 гг. на опытных полях и в хранилище Института картофелеводства и овощеводства. Были собраны и проанализированы образцы 19 сортов и одного гибрида.

Непосредственное микроскопирование гербаризированных листьев эффекта не давало, поэтому образцы помещали во влажную камеру на 5-7 суток при температуре 20-25°C для стимуляции спороношения. Перед помещением листьев во влажную

камеру их промывали проточной водой и дезинфицировали слабым раствором (1%) перманганата калия. Для морфологических исследований получали также моноконидальные изоляты из листьев или клубней, которые культивировали в пластиковых чашках Петри на картофельно-глюкозном агаре (КГА) при 25°C с 12-часовым фотопериодом (под лампами дневного света). Из налета в местах поражения или из колоний на чашках Петри готовились препараты (методом давленной капли), изучались и фотографировались под фотомикроскопом Polyvar с интерференционной оптикой Номарского. При микроскопировании учитывали следующие параметры: длина и ширина микро и макроконидий, форма конидий, количество перегородок. Для молекулярно-генетической идентификации вида возбудителя фузариоза использовали метод, основанный

Результаты и обсуждение

Из клубней картофеля с симптомами характерной для фузариоза сухой гнилью (Рис. 1), получены 9 моноконидиальных изолятов со схожими признаками колоний: быстро растущие, паутинисто-пленчатые, белые, кремовые, абрикосовые или с пурпуровым оттенком, обратная (Рис. 7).

на полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифичными праймерами. Для этого из чистой моноконидиальной культуры гриба выделили ДНК и провели ПЦР с видоспецифичными праймерами для вида *Fusarium oxysporum* PFO3/PFO2 (CGGGGGATAAATGCGG/CCCAGGGTATTACACGGT, M-molecular marker 50bp (from 50 to 1000 bp), ожидаемый размер продукта амплификации 70 п.о.) [7] и для негативного контроля – с праймерами для *F. solani* AFP346/ITS1 (GGTATGTTTACAGGGTTGATG/TCCGTAGGTGAACCTGCGG, ожидаемый размер продукта амплификации 104 п.о.) [8]. ДНК использовали в 2-х концентрациях: без разведения (примерно 100-150 нг/мкл) и разведенная в 10 раз (10-15 нг/мкл).

сторона колоний кремовая или пурпуровая (Рис. 2-4). Некоторые колонии зональные.

Микроконидии обычно достаточно обильные, одноклеточные, удлинено-эллипсоидальные, прямые или согнутые (Рис. 5, 6), образуются на простых коротких фиалидах

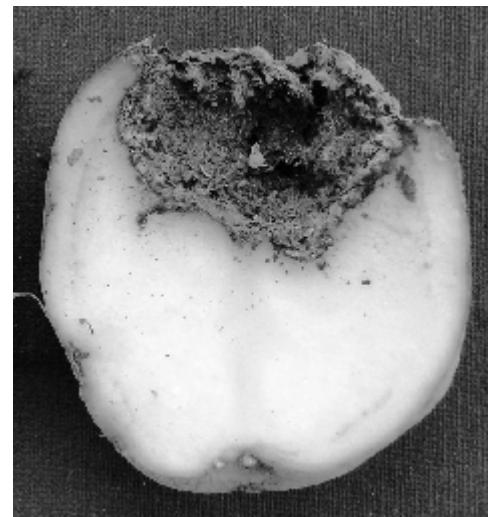


Рисунок 1 – Клубни сорта Тамаша, пораженные фузариозом

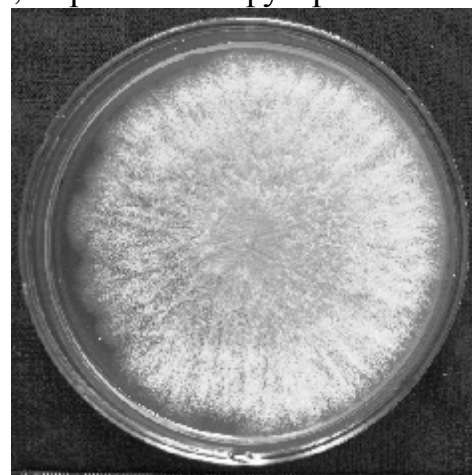
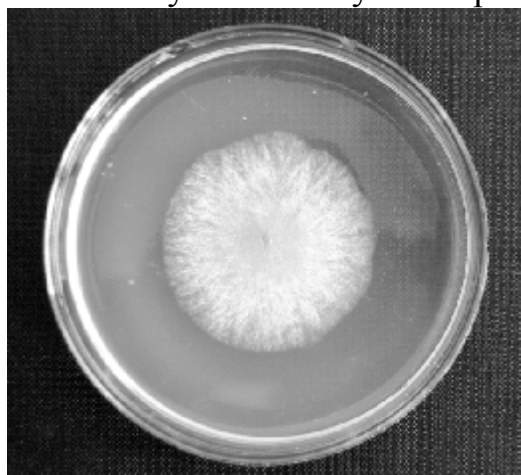


Рисунок 2 – Внешний вид колоний изолята из сорта Памяти Кунаевана 5 и 8
сутки



Рисунок 3 – Внешний вид колонии
изолята из сорта Тамызна 8 сутки



Рисунок 4 – Внешний вид колонии
изолята из сорта Сенимна 8 сутки

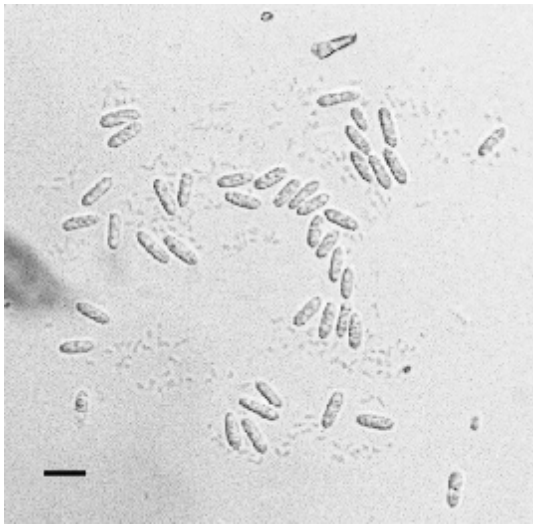


Рисунок 5 – Микроконидии возбудителя фузариоза с сорта Сеним, шкала 10 мкм

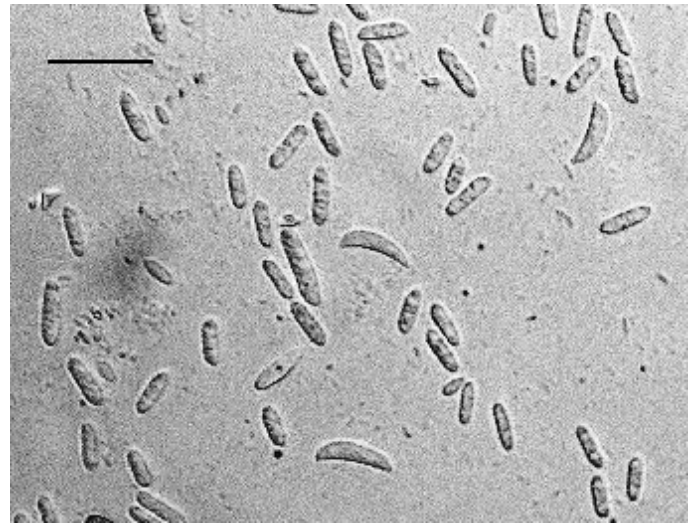


Рисунок 6 – Микроконидии возбудителя фузариоза с сорта Удовицкий, шкала 15 мкм



Рисунок 7 – Конидиеносцы возбудителя фузариоза микроконидиями (сорт Памяти Кунаева), шкала 20 мкм

Размеры микроконидий варьируют в зависимости от сорта и органа хозяина, на котором развивается гриб (Табл. 1).

Таблица 1 – Размеры микроконидий возбудителя фузариоза картофеля ($M \pm m$) на листьях (лето 2015 г) и клубнях (зима 2015 г) в зависимости от сорта, мкм

№	Название сорта	Размеры микроконидий			
		на листьях		на клубнях	
		длина	ширина	длина	ширина
1	Алатау	9,26±1,74	5,45±0,79	-	-
2	Акжар	9,36±1,21	5,47±0,77	-	-
3	Алена	11,7±1,46	5,22±0,95	-	-
4	Беркут	10,41±1,34	5,52±0,72	12,7±1,24	5,76±0,42
5	Бирлик	10,2±1,35	5,3±0,88	-	-

6	Карасайский	9,14±1,21	5,17±0,96	-	-
7	НурАлем	10,4±0,93	5,68±0,53	10,7±1,09	4,88±0,98
8	Нэрли	-	-	12,3±1,88	5,4±0,84
9	Памяти Боброва	-	-	11,4±1,53	5,68±0,53
10	Памяти Кунаева	-	-	13,1±1,0	5,6±0,64
11	Сеним	9,1±1,17	5,28±0,92	12,1±0,96	5,4±0,80
12	Тамаша	9,98±0,63	5,4±0,80	12,5±0,89	5,92±0,15
13	Тамыз	11,9±1,32	5,4±0,80	10,6±1,22	4,96±0,99
14	Тянь-Шаньский	11,5±1,59	5,5±0,75	-	-
15	Урал I	11,6±1,63	5,44±0,80	-	-
16	Удовицкий	11,7±1,45	5,0±1,0	-	-
17	Фабула	12,5±1,18	5,47±0,77	-	-
18	Федор	10,0±1,43	4,94±0,99	12,7±1,89	5,16±0,97
19	Эдем	-	-	12,5±1,09	5,44±0,80
20	Гибрид 21.02.02	10,8±1,68	5,42±0,81	-	-

Примечание: прочерк в графе означает отсутствие данных.

Макроконидии почти цилиндрические, веретеновидные, слегка согнутые, на концах закругленные или тупо конусовидно суженные, у основания с едва заметным сосочком, редко со слабо выраженной ножкой, с 3-5 перегородками (Рис. 8-10), в массе коричневато-белые, глинисто-желтые, синеватые или зеленые; (Табл. 2, 3).

образуются на воздушном мицелии, в спородохиях и пиионнотах (Рис. 11).

Макроконидии образуются значительно реже микроконидий, и не на всех исследованных сортах картофеля. Размеры макроконидий зависят от их формы, количества перегородок в них и от сорта хозяина

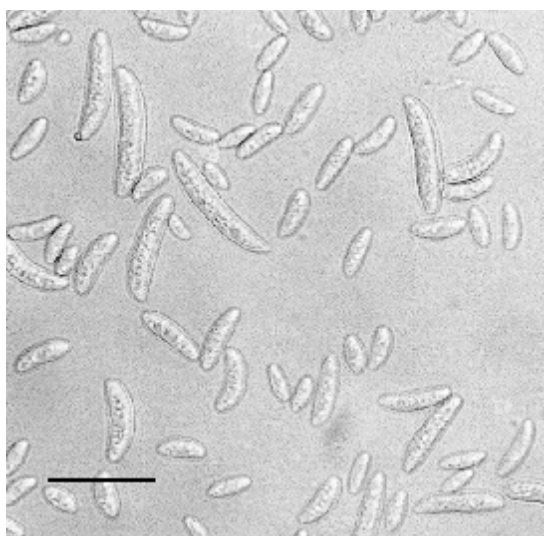


Рисунок 8 – Макроконидии возбудителя фузариоза с сорта Эдем, шкала 20 мкм

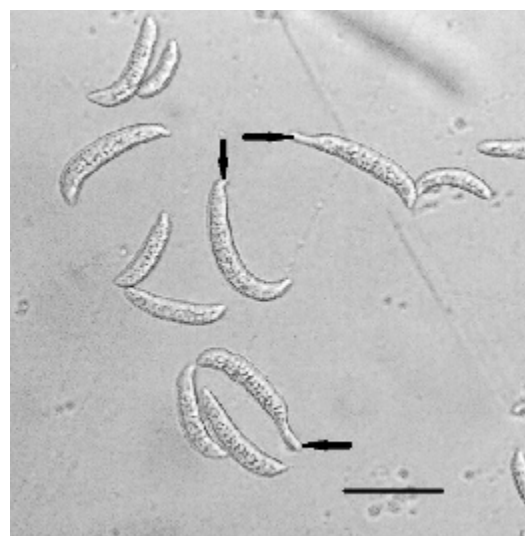


Рисунок 9 – Макроконидии возбудителя фузариоза с сорта Федор (стрелками указаны

ножки), шкала 20 мкм

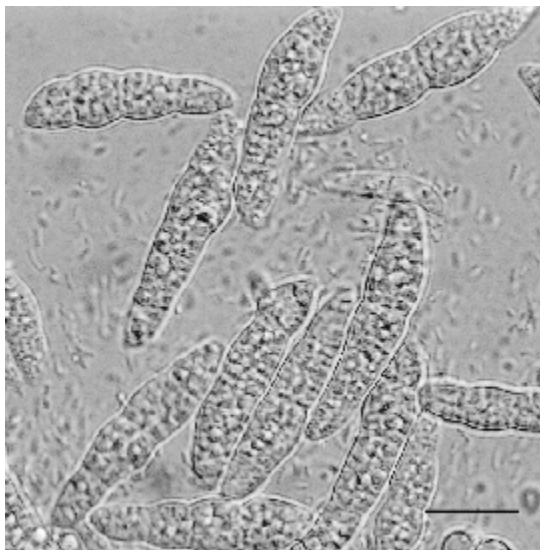


Рисунок 10 – Макроконидии возбудителя фузариоза с сорта Удовицкий, шкала 10 мкм

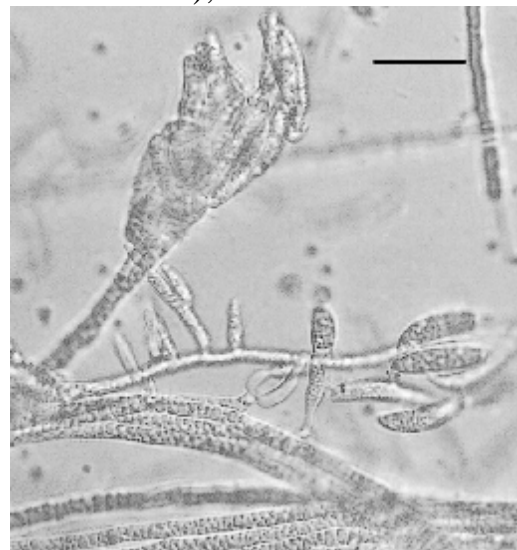


Рисунок 11 – Образование макроконидий на сорте Памяти Кунаева, шкала 20 мкм

Таблица 2 – Размеры серповидных макроконидий возбудителя фузариоза картофеля ($M \pm m$) на клубнях (зима 2015 г) в зависимости от сорта, мкм

№	Название сорта	Размеры макроконидий			
		без перегородок		с перегородками	
		длина	ширина	длина	ширина
1	Беркут	30,6±4,56	5,8±0,56	30,2±4,99	5,6±0,81
2	Нэрли	28,4±8,06	5,6±0,59	33,1±6,38	5,7±0,55
3	Памяти Кунаева	27,8±5,04	6,5±0,75	28,1±4,00	6,5±0,75
4	Сеним	29,5±6,26	5,3±0,88	32,8±9,82	5,3±0,88
5	Тамаша	19,8±2,96	5,5±0,69	21,4±1,77	5,3±0,88
6	Удовицкий	37,3±4,17	5,8±0,36	38,6±4,54	5,7±0,52
7	Федор	39,4±4,80	5,9±0,15	37,4±6,00	5,9±0,15
8	Эдем	31,1±4,65	5,6±0,61	36,1±3,27	5,9±0,18

Таблица 3 – Размеры эллипсоидальных макроконидий возбудителя фузариоза картофеля ($M \pm m$) на клубнях (зима 2015 г) в зависимости от сорта, мкм

№	Название сорта	Размеры макроконидий			
		без перегородок		с перегородками	
		длина	ширина	длина	ширина
1	Беркут	22,5±3,38	5,3±0,88	24,8±3,35	5,9±0,20
2	Нэрли	34,5±3,71	5,2±0,98	30,8±5,80	5,3±0,88
3	Памяти Кунаева	20,2±1,71	6,0±0,36	23,7±4,81	5,4±0,84
4	Сеним	32,1	6,0	28,1±5,33	6,0
5	Тамаша	22,1±1,81	5,3±0,88	21,4±2,81	5,3±0,88

6	Удовицкий	29,6±5,52	5,5±0,55	35,3±4,09	5,8±0,36
7	Федор	27,6±5,52	5,7±0,43	25,3±2,72	5,8±0,36
8	Эдем	23,9±3,32	5,8±0,36	24,1±2,60	5,7±0,48

Длина серповидных макроконидий без перегородок варьирует от 19,8 мкм у сорта Тамаша до 39,4 мкм у сорта Федор. Длина макроконидий с перегородками отличается незначительно и варьирует от 21,4 мкм у сорта Тамаша до 38,6 мкм у сорта Удовицкий. Длина эллипсоидальных макроконидий более стабильна: без перегородок от 20,2 мкм у сорта Памяти Кунаева до 34,5 мкм у сорта Нэрли, с перегородками от 21,4 мкм у сорта Тамаша до 35,3 мкм у сорта Удовицкий.

[9, 10].

Хламидоспоры верхушечные и промежуточные, коричневатые, одиночные, редко в цепочках, гладкие, иногда мелко бородавчатые (Рис. 12).

Учитывая культуральные и морфологические признаки, выделенные нами изоляты идентифицированы как *Fusarium oxysporum* Schltdl. По-видимому, сухую гниль клубней картофеля вызывают несколько видов рода *Fusarium*, поскольку ранее нами был идентифицирован вид *F. solani*



Рисунок 12 – Хламидоспоры возбудителя фузариоза с сорта Удовицкий, шкала 10 мкм

При проведении ПЦР с праймерами PFO3/PFO2 установлен о, что размер диагностического фрагмента у выделенных нами изолятов (№3 и 4) и у контрольных изолятов *F. oxysporum* 58284 и 58285 (№11-14) - 70 п.о (Рис. 13). У остальных изолятов (№1, 2, 5-9)

продукты амплификации отсутствовали. У изолята *F. solani* 58286 (№15-16) – слабый продукт амплификации (что свидетельствует о несовершенстве подобранных праймеров или неоптимальных условиях проведения ПЦР).

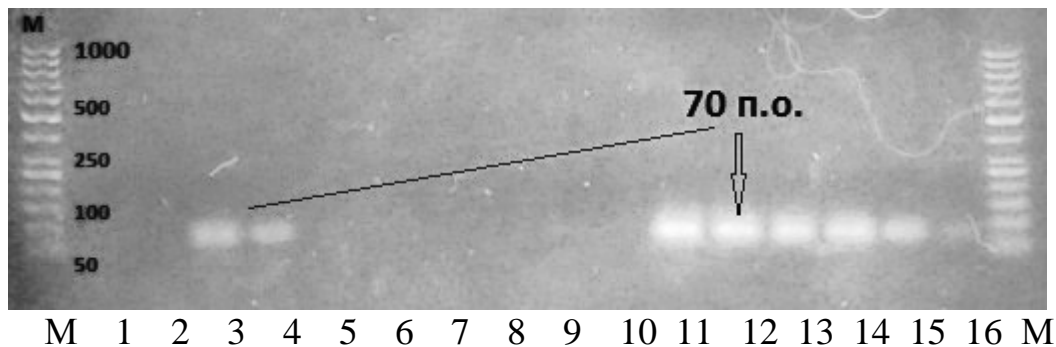


Рисунок 13 - Результаты ПЦР с праймерами PFO3/PFO2. Обозначения рядов: М – маркер молекулярной массы; 1, 2 – *Alternaria* sp.; 3, 4 – *Fusarium* sp. (выделены из сортов картофеля); 5, 6 – *A. tenuissima* – изолят 587-1; 7, 8 – *A. solani* – изолят 601; 9-10 – *F. solani* – изолят 58286; 11-12 – *F. oxysporum* – изолят 58284 (контроль); 13-14 – *F. oxysporum* – изолят 58285 (контроль); 15-16 – *F. solani* – изолят 58286

При проведении ПЦР с праймерами AFP346/ITS1 для негативного контроля установлено, что размер диагностического фрагмента у контрольных изолятов *F. solani* 58286 (№9, 10, 15, 16) составляет 104 п.о (Рис. 14). У остальных изолятов (в том числе и выделенных нами) продукты амплификации отсутствовали.

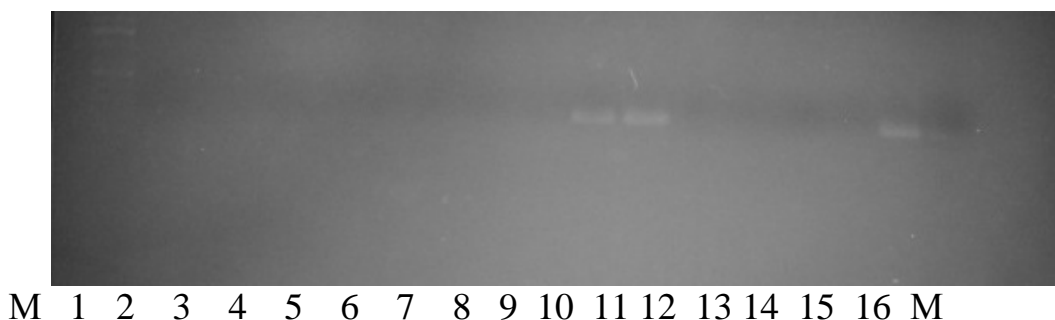


Рисунок 14 - Результаты ПЦР с праймерами AFP346/ITS1. Обозначения рядов как на рис. 13

Таким образом, молекулярно-генетическое исследование (полимеразная цепная реакция) подтверждает, что одним из возбудителей фузариоза картофеля на юго-востоке Казахстана является *Fusarium oxysporum* Schltdl.

Список литературы

1. Гагкаева Т.Ю., Гаврилова О.П. Новые виды грибов *Fusarium*, выявленные на территории России // Проблемы микологии и фитопатологии в XXI веке: материалы международной научной конференции. – СПб., 2013. – С. 59-62.

2. Шешегова Т.К. Фузариоз колоса и зерна озимой ржи // Защита и карантин растений. – 2003, №4. – С. 50-51.
3. Казенас Л.Д. Болезни сельскохозяйственных растений Казахстана. – Алма-Ата: Кайнар, 1974. – 368 с.
4. Искаков К.Б., Сарсенбаев К.Б. Фузариозная сухая гниль картофеля на юго-востоке Казахстана и меры борьбы с ней. // В кн.: Научные основы возделывания картофеля в Казахстане. – Алма-Ата, 1980. – С. 154-161.
5. Казенас Л.Д. Болезни картофеля в Алма-Атинской области и борьба с ними. // Тр. Республ. Станции защиты растений. – Алматы: Казгосиздат, 1954. – Т. II. – С. 282-289.
6. Горленко М.В. О некоторых направлениях эволюции фитопатогенных грибов. // Микол. фитопатол. – 1995, 29(1). – С. 87-94.
7. Akinsanmi O.A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhaus D., Chakraborty S. Identity and pathogenicity of *Fusarium* spp. isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales // Austral. J. Agric. Res. – 2004, Vol. 5. – P. 97-107
8. Lievens B., Brouwer M., Vanachter A.C.R.C., Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples // Plant science. – 2006, Vol. 171. – P. 155-165.
9. Асылбек А.М., Рахимова Е.В., Сулейменова С.Е. Фузариозные болезни картофеля в Казахстане // Биоразнообразие и экология грибов и грибоподобных организмов северной Евразии: материалы Всероссийской конференции с международным участием. – Екатеринбург: изд. Уральского университета, 2015. – С. 12-14.
10. Assylbek A.M., Rakhimova Y.V., Orasbayev S.A., Krasavin V.F., Suleymenova S.E., Yertaeva B.A. Comparative analysis of pathogenic mycobiota of leaves and tubers of potato // Conservation and sustainable use of gene fund of plant world in Eurasia at the present stage: International scientific conference within «Day of Kazakhstan». – Antalya, Turkey, 2016. – P. 91-93.

Summary

Potato wilt - disease of infectious nature caused by fungi of the genus of *Fusarium*, is widely spread in Kazakhstan, the harmfulness of disease is expressed in a decrease in tuber yield. Identification of species is rather difficult because of overlapping symptoms range. The aim of the study was the identification of *Fusarium* pathogens of potatoes on the basis of both morphological characters and PCR data. Samples of leaves and tubers from 19 potatoes cultivars and hybrid were collected and analyzed, 9 monoconidial isolates were obtained. Given the cultural and morphological characteristics selected isolates were identified by using *Fusarium oxysporum* Schltdl. In conducting the PCR it was revealed that the size of the diagnostic fragment from isolates obtained by us and from control *F. oxysporum* isolates 58284 and 58285 is 70 bp. Molecular genetic study confirms that pathogen of *Fusarium* disease of potatoes in the south-east of Kazakhstan is *F. oxysporum*.

Түйін

Қазақстанда инфекциялық сипаттағы аурудың қоздырушысы *Fusarium* туысының саңырауқұлағымен зақымдалған картоп дақылының солудың нәтижесінде картоп түйінінің өнімділігі айтарлықтай төмендеген. Туыс түрлерін идентификациялауда саңырауқұлақтың кең диапазонды белгілерін анықтауда қиындық тудырады. Жұмыстың негізгі мақсаты болып картоптағы фузариоз қоздығышының морфологиялық белгілері мен ПТР нәтижесі бойынша идентификациялау. Саңырауқұлақпен зақымдалған картоптың жапырақ үлгілері мен 19 сорттың картоп түйіндері, сонымен қатар картоптың бір гибриды жиналып толықтай талдау жүргізілді, сондай-ақ 9 моноспоралық изолят алынды. Мәдени және морфологиялық белгілерді қосқанда бізбен бөлінген изоляттар *Fusarium oxysporum* Schltdl болып идентификацияланды. ПТР жүргізу барысында бізбен бөлініп алынған изоляттардың және бақылау изоляттарының *F. oxysporum* 58284 және 58285 диагностикалық фрагменті 70 ж. н. құрады. Молекулярлы-генетикалық зерттеулердің нәтижесі бойынша оңтүстік-шығыс Қазақстандағы картоп дақылында кездесетін фузариоз қоздығышы *F. oxysporum* саңырауқұлағы болып дәлелденді.