Гринько Н.Н.

**Внутривидовая изменчивость гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* J.C.–
возбудителя фузариоза *Lactuca sativa* L.**

Адлерская опытная станция – филиал ФГБНУ ФИЦ ВИГРР
им. Н.И.Вавилова (ВИР)
(Россия, Сочи)

doi: 10.18411/sr-10-04-2019-52

idsp: sciencerussia-10-04-2019-52

Аннотация

Впервые дана оценка внутривидового разнообразия гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* J.C. – возбудителя фузариоза *Lactuca sativa* L. Выделены 4 морфотипа и доказаны их различия по паразитическим признакам. Установлены уровни сходства локальных популяций гриба.

Ключевые слова: грибы, патоген, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum*, морфотипы, локальные популяции, агрессивность.

Abstract

For the first time, the assessment of the intraspecific diversity of the fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* is the causative agent of *Fusarium Lactuca sativa*. Four morphotypes were identified and their differences by parasitic characters were proved. Established levels of similarity of local populations of the fungus.

Key words: fungi, disease, *Fusarium*, local populations, morphotypes, variability, aggressiveness.

Введение

Фузариозное увядание салатов (*Lactuca sativa* L.) повсеместно относится к числу экономически значимых заболеваний, резко снижающих товарную и семенную продуктивность культуры [14 – 16]. Впервые фузариоз зафиксирован нами на образцах салатов из геноресурсной коллекции ВИР, репродуцируемых в малообъемной культуре на экспериментальной базе Адлерской ОС [3, 4]. Инфицированные в сильной степени растения (сопровожденные гнилью красновато-желтые некрозы корней и сосудов; округло-эллипсоидальные светло-коричневые пятна на листьях с хлоротичными жилками), задерживались в росте, желтели, увядали и погибали. Из пораженных растений нами выделен гриб, идентифицированный по морфологическим признакам как *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* J.C. Hubb. & Gerik (1993), – макроконидии с дорсивентральной кривизной и 5–7 перегородками (средний размер 38,5 x 4,6 мкм), хламидоспоры (средний размер 11,5 мкм) [11, 13].

Актуальность проблемы снижения вредоносности заболевания в коммерческих товарных и семенных посадках салатов, обусловила полномасштабный мониторинг микроэволюционных процессов в природных популяциях *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* в различных эколого–географических регионах мира [14 – 16]. К настоящему времени в России практически отсутствуют сведения, характеризующие внутривидовое разнообразие возбудителя фузариоза.

В этой связи цель исследований – анализ популяционной изменчивости гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* по полиморфным признакам.

Материалы и методы

Внутривидовую структуру гриба *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* оценивали в 2013 – 2018 гг. Объектом исследования служили моноспоровые культуры, выделенные из семян и пораженных фузариозом сортов салатов [2, 12]. Локальные популяции обозначали начальными буквами латинских названий выборок инфекционного материала: ризосфера (*Rhizosphere* – *Rhi*), корни (*Radix* – *Rad*), стебли (*Kaulos* – *Kau*), листья (*Folium* – *Fol*), семена (*Seminis* – *Sem*). Из ризосферы гриб выделяли методом посева взвеси частиц торфосубстрата в стерильной воде на картофельно–глюкозный агар (КГА) с добавлением до стерилизации медицинской желчи (15 мл/л) + стрептомицина (0,3 г/л). Обработанные 70%-м спиртом семена и отрезки корней, стеблей, листьев (размер 0,5–1 см) инкубировали в чашках Петри на КГА в термостате при температуре 24–26°C. Для получения изолированных компактных колоний, в КГА до стерилизации добавляли тритон X-100. Изоляты отсеивали в пробирки на КГА через 3 сут. [1, 9]. Регламентируемые классическим популяционным анализом [5, 8] морфолого-культуральные и паразитические (радиальная скорость роста_ *Kr*, агрессивность_ *Agr*, фитотоксичность_ *Fit*) признаки – маркеры, описывали соответственно у 83 и 50 изолятов. Для оценки морфолого-культуральных признаков изоляты выращивали в чашках Петри на КГА в термостате при температуре 24–26°C. На 7–10 сут. описывали топографию колоний – по Неегарду и Билай [1, 5], пигментацию – по шкале Бондарцева в модификации Кутафьевой [7]. Радиальную скорость роста_ *Kr* изолятов рассчитывали по среднему диаметру колоний на 3–5–7 и 10 сут. инкубирования. Агрессивность_ *Agr* изолятов тестировали на дисках (диаметр 1–1,5 см), вырезанных стерильным пробочным сверлом из листьев салатов. На каждый диск наносили по 5 капель инокулюма изолята в концентрации 5×10^5 спор/мл, диаметр некрозов учитывали на 3-е сут. после инокуляции. Фитотоксичность_ *Fit* изолятов определяли по степени торможения линейного роста корней 3-х суточных проростков кукурузы по методике Берестецкого [9]. В работе использовали неочищенные культуральные фильтраты, полученные при инкубировании изолятов в течение 10–14 сут. на жидкой картофельно–глюкозной среде. Опыты проводили в двукратной повторности. Полученные данные ранжировали в баллах (*b*) по шкалам: [*Kr* (мм/сут. = балл): минимальная (0–1= 0...1), низкая (1,1–3= 1,1...2), средняя (3,1–4= 2,1...3), высокая (4,1–5= 3,1...4), максимальная (5,1–6= 4,1...5); *Agr* (см²/ = балл): минимальная (0–1= 0...1), низкая (1,1–1,5= 1,1...2), средняя (1,6–2= 2,1...3), высокая (2,1–2,5= 3,1...4), максимальная (2,6–3= 4,1...5); *Fit* (% = балл): минимальная (10–20= 0...1), низкая (21–40= 1,1...2), средняя (41–60= 2,1...3), высокая (61–80= 3,1...4), максимальная (81–100= 4,1...5)].

Внутривидовое разнообразие и степень сходства популяций определяли по среднему числу (μ) и доле редких морфотипов (*h*) по методике Животовского [6]. Частоту распределения морфотипов по анализируемым признакам оценивали с помощью индекса разнообразия Шеннона (*H*) по формуле: $H = - \sum p_i \ln p_i$, где p_i – частота *i*-го морфотипа [10]. Экспериментальные данные обрабатывали методами статистического анализа с использованием пакетов прикладных программ Excel и Statistica.

Результаты и обсуждение

В природной популяции гриба *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* обнаружены изоляты, различающиеся по морфолого-культуральным и паразитическим признакам, стабильно наследуемым при повторных пересевах.

Морфолого-культуральные признаки. Доказан полиморфизм изолятов гриба по текстуре и пигментации стромы, воздушного и субстратного мицелия. Исходя из дискретности тонов выделили 4 основных морфотипа: *vin*– винный, *ros*– розовый, *pur*– пурпурный, *lil*– лиловый [11]. В соответствии с топографией колоний и воздушного мицелия морфотипы дифференцировали как: бархатистые и шерстистые – *vin* и *ros*,

бархатистые, тонко-пушистые и пленчато-паутинистые – *pur*, пушистые, шерстистые и хлопьевидно-войлочные – *lil*. Состав и соотношение изолятов варьировали существенно (Рис.1).

Рисунок 1. Характеристика разнообразия морфотипов в локальных популяциях *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactiscum*

Условные обозначения: Локальные популяции: I – *Rhi*_ризосфера, II – *Rad*_корни, III – *Kau*_стебли, IV – *Fol*_листья, V – *Sem*_семена; морфотипы: *vin*– винный, *ros*– розовый, *pur*– пурпурный, *lil*– лиловый; μ – среднее число морфотипов, h – доля редких морфотипов, H – индекс Шеннона.

Доминировали *vin* ($\mu=10,7\pm0,09$; $H=2,58$) и *ros* ($\mu=8,35\pm0,11$; $H=2,58$) морфотипы; средним уровнем разнообразия отличались – *pur* ($\mu=3,2\pm0,11$; $H=1,86$), а низким – *lil* ($\mu=0,85\pm0,13$; $H=0,95$). Высокой частотой морфотипов выделялись локальные популяции *Rhi* ($\mu=3,88\pm0,07$), *Rad* ($\mu=3,72\pm0,07$) и *Kau* ($\mu=3,61\pm0,11$), средней – *Fol* ($\mu=2,86\pm0,14$), а низкой – *Sem* ($\mu=1,96\pm0,23$). При этом долей редких морфотипов отличалась популяция *Kau* ($h=0,10\pm0,007$). Установлена сильная корреляционная связь между популяциями: *Rhi* и *Rad* – *Kau* – *Fol* – *Sem* ($Cr=0,96-0,99$); *Rad* и *Kau* – *Fol* ($Cr=0,98-0,99$); *Sem* и *Rad* – *Kau* – *Fol* ($Cr=0,77-0,87-0,82$).

Паразитические признаки.

Патологическое воздействие форм *Fusarium oxysporum* на растения обусловлено основными паразитическими свойствами – инфекционностью, скоростью мицелиального роста, агрессивностью и токсичностью [1].

По признаку радиальной скорости роста *Kr* подтверждена существенная изменчивость морфотипов ($Cv=24,3\%$), обоснованная высокой корреляционной зависимостью ($Cr=0,79\pm0,09$) между средним баллом ($b_s=3,16\pm0,11$; $b_{\min-\max}=0,71-4,92$) и стандартным отклонением ($\sigma=1,31$). В локальных популяциях патогена максимальными и высокими показателями *Kr* отличались морфотипы *vin* ($b_s=4,38\pm0,07$; $b_{\min-\max}=3,72-4,92$) и *ros* ($b_s=3,90\pm0,11$; $b_{\min-\max}=2,85-4,79$). Частота изолятов *vin*– морфотипа с максимальными значениями *Kr* ($H=1,42$) оказалась существенно больше, чем с высокими ($H=0,88$) (Рис. 2). Для изолятов *ros*– морфотипа характерны максимальные ($H=1,38$), высокие ($H=0,85$) и средние ($H=0,48$) показатели *Kr*. Средние ($H=1,84$) и низкие ($H=0,35$) значения *Kr* выявлены у изолятов *pur*– морфотипа ($b_s=3,04\pm0,10$; $b_{\min-\max}=2,59-3,33$). Изоляты *lil*– морфотипа отличались низкими ($H=1,45$) и минимальными ($H=0,46$) показателями *Kr* ($b_s=1,07\pm0,04$; $b_{\min-\max}=0,71-1,48$). Основываясь на данных *Kr*, морфотипы систематизировали по группам: быстро– *vin* и *ros* средне– *pur* и слаборастущие *lil*. Значения *Kr* морфотипов и индекс Шеннона находились в сильной корреляционной связи ($Cr=0,79\pm0,23$).

По признаку агрессивности_ *Agr* морфотипы варьировали существенно ($Cv=38,4\%$), что подтверждено высокой корреляционной зависимостью ($Cr=0,86\pm0,07$) показателей среднего балла ($b_s=3,54\pm0,07$; $b_{\min-\max}=0,64-4,97$) и стандартного отклонения ($\sigma=1,51$). Изоляты *vin* – морфотипа характеризовались максимальными ($H=1,38$) и высокими ($H=1,32$) значениями *Agr* ($b_s = 4,32\pm0,07$; $b_{\min-\max}=3,32-4,97$) (Рис. 2).

Рисунок 2. Дифференциация морфотипов *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* по паразитическим признакам и индексу Шеннона

Условные обозначения: Морфотипы: *vin*– винный, *ros*– розовый, *pur*– пурпурный, *lil*– лиловый; признаки: *Kr*_радиальная скорость роста, *Agr*_агрессивность, *Fit*_фитотоксичность; I – балл (b_s): а– минимальный, b– низкий, c– средний, d– высокий, q – максимальный; II – индекс Шеннона (H).

В структуре *ros*– морфотипа выделены изоляты с максимальными ($H=1,35$), высокими ($H=1,09$) и средними ($H=0,61$) показателями *Agr* ($b_s = 3,69\pm0,08$; $b_{\min-\max}=2,03-4,92$). Изоляты *pur*– морфотипа отличались средними ($H=1,23$) и низкими ($H=1,18$) значениями *Agr* ($b_s = 2,17\pm0,06$; $b_{\min-\max}= 1,45-2,95$). Для *lil*– морфотипа типичны изоляты с низкими ($H=1,45$) и минимальными ($H=0,46$) показателями *Agr* ($b_s = 1,06\pm0,08$; $b_{\min-\max}= 0,83-1,23$). Согласно значениям *Agr* морфотипы классифицировали по группам: высоко – *vin* и *pur*, средне – *ros*, слабоагрессивные – *lil*. Между показателями *Agr* и индексом Шеннона доказана сильная корреляционная связь ($Cr=0,93\pm0,14$).

По признаку фитотоксичности_ *Fit* морфотипы различались значимо ($Cv=37,3\%$), что обосновано высокой корреляционной зависимостью ($Cr=0,94\pm0,05$) между показателями среднего балла ($b_s=3,35\pm0,09$; $b_{\min-\max}=0,54-4,89$) и стандартного отклонения ($\sigma=1,25$). Максимальными ($H=1,78$) и высокими ($H=1,40$) значениями *Fit* отличались изоляты *vin* – морфотипа ($b_s= 4,15\pm0,08$; $b_{\min-\max}=3,12-4,89$) (Рис. 2). В структуре *ros* – морфотипа выявлены изоляты с максимальными ($H=1,08$), высокими ($H=1,22$) и средними ($H=0,85$) показателями *Fit* ($b_s=3,79\pm0,19$; $b_{\min-\max}=2,34-4,79$). Изоляты *pur* – морфотипа выделялись средними ($H=1,36$) и низкими ($H=0,83$) значениями *Fit* ($b_s=2,19\pm0,1$; $b_{\min-\max}=1,75-2,55$). Для изолятов *lil*– морфотипа свойственны низкие ($H=0,92$) и минимальные ($H=1,38$) показатели *Fit* ($b_s = 0,82\pm0,12$; $b_{\min-\max}=0,54-1,09$). Исходя из данных *Fit*, морфотипы дифференцировали по группам: высоко – *vin* и *ros*, средне – *pur*, слаботоксичные – *lil*. Значения *Fit* и индекс Шеннона находились в сильной корреляционной зависимости ($Cr= 0,87\pm0,18$).

Между паразитическими признаками морфотипов *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* подтверждена высокая корреляционная связь: *Kr* – *Agr* ($Cr= 0,95\pm0,07$), *Kr*

– *Fit* ($Cr = 0,98 \pm 0,04$), *Agr* – *Fit* ($Cr = 0,97 \pm 0,05$). Кластерным анализом доказано близкое сходство *vin* и *ros* морфотипов (Рис. 3).

Рис. 3. Дендрограмма сходства морфотипов *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* по паразитическим признакам

Анализ данных паразитических признаков *Kr* – *Agr* – *Fit* и индекса Шеннона в локальных популяций выявил доминирование *Rhi* и *Rad* ($bs = 3,5 - 3,13 - 2,99$ и $3,31 - 3,26 - 2,99$; $H = 2,1 - 2,59 - 3,11$ и $2,58 - 3,02 - 2,75$); средними показателями отличались *Kau* и *Fol* ($bs = 3,05 - 2,8 - 2,68$ и $2,54 - 2,31 - 2,33$; $H = 2,4 - 2,45 - 2,51$ и $1,64 - 1,61 - 1,64$), а минимальными – *Sem* ($bs = 1,76 - 1,66 - 1,56$; $H = 0,92 - 0,70 - 0,81$) соответственно (Рис. 4).

Рисунок 4. Дифференциация локальных популяций *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* по паразитическим признакам и индексу Шеннона

Условные обозначения: Локальные популяции: I – *Rhi*_ризосфера, II – *Rad*_корни, III – *Kau*_стебли, IV – *Fol*_листья, V – *Sem*_семена; признаки: *Kr*_радиальная скорость роста, *Agr*_агрессивность, *Fit*_фитотоксичность, *bs* – балл, *H* – индекс Шеннона.

Кластерным анализом с арифметическим усреднением данных внутривидового разнообразия и паразитических признаков морфотипов, подтверждено близкое сходство локальных популяций *Rhi* и *Rad*. Отдаленное расположение *Sem* в кластере объясняется низкими и минимальными значениями признаков (Рис. 5).

Итак, обнаруженный нами полиморфизм естественной популяции паразита не противоречит известным сведениям о разнонаправленной изменчивости более чем 70 патогенных форм *Fusarium oxysporum*, включая *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* [1, 14, 15].

Рис. 5. Дендрограмма сходства локальных популяций *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* по разнообразию и паразитическим признакам морфотипов

Так, согласно классическим постулатам, популяция фитопатогена как совокупность особей, входящих в био – и/или агроценоз, проявляет паразитические свойства только при контакте с растением-хозяином. На разнокачественных сортах и видах образуется популяция паразита, адаптированная именно к соответствующему генотипу хозяина [5, 8]. Следовательно, на смеси генотипов, поскольку изоляты выделены из пораженных фузариозом коллекционных салатов различного эколого–географического происхождения, формируется популяция патогена с более высоким уровнем полиморфизма паразитических свойств, чем на чистотипных сортах [2 – 4, 12]. Превалирование интенсивно окрашенных морфотипов *vin*, *ros* и *pur* в популяциях *Rhi_ризосфера*, *Rad_корни* и *Kau_стебли* объяснимо с точки зрения взаимосвязи – между пигментацией и процессами метаболизма в определенных условиях функционирования паразита. Известно, что токсины и ферменты обеспечивают формам *Fusarium oxysporum* конкурентное заселение и вытеснение из экологических ниш других почвообитающих грибов, равно и ингибируют процессы метаболизма в клетках инфицированного растения-хозяина [1]. Выделение паразита из семян позволяет отнести их к числу основных, а не потенциальных источников инфекции. Многолетнее размножение на малообъемной гидропонике гетерогенных по уровню устойчивости к паразиту генотипов салатов, способствует аккумуляции хламидоспор в торфосубстрате, на растительных остатках и в семенах, что обеспечивает постоянную циркуляцию паразита в агроценозе культуры и, как следствие, прогрессирующий характер развития фузариоза [2 – 4, 12].

Выводы

Таким образом, впервые дана оценка внутривидового разнообразия гриба *Fusarium oxysporum f.sp. lactucum* J.C. – возбудителя фузариоза *Lactuca sativa* L. Выделены 4 морфотипа и доказаны их различия по паразитическим признакам. Установлены уровни сходства локальных популяций гриба.

1. Билай В.И. Фузариозы. – Киев: Наукова думка, 1982. – 442с.
2. Генетические ресурсы *Lactuca sativa* ВИР: репродукция 2017г. – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#.
3. Гринько Н.Н., Туренко В.П. Полиморфизм образцов салата из коллекции ВИР по признаку устойчивости к фузариозу// Корневые гнили сельскохозяйственных культур: биология, вредоносность, системы защиты: Матер. межд. науч.-практ. конф. Краснодар, 14–17 апреля 2014 г. /отв. ред. М.И.Зазимко. – Краснодар: КубГАУ, 2014. – С. 15 – 18.
4. Гринько Н.Н. Генофонд *Lactuca sativa* ВИР как источник устойчивости к фузариозному увяданию, сопряженной с ценными хозяйственными признаками// Наука России: Цели и задачи/ Сборник научных трудов, по материалам XIII международной науч.-практ. конф. 10 февраля 2019г. – Екатеринбург: НИЦ «Л-Журнал», 2019. – Ч.3. – С. 52–58. / <http://science-russia.ru/> doi:10.18411/sr-10-02-2019-55.
5. Дьяков Ю.Т. Популяционная биология фитопатогенных грибов. – М.: ИД «Муравей», 1998. – 384с.

6. Животовский А. Л. Показатели популяционной изменчивости по полиморфным признакам// Фенетика популяций. – М.: Наука, 1982. – С. 38 – 44.
 7. Кутафьева Н.П. Морфология грибов. – Новосибирск: Сиб. унив. изд - во, 2003. – 215с.
 8. Левитин М.М. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов. – Л.: Агропромиздат: Ленинград. отд - ние, 1986. – 208с.
 9. Методы экспериментальной микологии. – Киев: Наукова думка, 1982. – 550с.
 10. Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 181с.
 11. Полиморфизм гриба *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#.
 12. Репродукция геноресурсов *Lactuca sativa* L. ВИР_2018 – URL: https://www.facebook.com/nina.grinko/photos_albums#.
 13. Hubbard J.C., Gerik J.S. A new wilt disease of lettuce incited by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* forma *specialis* nov.// Plant Disease, 1993. – V. 77, № 7. – С. 750–754.
 14. Gilardi G., Franco P.S., van Rijswijk P.C.J., Ortu G., Gullino M. L., and Garibaldi A. A new race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucae* of lettuce// Plant Pathology, 2017. – V. 66, № 4. – P. 677– 688.
 15. Maria Esther de N. Fonseca & Kátia R., Brunelli & Mauricio Rossato & Hécio Costa & Leonardo S., Boiteux & Ailton Reis Accepted. Relationships among Brazilian and worldwide isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* race 1 inferred from ribosomal intergenic spacer (IGS-rDNA) region and EF-1 α gene sequences Cléia S. Cabral &// Eur. J. Plant Pathol., 2018. – V. 152. – P. 81–94 <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1453-4>.
 16. Ventura J.A., Costa H. *Fusarium* Wilt Caused by *Fusarium oxysporum* on Lettuce in Espirito Santo, Brazil. – Plant Dis., 2008. – V. 92, № 6. – P. 976.
-