N E W S
OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL
ISSN 2224-5308
Volume 6, Number 318 (2016), 145 – 150

N. T. Amirkhanova, A. S. Rsaliyev, Zh. U. Pakhratdinova

Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan.
E-mail: n.amirkhanova@mail.ru, aralbek@mail.ru, zhazyra_555@mail.ru

VIRULENCE OF KAZAKHSTANI *PSEUDOPERONOSPORA CUBENSIS* ROSTOWZ FUNGUS POPULATION

Abstract. This paper presents the results of studies of virulence of cucumber's downy mildew isolates (*Ps. cubensis*) extracted from the samples in different areas of Kazakhstan. During analysis for the study of fungus virulence, it was identified 15 physiological races that differ in the frequency of occurrence and aggressiveness. Population structure studies showed that the physiological races differ with considerable genetic diversity and virulence. The most virulent races are 39, 53, 54 and 55 under optimum conditions of its growth. On occurrence frequency and Shannon's diversity index among *Ps. cubensis* fungus populations mainly dominated medium virulent races – 7, 21, 22, 35, 38, 52, 98 (20 %; N = 3.63).

Keywords: downy mildew, *Ps. cubensis* fungus, test-varieties, physiological races, virulence, occurrence frequency.

УДК 632.91:632.938

Н. Т. Амирханова, А. С. Рсалиев, Ж. У. Пахратдинова

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан

ВИРУЛЕНТНОСТЬ КАЗАХСТАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ГРИБА *PSEUDOPERONOSPORA CUBENSIS* ROSTOWZ

Аннотация. Приведены результаты исследований вирулентности изолятов возбудителя переноспороза огурца (*Ps. cubensis*), выделенных из образцов собранных в разных районах юга-востока Казахстана. На основе анализа по изучению вирулентности отдельных рас гриба нами дифференцированы 15 физиологических рас, которые различаются по частоте встречаемости и агрессивности. Изучение структуры популяции показало, что физиологические расы отличаются значительным генетическим разнообразием и вирулентностью. Наибольшей и высокой вирулентностью обладали расы 39, 53, 54 и 55 при оптимальных условиях своего развития. А по частоте встречаемости и индексу разнообразия Шеннона в популяциях гриба *Ps. cubensis* в основном доминировали средневирулентные расы – 7, 21, 22, 35, 38, 52, 98 (20 %; H = 3,63).

Ключевые слова: переноспороз, гриб *Ps. cubensis*, тест-сорта, физиологические расы, вирулентность, частота встречаемость.

Введение. Гриб *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz – возбудитель переноспороза, один из наиболее вредоносных и распространенных заболеваний огурца. Возбудитель обладает высокой агрессивностью и широкой адаптивностью, непрерывно расширяет круг растений-хозяев и паразитирует на широком наборе культурных и диких видов семейства *Cucurbitaceae* [1]. В исследованиях естественного и искусственного заражения генотипов семейства тыквенных на внедрение патогена *Ps. cubensis* по реакцию вирулентности были определены, что набор растений-хозяев данного патогена, включают более 60 видов и 20 родов семейства *Cucurbitaceae*. Из них род *Cucumis* имеет больше всего растений-хозяев: 30 диких видов и 2 культурных вида (*Cucumis*

sativus и *Cucumis melo*) [2, 3]. В Индии и Израиле гриб был зарегистрирован на 13 видах и подвидах из 7 родов, а в Чехии патоген был обнаружен на 9 видах *Cucumis*. В России *Ps. cubensis* был зарегистрирован на 20 видах семейства *Cucurbitaceae*. Из 25 тестированных видов низким уровнем чувствительности отличался только *Sechium edule* [2, 4].

Возбудитель *Ps. cubensis* отличается избирательной способностью по отношению к культурам, а вариабельность внутрисортовых и внутривидовых типов совместимости с растениями-хозяевами способствует формированию стойких очагов инфекции и накоплению вирулентных морфотипов в популяциях гриба, вызывая эпифитотию болезни. При проблеме контроля внутрипопуляционной изменчивости патогена и появлением новых вирулентных рас в природной популяции возбудителя переноспороза возникает необходимость постоянного мониторинга вирулентности [4].

В последнее время вирулентность популяций *Ps. cubensis* возрастает. Новые расы патогена более вирулентны и способны преодолевать устойчивость районированных сортов и гибридов. Об этом свидетельствует 100 % поражение относительно устойчивых сортов огурца к переноспорозу [5]. Также вирулентность возбудителя в различных эколого-географических регионах сильно различается. Например, уровень вирулентности популяций *Ps. cubensis* на Дальнем Востоке и на Украине выше, чем в Болгарии и Белоруссии [6]. На Черноморском побережье Краснодарского края по признаку вирулентности зарегистрировано 15 физиологических рас, но по региональной структуре семейства ежегодно встречались только 5 рас [4].

В 1987 году в результате тестирования изолятов патогена, собранных в США, Израиле и Японии, выделили 5 рас. Позже, в 2003 году с использованием нового разработанного теста-набора выявили 13 рас из 22 изолятов патогена *Ps. cubensis*, поступивших из 4 европейских стран [1]. Также ученые установили, что североамериканские и европейские расы возбудителя являются близкородственными, но сильно отличаются от азиатских рас. Устойчивые сорта и гибриды, созданные в США и Польше, не всегда устойчивы к азиатским расам или наоборот [7].

В борьбе с переноспорозом огурца химические способы не всегда обеспечивают эффективную защиту и имеют ряд негативных последствий. Многократное применение фунгицидов способствует развитию резистентных популяций патогена и приводит к ускорению возникновения новых высоковирулентных рас патогена [3].

Несмотря на большое количество зарубежных работ по изучению специализации гриба, проблема контроля над накоплением и появлением новых вирулентных рас в природной популяции возбудителя переноспороза огурца в Казахстане до сих пор эта проблема не изучена. При обосновании стратегии использования исходного материала в селекционных программах на иммунитет к переноспорозу целесообразно учитывать особенности изолятов в популяциях *Ps. cubensis*. Также перед допуском новых устойчивых сортов и гибридов огурца к производству необходимо проводить испытание на устойчивость к расам возбудителя.

Цель работы – изучение вирулентности популяций *Ps. cubensis,* выделенного из разных образцов огурца, собранных на юго-востоке Казахстана.

Материалы и методы. Во время обследований посевов огурца в хозяйствах Алматинской и Жамбылской области были отобраны образцы, пораженные переноспорозом для определения вирулентности рас гриба. Использовали пораженные образцы из Алматинской области: сорта Гравина (к/х «Сингербаев»), Аякс (к/х «Бубихан Апа»), Аякс (к/х «Задиев 1»), Аякс (к/х «Задиев 2»), Маша (к/х «Асхат»), Криспина (к/х «Есхожа»), Апрельский F_1 и селекционные материалы 1-93, 1-56, 1-60, 1-95 (КазНИИКО), а также сорта и гибриды из Жамбылской области: Гураиль, С-02, Индийский местный, ЗБ-33 F_1, Nefes F_1 (НИИПББ), Артист (к/х «Бегалиев») и Кустовой (к/х «Кайнар»).

В исследованиях для градации физиологических рас возбудителя *Ps. cubensis* использовали набор тест-сортов [8]. Эмпирический набор тест-сортов состоит из универсально восприимчивого сорта Нежинский 12 (Россия), относительно устойчивого – Дальневосточный 27 (Россия), Конкурент (Россия), *Lagenaria siceraria* (Бутан), *Luffa aegyptica* (Индия), *Cucumis anguria* и генетически устойчивого образца *Sechium edule*.

Тест-сорта выращивали в теплице до фазы 3-4 настоящих листьев, затем срезали 3 и 4-й лист, из которого делали диски диаметром 14 мм. Каждый генотип по 5 дисков в трех повторностях помещали верхней стороной вниз в чашки Петри на влажную камеру с добавлением 0,4% бензимидазола. Микроманипулятором на листья наносили по 2 капли суспензии зооспорангиев плот-

ностью $5 \cdot 10^2$–$5 \cdot 10^5$ зооспорангиев/мл и равномерно распределяли по поверхности. После инокуляции листья инкубировали под светоустановкой при освещении 5 тыс.лк. В течение всего срока инкубации поддерживалась температура 23–25 °С и 100 % влажность воздуха.

Иммунологические реакции сортов-дифференциаторов на заражение клонами *Ps. cubensis* установливали на 7-е сутки по шкале оценки патогенности: R – устойчивый, пятна отсутствуют или при реакции сверхчувствительности они единичные, некротические, визуально спороношение не наблюдается; S – восприимчивый, пятна крупные, сливающиеся, со спороношением, ткань отмирает (таблица 1) [4].

Таблица 1 – Шкала оценки патогенности изолятов *Ps. Cubensis*

Симптомы поражения	Балл	Тип совместимости	Морфотип изолята
Единичные некротические пятна 5 мм, визуально спороношения отсутствует	0,1…1	Высокая устойчивость (R)	Авирулентный (простой)
Хлоротичные пятна до 20 мм, слабое спороношение	1,1…2	Средняя восприимчивость (S)	Средневирулентный (типичный)
Крупные сливающиеся хлоротичные пятна, мацерация ткани листа и обильное спороношение	2,1…3	Сильная восприимчивость (S)	Высоковирулентный (сложный)

Номера расам присваивали по системе Хабгуда [9]. Сорта-дифференциаторы располагали в строго определенном порядке, присваивая каждому бинарный номер от 2^0 до 2^6. Номер расы определяли суммированием числа бинарных номеров сортов, проявивших реакцию восприимчивости к расам.

Для анализа структуры популяций по вирулентности использовали показатель частоты встречаемости рас *Ps. cubensis* в выборках, а также расчетный индекс разнообразия Шеннона (H) [10]:

$$H = -\Sigma pi \ln pi, \quad (1)$$

где pi – частота морфотипа.

Результаты исследований и обсуждение

Вирулентность как степень патогенности является ключевым понятием для возбудителей инфекционных заболеваний. Вирулентность определяется как относительная способность патогена и от восприимчивости растений-хозяина [11].

Исследования по определению вирулентности отдельных рас гриба *Ps. cubensis* проводилась на тест-дифференциаторах, состоящих из разных генотипов с хорошей дифференцирующей способностью.

Результаты исследований показали, что вирулентность возбудителя *Ps. cubensis* варьирует в значительной степени в пределах одного и того же рода *Cucumis,* т.е. одна и та же раса на разных видах растений обладает различной вирулентностью. Варьирование по типу совместимости с патогеном тест-дифференциаторов обозначали как: авирулентные, средневирулентные и высоковирулентные.

По показателям разнокачественной реакции изолятов на тест-сортах нами идентифицировано 15 иммунологических комбинаций. Наибольшее заражение наблюдалось при температуре 23 °С, которое совпадает с оптимальной температурой роста этого гриба; при этом продолжительность инкубационного периода также зависела от температуры и влажности среды являющейся оптимальной для гриба. Состояние самого растения также имело значение при заражении его грибами.

Изменение вирулентности гриба как в сторону усиления, так и ослабления является его способностью адаптироваться к организму растения-хозяина. Чем сильнее выражена эта способность, тем больше вероятность развития инфекции. Эта особенность способствует формированию очагов инфекции и накоплению вирулентных морфотипов в популяциях гриба *Ps. cubensis*.

Изучение структуры казахстанской популяции переноспороза огурца показало, что физиологические расы отличаются значительным генетическим разнообразием и вирулентностью. Наибольшей вирулентностью обладали расы 39, 53 и 54 при оптимальных условиях своего развития.