

МИКРОБИОЛОГИЯ ПОЧВ

УДК 631.4:632.163

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ПАТОГЕНА *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEB. НА КУЛЬТУРУ КЛУБНИКИ СОРТА «ELSANTA»

П. Шуберт², Дж. Голбэк¹, Х. Шверзел², П. Лентч¹, М.Д.Кусаинова³

¹ Центр сельскохозяйственных исследований ландшафтов им. Лейбница (ZALF), ул. Эберсвальде, 84, 15374 Мюнхеберг, Германия, ² Государственное управление по защите прав потребителей, сельского хозяйства и консолидации земель (LVL) FG, ул. Эберсвальде 84, 15374 Мюнхеберг, Германия, ³ ТОО «Казахский научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии им. У.У. Успанова, 050060, проспект аль-Фараби 75-В, madgu@inbox.ru

Наиболее распространенная опасная болезнь у клубники сорта «Elsanta» *Verticillium*, поражающая здоровые растения, вызывает их увядание или усыхание. Известно, что склонность к гибели у растения может сохраниться на всю вегетативную жизнь, эти симптомы могут выявиться только в течение года. Проводя анализы на 432 генотипов увядших и здоровых растений пораженных *Verticillium dahliae* Kleb., были выделены 8 полей и отобраны по методу ПЦР - генетическим отпечаткам пальцев. В стерильных условиях в климатической камере растения были привиты одним генотипом, использовалось 27 генотипов из 432. Воздействие на растения разные, в зависимости от генотипа с очень низким отклонением в генотипе. Симптомы генотипов можно разделить на апотагенетические, легко и сильно патогенные. При высокой температуре во второй климатической камере, признаки генотипов можно классифицировать как патогенные под холодным или теплым условиями. Влияние различных климатических условий на патогенные генотипы проводились на экспериментальном участке на здоровых растениях. По полученным результатам можно сделать заключение, что фактическая популяция в растениях этой инфекции - это главный фактор их увядания, смесь генотипов является ключевой для интерпретации различных классов симптомов. Использовать смесь разных генотипов для управления симптомами увядания можно в регионах с различными климатическими условиями (WO 2007/051654).

ВВЕДЕНИЕ

Сорт клубники «Elsanta» является одним из многих сортов, наиболее чувствительный к патогену *Verticillium* [1]. Основываясь на качестве, урожайности и длительности срока хранения плодов, сорт «Elsanta» является важным сортом в Центральной Европе. В прошлом *Verticillium* успешно контролировался химической дезинфекцией почвы, в том числе с помощью бромистого метила [2]. Однако этот метод, из-за содержания опасного химического вещества уменьшает популяцию почвенных микробов и возникает риск для здоровья человека и окружающей среды [3]. Поэтому, все методы и дезинфекционная химизация почвы являются незаконными в производстве клубники в Германии. В связи с ограничением использования

общего бромистого метила, мы сосредоточили наши исследования на управлении симптомами увядания с помощью микробных антагонистов, применяя их в почве и в растениях. Наши результаты с использованием коммерчески доступных бактерий в качестве антагонистов были непоследовательными и недостаточными. В практике можно избежать повышения увядания только при севообороте поля. Внесение в почву как почвенных микробов, так и гнили белых грибов, способствует снижению длительной и стабильной микросклерозии. Они разрушают меланин в склерозии, это первый шаг лизиса, затем происходит обесцвечивание мелониновых клеток химическим веществом для выделения ДНК в пробирке [4]. *Verticillium* выживает в почве в форме микросклерозии,

что является источником инокулянта, этим можно прогнозировать потенциал увядания у растений [5]. Численность микросклероциев в почве может отличаться от уровня увядания в поле. При этом, здоровые растения могут располагаться около пораженных. Распределение грибов в области часто описывается как клонное [6], также наблюдаются опасные точки колонизации в ризосфере растений [7]. Колонизация зависит от генотипа этого гриба. Мы выдвинули гипотезу, что исследуемые образцы увядших растений около здоровых - результат клонного распределения болезнетворного микроорганизма, обнаруживаемого в растениях как различная структура популяции *Verticillium*. Таким образом, мы исследовали степень симптомов увядания - это результат структуры популяции или различной патогенности из одного генотипа. Сравнивая растения с различными признаками увядания, мы обнаружили структуру популяции и патогенность генотипов в 8 местоположениях вдоль поперечного разреза приблизительно 400 км протяженностью, включая 4 округа.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ

Поля и изоляции

Для проведения опытов по определению увяданий, патогеном *Verticillium* в полевых условиях были выбраны 8 ферм по производству земляники. Они расположены в северо-восточной области Германии округа Мехленбург-Ворпомерн, Бранденбург, Сэчсен-Анхальт, Сэчсен, а также у побережья Балтийского моря с более мягкими погодными условиями (г. Росток) и более континентального г. Мюнхеберга.

Образцы почв и растений отбирались 3 года подряд. Для 5 фермерских полей одной культуры (клубника сорта «Elsanta») была составлена степень увя-

дания, инфицированных *Verticillium*. Признаки *Verticillium* в растении были классифицированы согласно рейтинговой шкале от 1 до 9 [8], сильно (1 место), без признаков (9 место). Образцы были взяты с каждой степенью признаков, 5 растений с сильными признаками, 5 растений со средними признаками и 5 здоровых растений. Образцы состояли из целого растения и приблизительно 2 кг почвы с корнями. Они хранились при температуре 0°C в полиэтиленовых пакетах.

Для получения изолятов *Verticillium*, каждый образец был разделен на растение и почву. Дальнейшая работа была проделана в стерильных условиях. 4 черешка растений были стерилизованы поверхностно и использованы для изоляции. Из каждого черешка, начиная с прилистников разделив их на 3 ломтика по 1 см в длину, были приготовлены 3 образца для выращивания в питательных средах (Чапек-Dox, агар овощной и черносливный, [9]). Условия роста: 26°C в течение 3 дней, сопровождая и оценивая визуальным выбором, для перехода на дальнейшее культивирование. ПЦР- был проведен анализ для выявления видов *Verticillium*. Грибковые изоляты, отбираются по одному из следующих морфологических признаков для генотипирования: по производству микросклероции, положению фиалиды, наличию меланинов гиф.

Генотипирование Verticillium

Штаммы, выделенные из растений морфологическими и генетическими методами с симптомами (1-9), были определены как подвиды *Verticillium*. Консенсусы последовательностей были проанализированы на основе имеющихся последовательностей ITS1-5.8Sr РНК региона в EMBL/NCBI генбанками. Был выбран вариант 3 программного обеспечения. *Verticillium tricorpus* - ДНК в

результате ПЦР-фрагмент 270 bp, ограничивается ферментом BstUI в двух фрагментах 220bp и 50 bp. *V. dahliae* и *V. albo-atrum* производства ПЦР-фрагмент длиной между 260 и 270 б.п., ограничены в два фрагмента 177bp и 85 92bp. Чтобы различать эти два вида, *V. dahliae* специфического праймера обратном [10] была использована в результате 370bp фрагмента *V. dahliae*. Ссылки штаммов были также определены этим методом.

Климатические условия в камере

Опыты над растениями были проведены для определения характеристик взаимодействия между растением и генотипом *V. dahliae*. В лабораторных условиях определено быстрое развитие симптомов начинающихся через 14 дней. В дальнейшем мы использовали коммерческую версию штрих-корня трансплантации, который продлил испытательный срок до 4 месяцев.

Растения, выращенные в контейнерах, заполнены стерилизованной или естественной почвой. Генотипы *Verticillium* выращивали в стерилизованной соломе, 3 г соломы с растением были смешаны с землей до посадки. Две климатические камеры были урегулированы аналогично с влажностью и освещенностью 8 ч. в день (16 ч. ночью) за цикл. Профиль температуры в камере 1 имитирует период с мая по сентябрь 2004 г., в то время как схема температуры в камере 2 было на 5 градусов ниже, имитируя прохладное условие по сравнению с относительно жарким состоянием в 2004 г. Живучесть растений оценивали по оценке симптомов с использованием рейтинговой шкалы 9-1.

Индивидуальное отношение к контролю было рассчитано и для статистики.

Экспериментальный участок

Полевые испытания проводились в вегетационный период в г. Мюнхенберге (графство Бранденбург) в течение 2006 и

2007 гг. Были отобраны растения с открытой корневой системой для пересадки в декабре 2005 года и хранились при температуре 0°C до воспроизводства в мае 2006 года. Растения были установлены в один ряд на 1,00 м., пространство между линиями 0,30 м. Опыты проводились по стандартам рекомендации, включая разбрызгиватель для ирригации. Место посадки, как известно, было сильно заражено *Verticillium microsclerotia*. Потери культуры сорта «Elsanta», связанные с *Verticillium*, составили около 50 %. Генотипы *Verticillium* были выращены на стерилизованной пшеничной соломе. Через 10 дней солома полностью заросла мицелием. 3 г соломы с колонией было помещено в каждую ямку перед посадкой. Опыт состоял из 7 вариантов и контроля: генотипов (337), В (806), С (784), комбинации А + В, В + С, А + С и смесь А + В + С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генотипы и климатические условия в камере

Отобранные ПЦР-основные генотипы, полученные из черешков, были подходящие по методу различия *Verticillium dahliae* (98 % от генотипа) и *V. albo-atrum* (2 % от генотипа). *V. tricorpus* не были обнаружены. Неожиданно мы нашли, *Verticillium* в здоровых растениях.

Подобные анализы были проведены для более 400 штаммов *V. Dahliae*, что дает возможность поделить их на 13 генетических групп. Каждый участок был заселен генотипом на расстоянии до 10 групп.

Генотипы *Verticillium* были разделены на 4 группы реакций, в соответствии с их температурным воздействием на увядание клубники в климатических камерах.

Штаммы могут быть классифицированы как сильно патогенный, например, изолирует 227, 503 и 564 или апатогенный, например, изоляты 27, 337, 341, 429, 544, 546 (таблица 1). Производство изолятов ощутимых симптомами увядания при стан-

дартных климатических условиях: 292, 806, 810 (холодно индуцированные патогены), тогда как другие симптомы увяда-

ния индуцированных при более высоких температурах, например, 840, 545, 66, 800, 1789 (тепло индуцированные патогены).

Таблица 1 – Признаки увядания растений, привитые различными генотипами *V.dahliae* три эксперимента в двух климатических условий (стандартные, погода 2004 г.) в климатических камерах. Симптомы увядания различаются по отношению к контролю, они выделены жирным шрифтом

Варианты	агаровая среда		Почва с уменьшенной микрофлорой		Естественная почва (120)	
	стандартный	подверженный атмосферным воздействиям	стандартный (50)	подверженный атмосферным воздействиям (114)	стандартный	подверженный атмосферным воздействиям 2004
Контроль	0 (69)	0(68)	0	-1	0	0
227	-67	-59	-24	-31	-23	-20
503	-32	-39	-28	-33		
564	-59	-51	-18	-16		
292			-15	4	-20	-6
810	-11	6	-8	4		
840			5	-5	-7	-26
545			8	-14	29	-20
66	-32	-27	4	-23		
800	0	-15	-3	-10	0	-8
1789	-5	-11	19	-8		
341	8	1	-3	11	16	37
27	-4	-7	-1	0	-6	-7
429			4	-5	4	22
544			7	4	6	14
546			7	-5	5	12
337	1	-2	-1	3	-7	-2
784			1	-15	10	-5
806	-12	-3	-13	-4	-15	-3
227x337					12	-13
840x27					6	6
227x840x27					2	1
292x806					-4	9

Сильные патогенные генотипы показали серьезный, признак увядаемости на всех растениях, независимо от субстрата и температуры. Апатогенные генотипы также вызвали последовательную реакцию в исследуемых растениях. В связи сочетанием с естественной почвой и теплыми условиями (контейнер 1) немного увеличился рост растения, за исключением одного генотипа.

Признаки увядания может отличаться между экспериментами в случаи прививки с температурно-зависимыми генотипами, например, изолируется 840, 66 и

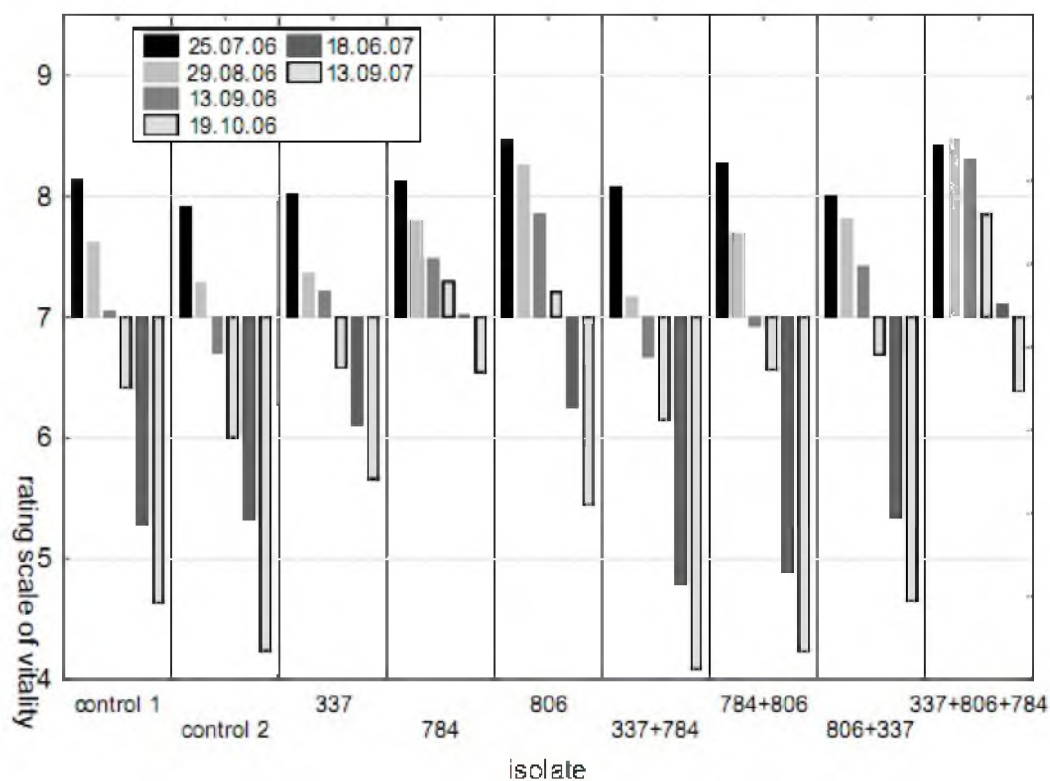
784. Смесь в равных пропорциях из двух или трех генотипов (в общей посевной 3 г на растение) привело к снижению симптомов по отношению к одной прививке штамма. Следующие комбинации показали снижение симптомов увядания на растениях: Комбинация сильного патогена объединилась с одним апатогеном (227x337), комбинация теплого патогена с апатогенотическим генотипом (840x27), комбинация сильного, теплого патогена и апатогена (227x840x27) или комбинация двух холодных слабо-вызванных генотипов (292x806).

Географическое распределение генотипов, разделенных по группам реакции, показывает регулярность в отношении их возникновения. На всех полевых территориях теплые патогенные подтипы имеют тенденцию к преобладанию популяции *V. dahliae*. Опыты показали, что признак сильной слабости показывают 2 высокопатогенных штамма.

Экспериментальный участок

На экспериментальном участке изолированы 337 (апатогенных), 784 (незначительно тепло патогенных) и 806 (холодных патогенных), комбинации этих штаммов были проверены потенциалом контроля смеси (А+В+С) для оценки увядания. В июле 2006 г. после 2-месячного внедрения, произошли незначительные различия в живучести (рисунок 1).

Рисунок 1 –Признаки увядания сорта «Elsanta», пораженные генотипами *Verticillium dahliae*, их комбинациями и смесью этих трех генотипов в эксперименте с растениями. варианты (контроль, рейтинговую шкалу: 1 = пораженный, 9 = здоровое растение), характеризуется высоким уровнем увядание



В октябре 2006 г. изолированы 784 и 806, их смесь привела к оздоровлению растений. В варианте смеси 2 % растений показали незначительный признак увядания 6-го уровня, другие растения были здоровы на 27 % уровне 7, а на 71 % на уровне 8-9.

В июне второго года эксперимента 20 % растений контрольного варианта вымерли, у 40 % появились симптомы, и 40 % были здоровы. Напротив, обработан-

ные 784 и в смешенных участках, большинство растений были здоровы в июне для 784 74 % и для смешенных 80 %.

В сентябре 2007 г. общая жизнеспособность уменьшилась, но 71 % растений, обработанных 784 и 68 % в смешанных генотипах, были здоровы. Жизнеспособность растений на контроле также уменьшилась, в результате чего 30 % растений были здоровые и 30 % - мертвые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение с помощью выбранных генотипов *Verticillium* существенно сохраняет жизнеспособность клубники сорта "Elsanta" в течение 14 месяцев. Необходи-

мы дальнейшие исследования, чтобы проанализировать динамику колонизации грибовых генотипов во взаимодействии с растительной реакцией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тахматсидов В.И., Пэрussi Г., Воятзис Д. Оценка сопротивления различных земляничных генотипов к *Verticillium dahliae* Kleb. // Отчеты Hort. 2002. № 579. Р. 457-460
2. Вильгельм С., Полус А.О. Какая польза от фумигации почвы в Калифорнийской промышленности клубники. // Болезнь растений. 1980. № 64. С. 264-270
3. Дэ Кал А., Мартинес-Трецено А., Лопес-Аранда Дж.М., Мельгарехо П. Химические альтернативы бромистого метила в Испанском клубничном питомнике // Болезнь растений. 2004. № 88. С. 210-214
4. Батлер, М.Дж., Гардинер, Р.Б., Дэй А.В. Деградация меланина или ингибирования его синтеза: эти значительный подход для биологического контроля фитопатогенных грибов. // Биологический контроль. 2005. № 32. С. 26-336
5. Термошуизен А.Дж., Дэвис, Дж.Р., Горт Г., Харрис Д.С., Хюзмэн О.К.; Лэзэровитс, Г., Локк, Т., Вара, Дж. М.М., Мол Л., Raplomatas, Э.Дж.; Плэтт, Х.В.; Пауэлсон М., Роуз Д.И., Роу, Р.С., Цорр Л. Межлабораторные сравнение методов количественного микросклерозии из *Verticillium dahliae* в почве. // Прикладная и экологическая микробиология. 1998. № 64. С. 3846-3853
6. Морган Д., Стивенсон В.Р., Мак-Гвидвин А.Е., Келлинг К.А., Биннинг Л.К., Чжу Дж. Динамика возбудителя растения динамики населения в картофельных полях. // Нематология. 2002. № 34. С. 189-193
7. Голлбэк Дж. J., Августин, С.; Lentzsch, П. и Вернер, А. Патогены генетических подтипов *Gaeumannomyces graminis* на зерновых. // Биология и биохимия почв. 2004. № 36. С. 145-154
8. Бюттнер Р. Исследования по методике *Verticillium* разведения и селекции сопротивление возможности для создания базы для выращивания клубники в ГДР, институт плодовых исследований Дрезден-Pillnitz. Дрезден. 1985. 48 с.
9. Кабир З., Бхат Р.Г., Суббарао К.В. Сравнение средств массовой информации для восстановления *Verticillium dahliae* из почвы. // Болезни растений. 2004. № 88. С. 49-55
10. Аспромоукос И. Количественный анализ ДНК *Verticillium dahliae* в растениях посредством исследования ПЦР и жидкостной хроматографии. Институт фитопатологии и прикладной зоологии имени Юстуса Либиг Гиссена. Гиссен. 2002.
11. Лентч П., Голлбэк Дж. Генетическое разнообразие *caliginosa* *Aporrectodea* земельных участков в Северном-Бранденбурге, Германия. // Педобиология. 2006. № 50. С. 369-376

ТҮЙІН

Құлпынай дақылылының «Elsanta» сортының ең көп тараған ауруы *Verticillium* болып табылады. Ол тәуір өсімдіктерді жаралап, олардың солуына немесе кеуіп кетуін туғызады. Бұл жарақаттану өсімдіктің бүкіл вегетативтік өмірі бойына жалғасады және белгілері тек жыл ішінде байқалады. *Verticillium dahliae* Kleb. жарақаттанған өсімдіктердің 432 генетипі талқылаудан өткізіліп, ПЦР- генетикалық қол таңба машинасы арқылы тәуір өсімдіктердің 8 жолы анықталды. Стерильді жағдайда климаттық камераларда бір генотиппен 432 – нің ішінен 27 – і егілген. Өсімдіктерге генотиптердің әсері деңгейіне байланысты әртүрлі келеді. Генотиптердің белгілерін мынадай түрлерге жіктеуге болады: апотагонетикалық, жеңіл, күшті патогенді. Жоғары температура кезінде екінші камерада генотиптердің түрлерін салқын немесе жылы

жағдайдағы патогенді деп жіктеуге болады. Патогенді генотиптерге климаттық жағдайлармен әсер ету тәжірибесі камераларда тәуір өсімдіктерге жүргізілді. Алынған нәтижелер бойынша, өсімдіктердің бойындағы патогеннің популяциясының мөлшері, өсімдіктердің солып, не кеуіп кету ықтималдылығына әсер ететін негізгі кілт болып табылады. Генотиптердің әртүрлі қоспасы солып кету белгілерін қалпында сақтауға мүмкіншілік береді. Бұл генотиптердің қоспасын климаттық жағдайы әртүрлі аймақтарда пайдалануға да болады (WO 2007/051654).

SUMMARY

In the most common strawberry cv. «Elsanta», *Verticillium* infection can lead to rapid and strong wilt up to death of plants. It is known, that a death plant can be stand as a direct neighbour to complete vital ones, wilt symptoms can differ per year. 432 genotypes of *Verticillium dahliae* Kleb. from wilted and vital plants were isolated from 8 fields and typed by PCR-fingerprints. Under sterile conditions in a climate chamber plants were inoculated by a single genotype, using 27 genotypes out of the 432. Plant reactions were different in relation to the genotype with very low deviation per genotype. Wilt symptoms of these genotypes can be classified as apathogenic, mild and strong pathogenic. Under enhanced temperature of a second climate chamber, symptoms are useable to classify genotypes further as pathogenic under cold or warm conditions. A mixture of different climate-depended pathogenic genotypes was tested in a plot experiment resulting in vital plants with enhanced growth. From these data we conclude that the actual population in the plant is the main factor for wilt symptoms, the mixture of genotypes is the key for interpreting different symptom classes. Mixture of different genotypes can be used to control wilt symptoms for different climate regions (WO 2007/051654).