

ВЛИЯНИЕ МЕТОДА ИНОКУЛЯЦИИ НА ПРОЯВЛЕНИЕ ВИРУЛЕНТНОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ СУХОЙ ГНИЛИ КАРТОФЕЛЯ

А.А. Николаева¹, С.А. Хворова¹, М.Т. Лутфуллин¹, С.Г. Вологин², А.М. Марданова¹

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

²ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия

azazel1212@rambler.ru

Аннотация: Из сухой гнили картофеля были выделены изоляты микромицетов рода *Fusarium*, идентифицированные как штаммы *F. oxysporum*, *F. solani* и *F. redolens*. Было исследовано влияние метода инокуляции (споры или мицелий) на вирулентность микромицетов на клубнях картофеля сортов Зумба и Догода. Установлено, что только один изолят из шести проявлял различную степень вирулентности в зависимости от метода заражения.

Ключевые слова: *Fusarium*, картофель, сухая гниль, вирулентность.

THE EFFECT OF THE INOCULATION METHOD ON THE VIRULENCE OF PATHOGENS CAUSING DRY ROT OF POTATO

A.A. Nikolaeva¹, S.A. Khvorova¹, M.T. Lutfullin¹, S.G. Vologin², A.M. Mardanova¹

¹Kazan Federal University, Kazan

Tatar Research Institute of Agriculture FRC KazSC of RAS, Kazan, Russian Federation,

e-mail: azazel1212@rambler.ru

Abstract: Isolates of micromycetes from the genus *Fusarium* identified as strains *F. oxysporum*, *F. solani* and *F. redolens* were isolated from potatoes with dry rot. The effect of the inoculation method (spores or mycelium) on the virulence was investigated with potato tubers of Zumba and Dogoda varieties. It was found that only one isolate out of six showed varying degrees of virulence depending on the method of infection.

Keywords: *Fusarium*, potato, dry rot, virulence.

Введение. Обострение заболеваний картофеля, передающихся через почву, и деградация почвы связаны с активным использованием системы непрерывного выращивания, что приводит к снижению урожайности культуры [1]. Одной из серьезнейших причин потери урожая картофеля является сухая гниль – распространенное послеуборочное заболевание клубней, вызываемое *Fusarium spp.* и приводящее к большому экономическому ущербу, а также ухудшению параметров качества урожая и накоплению микотоксинов [2], что также представляет угрозу здоровью потребителей. При этом споры грибов (микроконидии, макроконидии и хламидоспоры), образующиеся на отмерших тканях растений, рассеиваются в почве, представляя опасность для урожая последующих лет [1].

Селекция сортов картофеля по генетически опосредованной устойчивости к *Fusarium sp.* является одним из экологических способов повышения урожайности. При этом сорта могут быть устойчивы к одному виду *Fusarium*, но восприимчивы к другому, поскольку результат восприимчивости-устойчивости варьируется в зависимости от вида и штаммов *Fusarium*, сортов картофеля, а также преобладающих культурных и экологических условий в разных регионах мира [3]. Для изучения патогенности и скрининга устойчивости клубней к фузариозной сухой гнили картофеля были разработаны различные методы инокуляции, которые включают внесение инокулята либо в виде мицелия, либо в виде суспензии спор. Целью исследования было сравнение двух методов инокуляции для определения вирулентности штаммов микромицетов рода *Fusarium*, выделенных из сухой гнили клубней картофеля разных сортов.

Материалы и методы. Исследуемые штаммы микромицетов были выделены из клубней картофеля сортов Ароза и Ягодный 19 с внешними признаками сухой гнили (Таблица 1). Скрининг микромицетов *Fusarium* по вирулентным свойствам проводили на клубнях картофеля сортов Зумба и Догода, полученных из коллекции ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН.

Таблица 1. Список изолятов, выделенных из клубней разных сортов картофеля

Сорт картофеля	Изоляты микромицетов
Ароза	N1, N3, N8
Ягодный 19	NS1, NS2, NS4

Для получения изолятов образец пораженной ткани клубня подвергали поверхностной стерилизации в 70% этаноле, а затем переносили на агар Чапека с добавлением молочной кислоты для подавления роста бактерий. Микромицеты культивировали при 30 °С в течение 7 дней [4].

Скрининг микромицетов *Fusarium* по вирулентным свойствам проводили с помощью искусственного заражения мицелием или споровой суспензией на клубнях картофеля сортов Зумба и Догода. Внешне здоровые клубни картофеля искусственно инфицировали уколом мицелия 10-дневной культуры или внесением 20 мкл споровой суспензией микромицетов (10^6 /мл). В качестве отрицательного контроля использовали клубни, инокулированные обычным стерильным физиологическим раствором. После инкубации в течение 7 дней клубни ежедневно в течение 14 суток проверяли на наличие внешних признаков сухой гнили. Степень поражения клубней на 21 сутки инкубации оценивали по отношению диаметра гнили к диаметру здоровой зоны клубня по методу, описанному в работе [Akosah *et al.*, 2018] с некоторыми модификациями. Степень поражения клубней выражали в баллах по шкале: 1 балл - отсутствие поражения, 2 – диаметр пораженного участка 1-25%, 3 - 25-50%, 4 - 50-75%, 5 - 75-100% от ткани клубня.

Выделение ДНК проводили с помощью СТАВ-буфера с использованием метода СТАВ (гексадецилтриметиламмония бромид) [5]. Качество и полученную концентрацию ДНК проверяли на NanoDrop 2000 (Thermo, США). Внутреннюю транскрибируемую спейсерную область (ITS) гена 5.8S рРНК и маркерный локус региона фактора элонгации трансляции 1- α (TEF1) амплифицировали с помощью ПЦР из геномной ДНК с использованием праймеров ITS1 и ITS4, EF1 и EF2 соответственно (Таблица 2). ПЦР-продукты очищали с помощью коммерческого набора GeneJet PCR Purification Kit (Thermo Scientific) согласно протоколу производителя и секвенировали по методу Сэнгера.

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Ген	Название	Последовательность
ITS гена 5S рРНК	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
TEF1	EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC
	EF2	GGARGTACCAGTSATCATG

После получения данных о последовательностях ДНК обрезку последовательностей низкого качества проводили с помощью Galaxy (<https://usegalaxy.org/>), для проведения запросов BLASTn для идентификации *Fusarium* использовали доступные через Интернет базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism.

Результаты. В общей сложности из клубней картофеля с признаками сухой гнили были выделены 6 изолятов микромицетов, идентифицированных на основании макро- и микроскопической морфологии как представителей рода *Fusarium*. С помощью молекулярно-генетической идентификации изоляты были определены как *Fusarium oxysporum* (N1, N3, N8), *Fusarium redolens* (NS1, NS4) и *Fusarium solani* (NS2) со степенью гомологии от 95% до 100% (Таблица 3).

Таблица 3. Идентификация изолятов по гомологии генов 5.8S рРНК и TEF1

Изолят	Локус	Вид	Процент гомологии
N1	EF	<i>F. oxysporum</i>	100%
	ITS		100%
N3	EF	<i>F. oxysporum</i>	100%
	ITS		100%
N8	EF	<i>F. oxysporum</i>	95.25%
	ITS		100%
NS1	EF	<i>F. redolens</i>	100%
	ITS		100%
NS2	EF	<i>F. solani</i>	100%
	ITS		99.61%
NS4	EF	<i>F. redolens</i>	100%
	ITS		100%

Вирулентность изолятов оценивали по способности вызывать фузариоз клубней картофеля сортов Зумба и Догода при их искусственном инфицировании мицелием или спорами (Рисунок 1). Установлено, что степень заражения и повреждения клубней зависит как от устойчивости данного сорта картофеля, так и вирулентности фитопатогенного штамма *Fusarium*. Все шесть штаммов *Fusarium* проявили вирулентные свойства, вызывая сухую гниль в разной степени в клубнях исследуемых сортов (Таблица 4). Сравнительный анализ результатов заражения показал, что наиболее вирулентными в отношении использованных сортов картофеля оказались штаммы N1 и NS2.

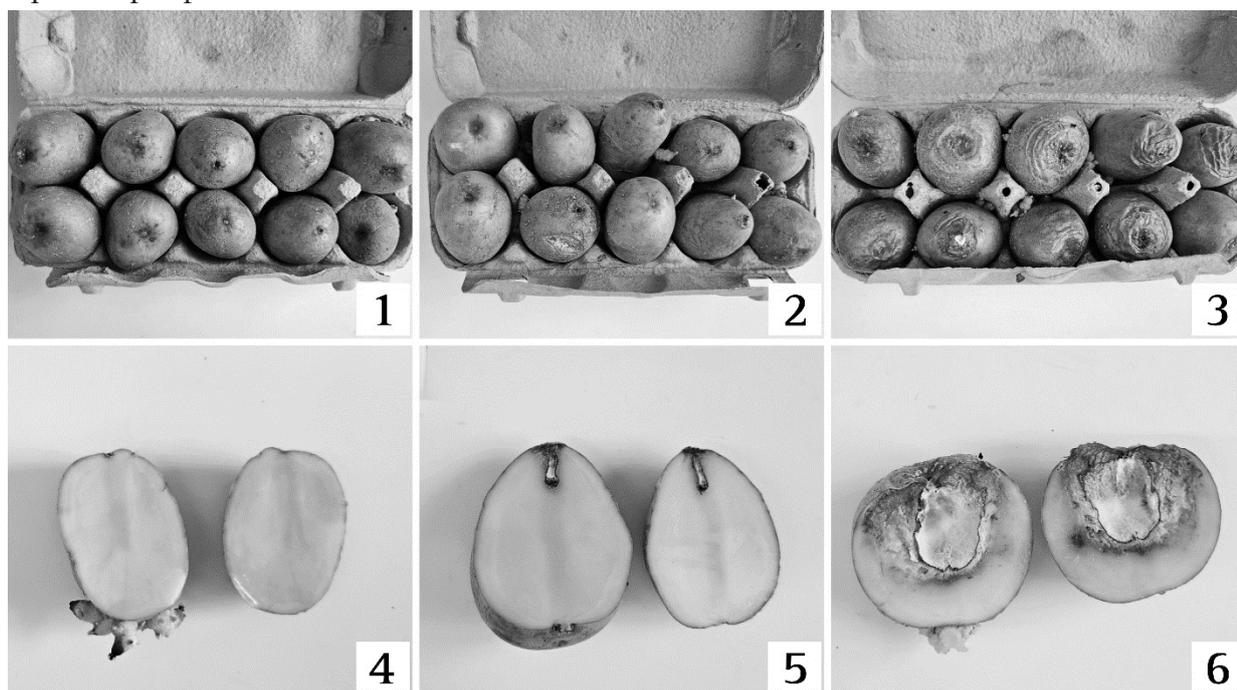


Рисунок 1. Симптомы фузариоза картофеля: 1-3 – внешние признаки, проявляющиеся в виде сморщивания на поверхности, 4-6 – появление сухой гнили внутри клубня. Искусственное заражение клубней картофеля сорта Догода: 1, 4 – контроль; 2, 5 – *F. redolens* NS1; 3, 6 – *F. solani* NS2.

Было установлено, что достоверные различия в степени вирулентности штаммов в зависимости от метода инокуляции отсутствовали, за исключением штамма NS1, вирулентность которого была выше при заражении клубней мицелием.

Таблица 4. Сравнение степени поражения клубней картофеля в зависимости от способа искусственного заражения

Изолят		Степень поражения клубней, баллы			
		Зумба		Догода	
		мицелий	споры	мицелий	споры
1	N1	2.33±0.58 ^a	2.3±0.48 ^a	3.0±1.73 ^a	3.0±0.67 ^a
2	N3	2.0 ^a	2.2±0.42 ^a	2.0 ^a	2.4±0.97 ^a
3	N8	2.33±0.58 ^a	1.6±0.52 ^a	2.0 ^a	1.7±0.95 ^a
4	NS1	3.0 ^a	1.0 ^b	2.0 ^a	1.3±0.48 ^b
5	NS2	3.66±0.58 ^a	4.1±0.32 ^a	3.33±1.53 ^a	4.2±0.42 ^a
6	NS4	2.33±0.58 ^a	1.6±0.52 ^a	2.33±0.58 ^a	1.6±1.07 ^a

a, b – Средние значения в строке, отмеченные разными верхними индексами, достоверно различались между собой ($P < 0.05$).

Таким образом, из сухой гнили картофеля разных сортов выделены изоляты микромицетов рода *Fusarium*, идентифицированные как штаммы *F. oxysporum*, *F. solani* и *F. redolens*. Изоляты различались по способности к заражению клубней при их искусственном инфицировании. При этом только один штамм из шести статистически достоверно проявлял различную степень вирулентности на разных сортах картофеля в зависимости от метода заражения (спорами или мицелием).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 22-16-00138 на технической базе Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (Приоритет-2030).

Библиографический список:

1. Qin J., Bian C., Duan S., Wang W., Li G., Jin L. Effects of different rotation cropping systems on potato yield, rhizosphere microbial community and soil biochemical properties // *Front Plant Sci.* 2022. V.13:999730. doi: 10.3389/fpls.2022.999730.
2. Xue H., Liu Q., Yang Z. Pathogenicity, Mycotoxin Production, and Control of Potato Dry Rot Caused by *Fusarium* spp.: A Review // *J Fungi (Basel)*. 2023. V.9(8). N.843. doi: 10.3390/jof9080843
3. Likhnenko S.V., Zangieva F.T., Morgoev T.A., Bekmurzov B.V. Ways to increase the adaptability of potato varieties in the North Caucasus // *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020. N.548 022038.
4. Akosah Y., Vologin S. G., Lutfullin M. T., Hadieva G. *Fusarium oxysporum* strains from wilting potato plants: Potential causal agents of dry rot disease in potato tubers // *Crops* 22. 2021. N.49–53. doi: 10.31830/2348-7542.2021.012
5. Campos M., Patanita C., Campos C. et al. Detection and Quantification of *Fusarium* spp. (*F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. graminearum*) and *Magnaportheopsis maydis* in Maize Using Real-Time PCR Targeting the ITS Region // *Agronomy*. 2019. V. 9. P. 45.