

^{1,2}**Н. К. Костин**, агроном,
¹**А. А. Кузнецова**, старший научный сотрудник,
¹**М. Б. Копина**, ведущий научный сотрудник,
²**О. О. Белошапкина**, профессор, д-р с.-х. наук
¹Всероссийский центр карантина растений», Россия, Москва
²РГАУ–МСХА имени К. А. Тимирязева, Россия, Москва
kostinwork1@gmail.com

УДК 632.4.01/.08

**КУЛЬТУРАЛЬНО-МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ВИДОВ
FUSARIUM OXYSPORUM И *FUSARIUM BRACHYGIBBOSUM*,
АССОЦИИРОВАННЫХ С РАСТЕНИЯМИ ЗЕМЛЯНИКИ САДОВОЙ**

ORCID: Кузнецова А. А. – 0000-0001-8443-2641, Копина М. Б. – 0000-0002-1613-1764, Белошапкина О. О. – 0000-0002-8564-8142

Реферат. Работа посвящена двум видам микромицетам рода *Fusarium*: виду комплекса *F. oxysporum* и виду *F. brachygibbosum* Padwick, выделенных с корней земляники садовой из различных регионов России. Исследования проводили в 2021-2022 гг на образцах растений с симптомами, отобранных в республике Крым и Воронежской области. Изучение микромицетов проводили сочетанием классических биологических методов и молекулярно-генетических подходов с расшифровкой нуклеотидных последовательностей. Целью работы являлось изучение биологических особенностей *F. oxysporum* и *F. brachygibbosum* Padwick. В ходе работы приведено изучение макро- и микропризнаков целевых объектов. Определены культурные особенности: строение и окраска воздушного и субстратного мицелия, характер поверхности колонии, скорости роста, спороношение грибов, пигментация структур и питательной среды на исследуемых средах. Впервые выделен и идентифицирован вид *F. brachygibbosum* с посадочного материала земляники происхождения республики Крым. В результате проведенных исследований разного состава питательных сред, установлено, что картофельно-глюкозный агар (КГА) 2% наиболее оптимальная питательная среда для роста и

спорношения целевых изолятов. Определено, что при добавлении лимонной кислоты в КГА изменялись макропризнаки мицелия гриба *F. brachygibbosum*. Изучены универсальные участки нескольких генов (внутренний транскрибируемый спейсер, ген актина, ген фактора элонгации трансляции) для видовой идентификации *F. oxysporum* и *F. brachygibbosum*. Определены переменные участки генов для идентификации видовой принадлежности изолятов рода *Fusarium*. Установлено, что участки ITS1-5.8S-ITS2 и TEF возможно применять для межвидовой дифференциации фузариозов.

Ключевые слова: *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium oxysporum*, болезни земляники, морфология, морфометрия, питательная среда

ORCID: Kuznetsova, A. A. – 0000-0001-8443-2641, Kopina M. B. – 0000-0002-1613-1764, Beloshapkina O. O. – 0000-0002-8564-8142

Abstract. This study is focused on two micromycetes of the genus *Fusarium*: the complex species *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum* Padwick isolated from strawberry roots from different regions of Russia. Studies were performed in 2021-2022 on samples of symptomatic plants collected in the Republic of Crimea and Voronezh Oblast. The micromycetes were studied by means of a combination of classical biological methods and molecular genetic approaches with decoding of nucleotide sequences. The subject of the work was to study the biological features of *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum* Padwick. The work included the study of macro- and micro features of the target objects. The following cultural features were determined: structure and coloring of aerial and substrate mycelium, character of colony surface, growth rate, sporulation of fungi, pigmentation of structures and nutrient media on the studied media. The species *F. brachygibbosum* from planting material of strawberry originating from the Republic of Crimea was isolated and identified for the first time. As a result of studies of different composition of nutrient media, it was found that potato-glucose agar (PGA) 2% is the most optimal nutrient medium for growth and sporulation of target isolates. It was determined that the addition of citric acid to PGA altered the macro features of

the mycelium of *F. brachygibbosum*. Universal sites of several genes (internal transcribed spacer, actin gene, elongation translation factor gene) were studied for species identification of *F. oxysporum* and *F. brachygibbosum*. Variable gene sites for identification of the species identity of *Fusarium* isolates were determined. It was revealed that ITS1-5.8S-ITS2 and TEF sites could be used for interspecific differentiation of *Fusarium* wilts.

Key words: *Fusarium brachygibbosum*, *Fusarium oxysporum*, strawberry diseases, morphology, morphometry, growth medium

Введение

Земляника садовая является популярной ягодной культурой, возделываемой на больших площадях практически во всех почвенно-климатических зонах мира. Высокий адаптивный потенциал растений рода *Fragaria* L. позволяет выращивать их в регионах с различным климатом. К несомненным достоинствам этой культуры следует отнести высокую рентабельность, ранние сроки получения урожая и десертный вкус ягод [1]. В мировой практике успешное культивирование земляники основано на использовании здорового посадочного материала районированных высокоурожайных сортов, а также правильной и современной агротехники.

На территории Российской Федерации отмечается массовый завоз сортов земляники иностранной селекции [2], и основной объем импортных поставок растений приходится на страны Евросоюза. По данным Ягодного союза в 2021 г. в Россию импортировали около 29 млн. растений земляники [3]. Неконтролируемый ввоз импортного посадочного материала создаёт угрозу для проникновения и распространения опасных вредных организмов на территорию Российской Федерации, что ведет к увеличению видового состава патогенов [4,13], наряду с естественными изменениями патоккомплексов [5]. Во избежание распространения и адаптации новых вредных микромицетов необходимо проводить своевременную диагностику, основанную на классических и современных методах их выявления и

идентификации, предварительно изучив морфологические и биологические свойства новых агрессивных патогенов.

Земляника садовая, как и другие растения, поражается корневыми и прикорневыми гнилями, вызванными грибами рода *Fusarium*. Одни виды являются сапротрофами, а другие – типичными паразитами, вызывающими в т.ч. трахеомикозные увядания многих растений [6]. Одним из наиболее распространенных фузариевых грибов является комплекс видов *F. oxysporum*, включающий в себя 150 видов, которые паразитируют на более чем 120 видах сельскохозяйственных и декоративных растений [7]. При выращивании растений земляники без ротации на одном и том же поле повышается вредоносность возбудителя *F. oxysporum* f. sp. *fragariae* (Fof), отмечены случаи потери урожайности до 50 % [8]. Этот фитопатоген серьезно угрожает коммерческому производству земляники во всем мире, включая Западную Австралию, Корею, Китай, Испанию, США и Сербию [9].

В 2021 году в результате наших обследований корней сортообразцов растений земляники был выявлен и идентифицирован ограниченно распространенный для России вид – *F. brachygibbosum* Padwick. По литературным сведениям, данный вид – почвенный мицелиальный патоген, характеризующийся широким распространением по всему миру, зарегистрирован в некоторых странах Азии, Африки, Южной Америки и в США [10]. Гриб является серьезным патогеном сельскохозяйственных культур, включая зерновые бобовые, подсолнечник, сахарную свеклу, оливковые деревья. Растениям, пораженным возбудителем *F. brachygibbosum* характерны разные симптомы, включая загнивание розеток и корней, образование пятнистостей на стеблях и листьях, с дальнейшим увяданием растений. Согласно литературным источникам, информация о конкретных потерях в результате поражения *F. brachygibbosum* встречается редко. Наиболее значимое экономическое воздействие отмечено в Калифорнии при укоренении в питомниках молодых растений миндаля [10]. Вероятно, на территорию нашей страны патоген попал с инфицированным посадочным

материалом растений с закрытой корневой системой, находясь в латентном состоянии.

Целью данной работы являлось изучение биологических особенностей, макро- и микропризнаков фитопатогенов земляники садовой *F. oxysporum* и *F. brachygibbosum*.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования являлись виды фузариевых грибов *F. oxysporum* и *F. brachygibbosum*, выделенные из корней растений земляники садовой в результате мониторинга ягодных насаждений в производственных хозяйствах центральных и южных регионов РФ. Изолят *F. oxysporum* происходил из Воронежской области, изолят *F. brachygibbosum* - из республики Крым.

Определение оптимальных питательных сред для роста и спороношения обоих видов проводили на следующих питательных средах:

- картофельно-глюкозный агар (2% КГА);
- картофельно-глюкозный агар (2% КГА) + 8% лимонная кислота (pH 5,0);
- среда Чапека-Докса (ChDa);
- среда Нюренберга (рекомендованная для получения спороношения грибов рода *Fusarium*)

Исследуемые изоляты высевали в трех повторностях в чашки Петри с различными питательными средами и культивировали при температуре 25 °С. Оценку роста, описание и фотографирование колоний осуществляли на 4,8,12,16, 20 сутки. Макроскопический просмотр колоний осуществляли с помощью стереомикроскопа Stemi-2000 CS. Микроскопический анализ - при помощи светового микроскопа Olympus Vx43F, измерение микоструктур - с использованием программного обеспечения Quick-photo MICRO 3.2.

Подтверждение видовой идентификации проводили на основе универсальных участков генов, применяемых для мицелиальных грибов: участок ITS1-5.8S-ITS2 (праймеры ITS 4/ ITS 5) (White et al. 1990; Gardes, Bruns, 1993), актина (ACT) (праймеры: ACT-512F/ ACT-783R) Carbone &

Kohn (1999), фактора элонгации (TEF) (праймеры: EF1-728F/ EF1-986R) (Carbone & Kohn (1999) [11].

Выделение ДНК осуществляли из мицелия грибов после предварительной гомогенизации с использованием набора «ФитоСорб» (компании ООО «НПФ «Синтол»).

В ходе работы проводили предварительную оптимизацию ПЦР, подбирая температуру отжига праймеров и состав реакционной смеси. Смесь реактивов для постановки одной реакции содержала 5 мкл 5X ПЦР буфера Mas^{DD}Mix 2025 (ООО «Диалат Лтд», Москва), 15 пМ каждого праймера, 2 нг целевой ДНК, доведенной стерильной водой до объема 25 мкл. Температурно-временные условия ПЦР были следующие: 3 мин при +94 °С, затем 30 циклов при +94°С в течение 30 с; температуру отжига праймеров изменяли в зависимости от тестируемых участков генов (ITS – +52° С, АСТ – +61°С, TEF – +55°С) в течение 30 с, +72°С - в течение 90 с, а затем 7 мин при +72°С.

После амплификации ПЦР-продукты разделяли в 1 % агарозном геле с помощью электрофореза и проводили визуализацию с использованием геледокументирующей системы. Расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили по методу Сэнгера на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500. Полученные участки нуклеотидных последовательностей выравнивали в программном обеспечении BioEdit и определяли видовую принадлежность изолятов при помощи сравнения с базой данных GenBank NCBI программного обеспечения BLAST [12].

Результаты и обсуждения

В результате проведенных исследований установлено что виды *F. oxysporum* и *F. brachygibbosum* на этапе начального роста имели фенотипические различия, которые проявлялись в цвете колоний и характере роста воздушного мицелия. На рисунках 1 и 2 представлена скорость роста мицелия двух изучаемых видов на 4-х питательных средах различного

состава. К 12 дню активный рост изолятов прекратился, что связано с освоением всей площади питания в чашке Петри и уменьшением количества доступных питательных веществ.

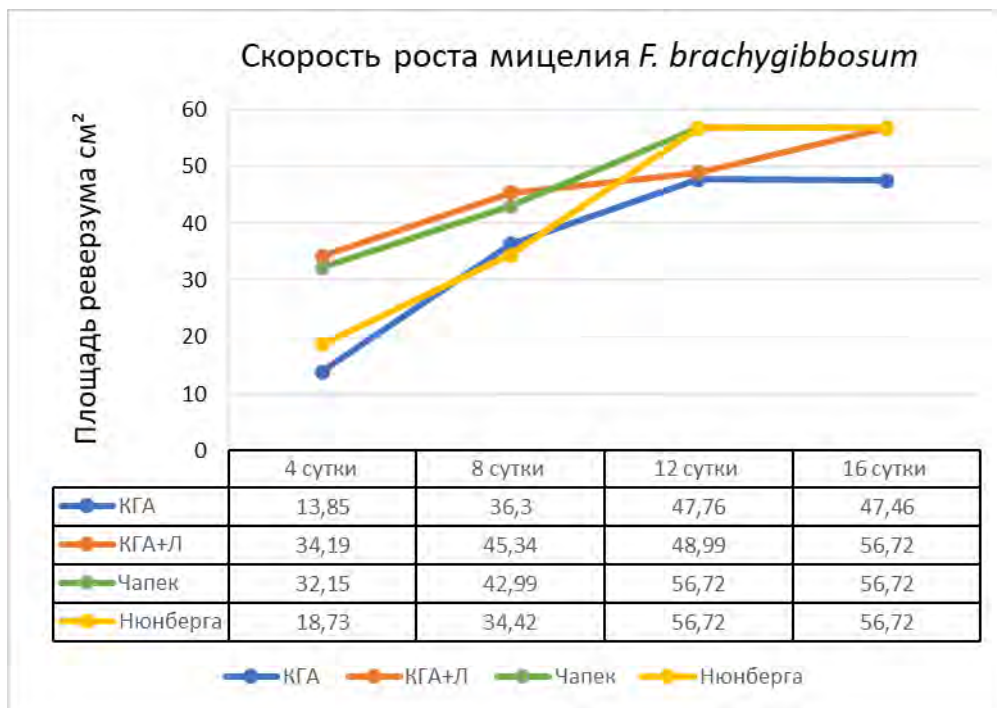


Рис. 1. Скорость роста мицелия *F. brachygibbosum* на разных питательных средах

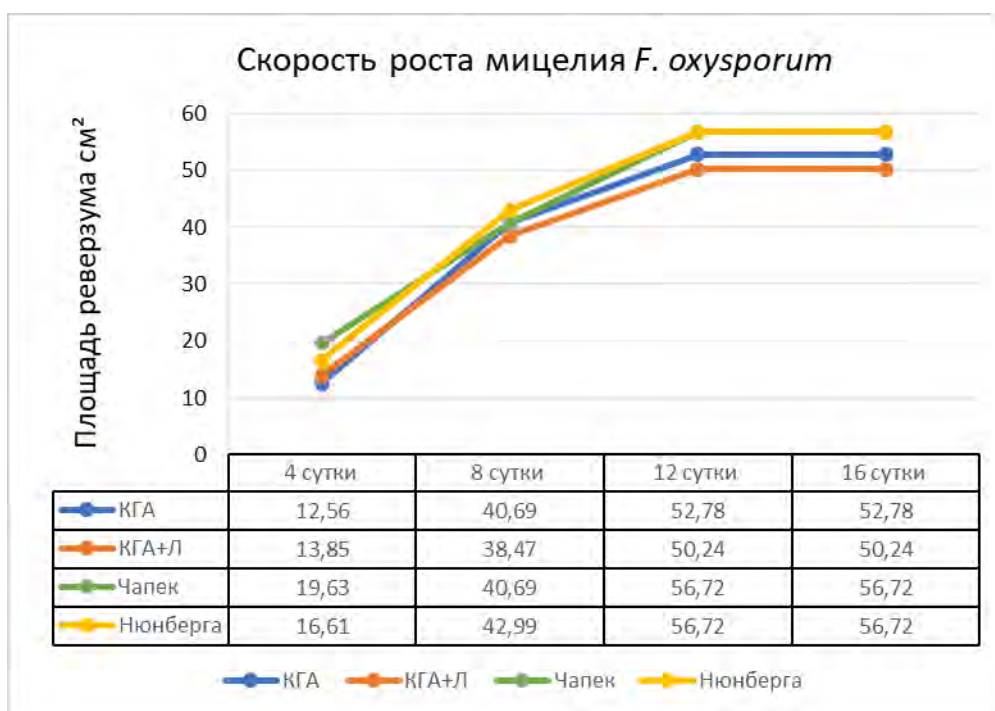


Рис. 2. Скорость роста мицелия *F. oxysporum* на разных питательных средах

Вид *Fusarium brachygibbosum* на среде КГА имел умеренно окрашенный воздушный мицелий красно - оранжевого цвета, с зональной бугристой поверхностью и обильным бело-розовым мицелием по бокам и красным реверсом колонии (таблица 1). На среде КГА, по сравнению с другими питательными средами, изолят характеризовался медленным ростом, образовывал наибольшее количество спор на поверхности колоний в виде тяжелой оранжевого экссудата.




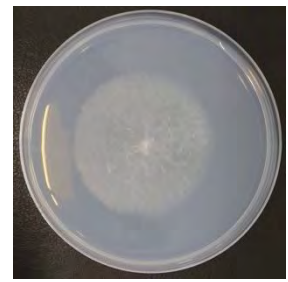
При добавлении лимонной кислоты в КГА изменялся внешний вид мицелия гриба. Он был пушистый, бледно – розового цвета, воздушный, обладающий бугристой поверхностью, с красным реверсом колоний.

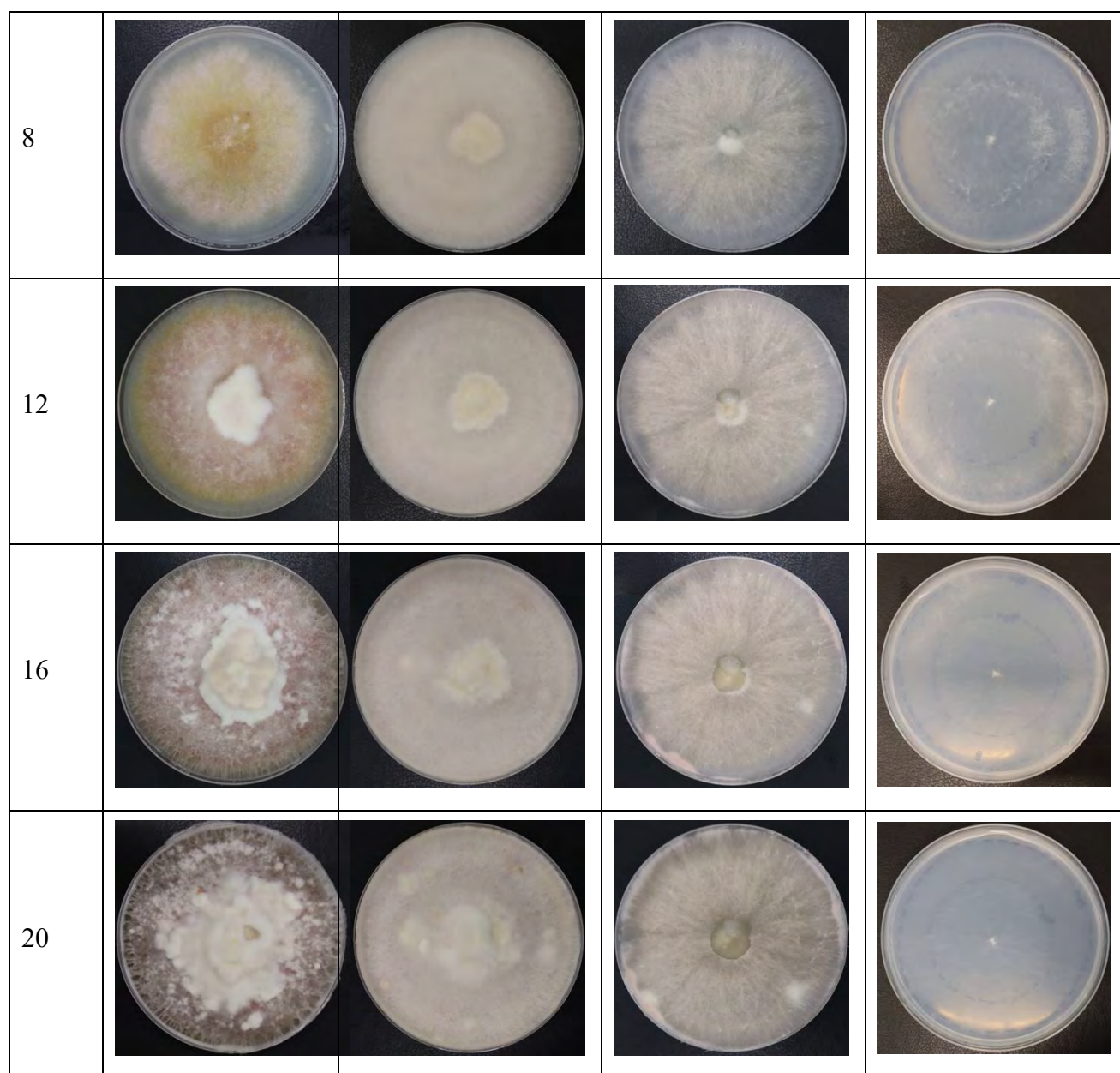
На среде Чапека был отмечен относительно быстрый рост мицелия по сравнению с другими питательными средами. Мицелий образовывался белый, войлочный с экссудатом в центре, поверхность колонии была относительно ровная с бело-розовыми пятнами, с серым реверсом.

На среде Нюрнберга не отмечено активного роста мицелия по сравнению с другими средами. Мицелий был паутинистый, белый, отличающийся ровной поверхностью.

Таблица 1.

Рост и развитие изолятов *F. brachygibbosum* на различных питательных средах

Дни учета	КГА	КГА+Л	Чапек	Нюрнберг
4				



При сравнении культивирования *F. brachygibbosum* на разных питательных средах установлено, что высокая скорость роста мицелия патогена была на среде КГА+Л (рис.1). Однако наиболее активное образование морфологических структур гриба (развитое спороношение, образование склероподобных структур), формирование обильного воздушного мицелия было отмечено на среде КГА без добавления лимонной кислоты. Среда Нюренберга не стимулировала активного роста мицелия и интенсивного спороношения.

Можно сделать вывод, что наилучшей средой для роста и споруляции гриба *F. brachygibbosum* in vitro является обычная среда КГА.

В результате морфологического описания изолятов вида *F. brachygibbosum* на среде КГА выявлено, что гриб производил в процессе бесполого размножения микроконидии и макроконидии, а также отмечено образование вегетативных хламидоспор (рис. 3). Микроконидии были эллипсоидальной формы; размером в длину от 5,4 до 14,7 мкм и в ширину от 2,1 до 3,5 мкм с 1-3 перегородками. Макроконидии образовывались ветреновидно-серповидные, заостренные с обоих концов, эллиптически изогнутые, размером в длину от 25,6 до 52 мкм и в ширину от 3,9 до 5,2 мкм; с 3-5 перегородками. Хламидоспоры были терминальные и интеркалярные, сферические (шаровидные) одноклеточные и реже двухклеточные, гладкие, зернистые (рис.3).

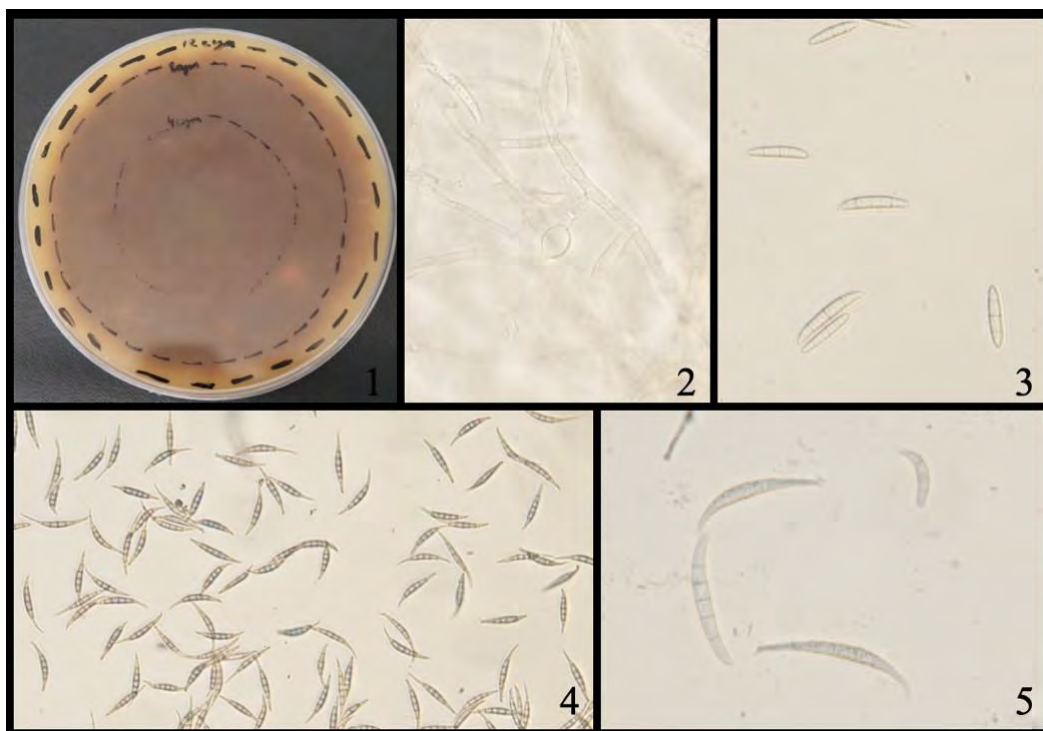


Рис. 3. Колония и микроструктуры *F. brachygibbosum* (1 - реверс; 2 - хламидоспоры; 3 - микроконидии; 4,5 - макроконидии)

Изоляты вида *F. oxysporum* на среде КГА имели слабоопушенный пурпурно-фиолетовый воздушный мицелий с белым центром, который обладал ровной поверхностью, с тёмно - фиолетовым реверсом колоний. Отмечено большее количество спор (табл. 2). При добавлении лимонной

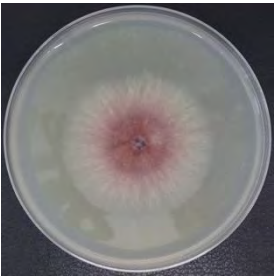


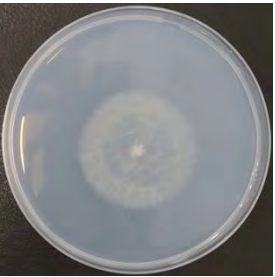


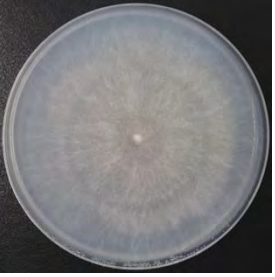



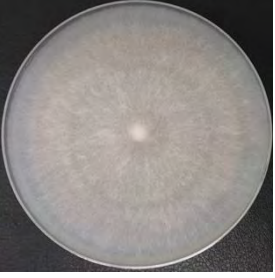
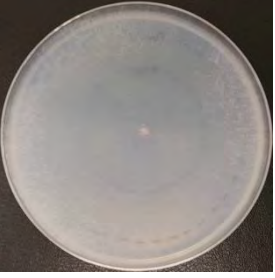
кислоты внешний вид колонии не отличался, культурально-морфологические характеристики микроструктур были идентичными на среде КГА.

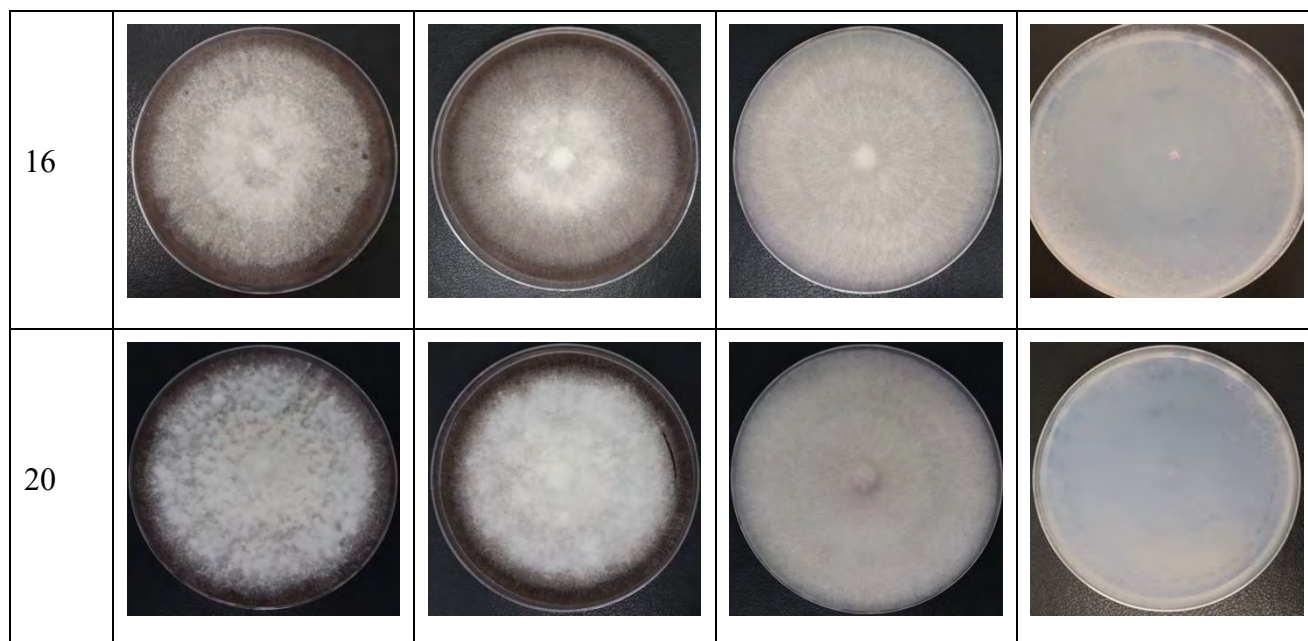
На среде Чапека отмечен быстрый рост мицелия по сравнению с другими питательными средами. Мицелий был шерстистый, белый с экссудатом в центре, обладал ровной поверхностью, колонии - с бело-фиолетовым реверсом.

На среде Нюрнберга не отмечено значительного роста мицелия. Он был паутинистый, белый, с ровной поверхностью.

Таблица 2.

Рост и развитие изолятов *F. oxysporum* на различных питательных средах

Дни учета	КГА	КГА+Л	Чапек	Нюрнберг
4				
8				
12				



Проведенные исследования показали, что у *F. oxysporum* интенсивный рост воздушного мицелия наблюдался на всех питательных средах. Однако, наиболее активное образование морфологических структур гриба (развитое спороношение, образование склероподобных структур), формирование обильного воздушного мицелия было отмечено на среде КГА. Среда Нюренберга не обеспечила активного роста мицелия и интенсивного спороношения гриба. Развитие и рост гриба на питательных средах КГА и КГА+Л не имели между собой существенных различий, поэтому обе среды признали пригодными для культивирования данного вида.

В результате морфологического описания вида *F. oxysporum* на среде КГА выявлено, что гриб производил два типа бесполов спор: микроконидии, макроконидии и образовывал хламидоспоры (рис. 4). Хламидоспоры присутствовали в большом количестве, одиночно, редко в парах или цепочках, образовывались терминально или на интеркалярной основе, с тонкой и с грубой стенками. Микроконидии были несептированные, эллипсоидальной формы, размером в длину от 5,2 до 11,6 мкм и в ширину 2,2-3,5 мкм. Макроконидии были ветвеновидно-серповидной формой, эллиптически изогнутые, заостренные с обоих концов, размером в длину от 23,4 до 45,3 мкм и в ширину от 3,4 до 5 мкм; с 3-5 перегородками (рис.4).

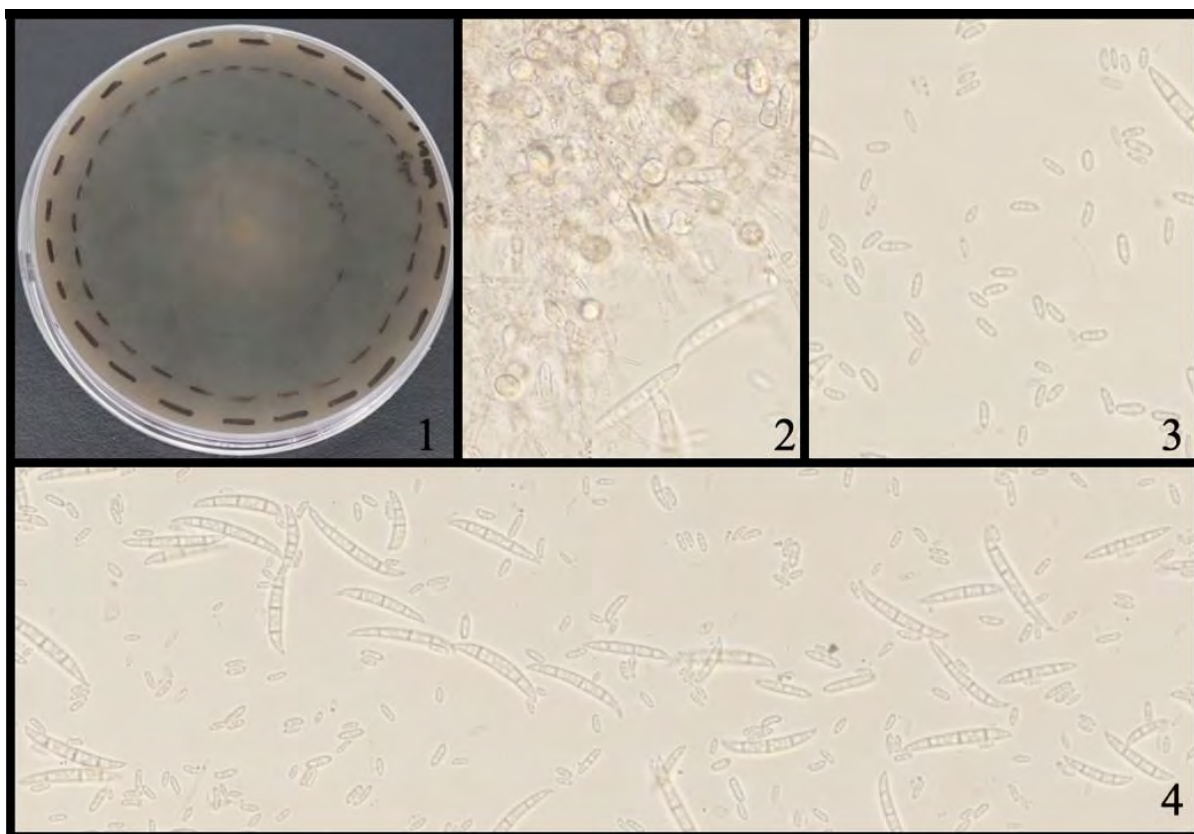


Рис. 4. Колония и микроструктуры *F. oxysporum* (1 – реверс; 2 – хламидоспоры; 3 – микроконидии; 4 – макроконидии)

После предварительной идентификации видов *F. brachigibbosum* и *F. oxysporum* по культурально-морфологическим признакам провели изучение нуклеотидных последовательностей по 3 участкам генов (ACT – участок гена актина; ITS – участок внутреннего транскрибируемого спейсера; TEF – участок гена фактора элонгации трансляции). При проведении амплификации с ДНК образцами и специфичными праймерами для разных участков были установлены оптимальные режимы и получены продукты классической ПЦР (рисунок 5). По внутреннему транскрибируемому участку ITS рДНК получены фрагменты ДНК, которые составили 550 п.о., при температуре отжига 61 °С (рисунок 5, I1, I2, I3). Получены фрагменты участка гена актина ДНК, которые составили 300 п.о., при оптимальной температуре отжига 61 °С (рисунок 5, A1, A2, A3). Для участка гена фактора

элонгации фрагменты ДНК составили 700 п.о., при оптимальной температуре отжига 55 °С, (рис. 5, E1, E2, E3).

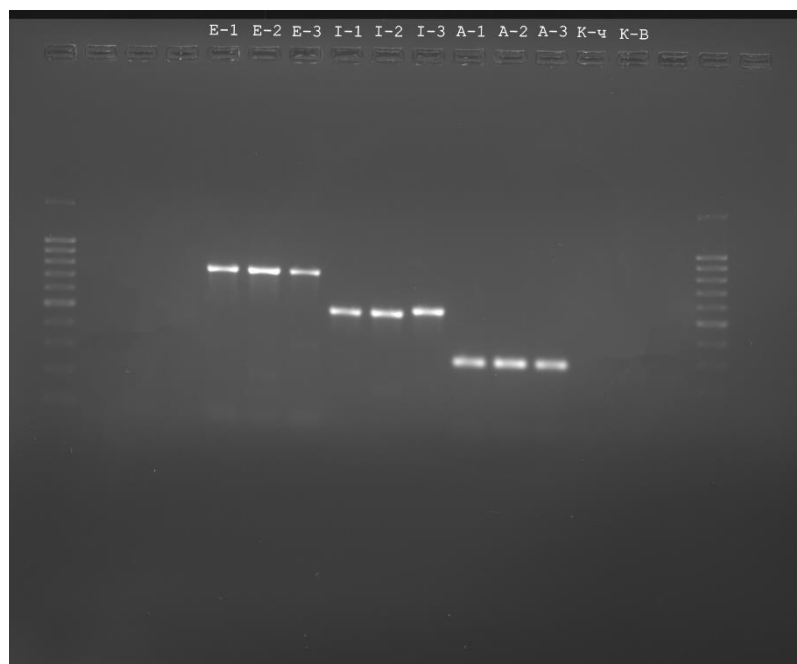


Рис 5. Электрофореграмма ПЦР- продуктов амплификации изолятов *Fusarium* с праймерами специфичными для участков генов ITS, EF и ACT

В результате предварительного сравнения нуклеотидных последовательностей участков ITS1-5.8S-ITS2, ACT, TEF с депонированными последовательностями базы NCBI показано, что выделенный изолят из Воронежской области принадлежит к комплексу *F. oxysporum*. По участку ITS1-5.8S-ITS2 изолят одинаково идентифицировался как *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *F. oxysporum* f.sp. *dianthi*, *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (покрытие 100%; идентификация 99,8%). По участку гена ACT - как *F. oxysporum* f.sp. *dianthi* (покрытие 99%; идентификация 99,9%), а по участку гена TEF- *F. oxysporum* f.sp. *vasinfectum* (покрытие 99%; идентификация 99,6%). Для установления точной видовой принадлежности в пределах комплекса *F. oxysporum* исследования будут продолжаться.

Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей по участкам ITS1-5.8S-ITS2 и TEF показал, что изолят из республики Крым определен, как вид *F. brachigibbosum*. Идентификация и покрытие по участку ITS1-5.8S-

ITS2 составила 99-99,8%, по участку гена TEF 99-99,6%. Следует отметить, что по участку гена ACT вид не определялся, это объясняется тем что, в базе NCBI отсутствуют эталонные последовательности на данный участок.

Заключение

Для получения высокой урожайности и рентабельности производства земляники необходимо проводить комплекс мероприятий, направленный на предотвращение или минимизацию заноса на территории посадок растений вредоносных патогенов, в частности новых инвазивных видов. Важным элементом таких мероприятий является своевременное проведение мониторинга насаждений с последующим выявлением и идентификацией возбудителей, основанными на классических и современных методах.

Авторами впервые был выделен с корней земляники садовой с территории Крыма возбудитель фузариозного увядания – вид *F. brachygibbosum*, которого идентифицировали с помощью культурально-морфологического и молекулярного методов.

Экспериментально доказано, что оптимальной питательной средой для роста и активного спороношения возбудителей фузариозного увядания, грибов *F. oxysporum* и *F. brachigibbosum*, является КГА 2%. При изучении биологических особенностей этих видов грибов отмечены отличительные микро и макропризнаки, описаны индивидуальные культуральные характеристики изолятов, а также для молекулярной диагностики определены наиболее вариабельные маркеры: ITS1-5.8S-ITS2 и TEF, необходимые для точной и быстрой идентификации грибов.

В дальнейшем исследования по новым малоизученным инвазивным грибным возбудителям земляники садовой продолжатся, так как они представляют опасность для выращивания растений в производственных насаждениях и личных подсобных хозяйствах.

Список литературы

1. Козлова И. И. Состояние и тенденции формирования сортимента для производства ягод земляники //Современные тенденции устойчивого развития ягодоводства России (земляника, малина). – 2019. – С. 71-84.

2. Статистическая база данных по производству земляники
URL:<https://www.fao.org/faostat/en> Ссылка активна на 17.11.22.

3. Запрет поставок в Россию посадочного материала
URL:<https://fruitnews.ru/home/category/gos-novosti/evrosoyuz-s-10-iyulya-zapretil-postavki-v-rossiyu-posadochnogo-materiala-vklyuchaya-zemlyaniku-sadovuyu.html> Ссылка активна на 17.11.22.

4. Головин С. Е. Корневые и прикорневые гнили малины и микромицеты, ассоциирующиеся с ними//Современные тенденции устойчивого развития ягодоводства России (земляника, малина). – 2019. – С. 180-194.

5. Копина М. Б., Кузнецова А. А., Цветкова Ю. В. Малоизученные и особо опасные микозы в насаждениях земляники отдельных регионов России //Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2021. – №. 91. – С. 168-173. DOI: 10.21515/1999-1703-91-168-173

6. Головин С.Е., Глинушкин А.П., Зеркалов И.А., Белошапкина О.О., Копина М.Б. Патокомплекс почвенных микромицетов, ассоциирующихся с корневыми и прикорневыми гнилями земляники, в некоторых регионах России // Достижения науки и техники АПК. 2019. Т. 33. № 7. С. 62–70. DOI: 10.24411/0235-2451-2019-10715.

7. Michielse C. V. et al. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth //PLoS pathogens. – 2009. – Т. 5. – №. 10. – С. e1000637.

8. Fang X. et al. Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field, and cultivar responses to pathogens under controlled environment conditions //Phytopathologia Mediterranea. – 2012. – С. 69-84.

9. Koike S. T., Kirkpatrick S. C., Gordon T. R. Fusarium wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in California //Plant Disease. – 2009. – Т. 93. – №. 10. – С. 1077-1077.

10. Pest categorisation of *Fusarium brachygibbosum* (2021). EFSA Journal 19(11), 6887, DOI: 10.2903/j.efsa.2021.688.

11. Sequence contents of the Q-bank Fungi database. URL:<https://qbank.eppo.int/fungi/methodologies/IncludedSequences> Ссылка активна на 17.11.22.

12. National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. – URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> Ссылка активна на 17.11.22.

13. Белошапкина О. О. О биологических предпосылках и технологическом обосновании оздоровления посадочного материала садовых культур от вирусов //Вестник Чеченского государственного университета. – 2014. – №. 1. – С. 228-231.

^{1,2}**N. K. Kostin,**

¹**A. A. Kuznetsova,**

¹**M. B. Kopina,**

²**O. O. Beloshapkina**

¹Federal State Budgetary Institution "All-Russian Center for Plant Quarantine",
Russia, Moscow

²Russian State Agrarian University - Moscow Timiryazev Agricultural Academy,
Russia, Moscow

**CULTURAL AND MORPHOLOGICAL FEATURES OF *FUSARIUM*
OXYSPORUM AND *FUSARIUM BRACHYGIBBOSUM* SPECIES
ASSOCIATED WITH GARDEN STRAWBERRY PLANTS**