

ИТОГИ МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ГНИЛЕЙ КОРНЕПЛОДОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ В ОСНОВНЫХ РЕГИОНАХ СВЕКЛОСЕЯНИЯ РОССИИ

В.В. Шеремет, магистр биологии, специалист лаборатории
Е.С. Мазурин, кандидат биологических наук, руководитель лаборатории
О.А. Воблова, кандидат сельскохозяйственных наук, технический специалист
по сахарной свекле
ООО «Сингента»
e-mail: vlad.sheremet@syngenta.com

Аннотация. На базе фитопатологической лаборатории станции исследований и развития ООО «Сингента» проведен мониторинг гнилей корнеплодов сахарной свеклы. Целью мониторинга было определение перечня грибных фитопатогенов, вызывающих повреждение корнеплодов на всех этапах вегетации, и закономерностей их распространения. Всего проанализировано 36 образцов из 7 регионов. При проведении работы использовали микробиологические и молекулярно-генетические методы.

Ключевые слова: возбудители корневых гнилей, сахарная свекла, *Macrophomina phaseolina*, *Aphanomyces* spp., *Rhizoctonia* spp, *Fusarium* spp, *Pythium* spp.

Посевные площади под сахарной свеклой устойчиво растут [1]. Этому способствует развитие технологий возделывания [2], наличие государственных программ поддержки отрасли [3], регистрация новых средств защиты растений при посеве и по вегетации [4].

Важнейшим лимитирующим фактором в реализации потенциала урожайности являются возбудители гнилей корнеплодов [5]. Состав возбудителей гнилей и повреждений корнеплодов сахарной свеклы в значительной степени зависит от почвенно-климатических условий [6] и применяемых агротехнологий [7]. Большое значение играет соблюдение правил севооборота, которые позволяют избежать накопления вредных объектов [8].

Причиной возникновения гнилей корнеплодов могут быть различные грибы и бактерии, обитающие в почве [9]. Зачастую ни один из них не является облигатным патогеном и способен нанести существенный ущерб лишь в комплексе с другими грибами и при возникновении благоприятных условий [10]. Несмотря на широкий перечень участников комплекса патогенов, чаще других исследователи упоминают: *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Rhizopus* spp., *Phoma* spp., *Pythium* spp., *Aphanomyces* spp [11].

Работа выполнена в лаборатории станции исследования и развития продуктов компании ООО «Сингента» в городе Краснодар в период с июня по ноябрь 2021 г.

Для максимального выявления спектра участников сообщества микромицетов на поверхности и в тканях корнеплода использовали метод закладки растительного материала на поверхность агаризованных сред различного состава – голодный агар, картофельно-глюкозный агар, среда с дихлораном и бенгальским розовым [12]. Перед закладкой на агаризованные среды корнеплоды тщательно отмывали в проточной воде. В качестве приоритетных фрагментов корнеплода выбирали области на границе здоровых и поврежденных тканей. Фрагменты размером 5–10 мм вырезали скальпелем и промывали в проточной воде в течение 30 минут. Отмытые фрагменты стерилизовали в 90 % спирте 2 минуты. После стерилизации их дважды отмывали в стерильной воде. Отмытые от спирта стерильные кусочки тканей просушивали на поверхности стерильной фильтровальной бумаги, после чего переносили на поверхность голодного агара и картофельно-глюкозного агара. Для подавления роста бактерий в агаризованную среду перед розливом вносили антибиотические вещества [13]. Голодный агар (агар 18 г/л, стрептомицин 100 мг/л, хлорамфеникол 100 мг/л) за счет отсутствия источников углерода значительно уменьшает скорость линейного роста микромицетов, а также существенно сокращает плотность мицелия, в то же время габитусы конидиеносцев сохраняют свою структуру без изменений. Такой характер роста существенно облегчает получение чистых культур факультативных патогенов, упрощает их первичную идентификацию (до рода), а также позволяет выявлять большее количество микроскопических грибов (в сравнении с богатыми питательными средами). Поддержание чистых культур изолятов осуществляли на картофельно-глюкозном агаре, который является

стандартной питательной средой для культивирования самого широкого перечня грибов и грибоподобных организмов.

С целью увеличения вероятности обнаружения грибоподобных организмов (оомицетов) применяли метод биоприманки. В качестве биоприманки использовали ткани плода огурца. Фрагмент тканей корнеплода размещали на поверхности агара на расстоянии около 20 мм от биоприманки. Наличие оомицетов оценивали на третьи сутки.

Для точной идентификации изолятов проводили секвенирование ДНК внутреннего транскрибируемого спейсера ITS [14], участок гена фактора элонгации EF-1 α [15], участок гена β -tubulin TUB [16].

Из отдельных колоний грибов, полученных с КГА, была выделена ДНК сорбентным методом на магнитных частицах (ЗАО «Синтол», Москва).

Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 5 мкл 5X ПЦР MasterMix MagMix (ООО «Диалат Лтд», Москва), 10 пМ каждого праймера, и 20 нг целевой ДНК. Температурно-временные параметры включали пре-денатурацию 96 °С – 15 мин, далее – 35 циклов, состоящих из денатурации 95 °С – 15 сек, отжига праймеров 55 °С – 30 сек (ITS и Tub) или 58 °С (EF-1), элонгации 72 °С – 30 сек; финальный до-синтез 72 °С – 10 мин; хранение – при +4 °С.

На всех этапах работы результаты регистрировали методом горизонтального электрофореза в 1,5 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Размер продуктов ПЦР измеряли, используя маркеры молекулярного веса GeneRuler™ 100+ п.н. (Fermentas, Латвия).

Секвенирование продуктов ПЦР проводили по методу Сэнгера. ПЦР-продукты, предназначенные для секвенирования, очищали с помощью набора PCR GeneJET (Fermentas) арт. K0701. Реакцию секвенирования проводили с применением BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific), согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Нуклеотидные последовательности участков генов изучаемых

Таблица 1. Регионы и количество образцов, полученных для проведения фитоэкспертизы

Регион	Количество Образцов
Краснодарский край	12
Тамбовская область	7
Липецкая область	6
Алтайский край	6
Ставропольский край	4
Нижегородская область	1
Итого	36 образцов

видов были проанализированы с помощью программного обеспечения «BioEdit» и базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Идентификацию возбудителя ризоктониоза проводили путем постановки ПЦР со специфическими праймерами [17] в присутствии красителя SybrGreen с последующим построением кривых плавления на амплификаторе CFX-96 (BioRad, США). Специфическую температуру плавления продукта амплификации регистрировали на уровне 83 °С.

Смесь реактивов для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 10 мкл 2,5X Мастер микс с красителем SybrGreen (ЗАО «Синтол», Москва) 10 пМ каждого из праймеров и 5 мкл выделенной ДНК. Температурно-временные параметры включали пре-денатурацию 95 °С – 10 мин, далее – 35 циклов, состоящих из денатурации 95 °С – 15 сек, отжига праймеров 64 °С – 30 сек, элонгации 72 °С – 8 сек; финальный до-синтез 72 °С – 10 мин; Melt Curve от 65 до 95 °С с шагом 0,3 °С.

В ходе мониторинга в лабораторию были доставлены образцы корнеплодов из шести регионов России – всего 36 образцов (табл. 1).

Такой широкий перечень локаций позволил сделать некоторые выводы о местных особенностях микобиоты корнеплодов. Значительное количество образцов из Краснодарского края связано с расположением лаборатории (Краснодарская станция исследования) и возрастом там проблем корневых гнилей сахарной свеклы. Удаленность лаборатории от места отбора образцов может иметь решающее значение для получения объективных данных, поскольку при длительной

транспортировке и несоблюдении условий доставки существует значительный риск сукцессии микробиологических сообществ.

Данные таблицы 2 могут служить косвенным подтверждением того, что фактор удаленности некоторых локаций не повлиял на конечные данные – частота выявления типичных плесеней хранения *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* составила 8 и 11 % соответственно.

Общий вид комплекса грибов и грибоподобных организмов выявил лишь одну строгую закономерность – наличие *Fusarium spp* во всех образцах, в том числе на здоровых тканях, что соответствует публикуемым данным.

Таблица 2. Частота обнаружения объектов в исследованных образцах

Объект	Доля образцов, в которых обнаружен объект, %
<i>Fusarium spp.</i>	100
<i>Pythium spp.</i>	40
<i>Rhizoctonia spp.</i>	36 (ПЦР)
<i>Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich.</i>	28
<i>Alternaria spp.</i>	21
<i>Mucor spp.</i>	12
<i>Penicillium spp.</i>	11
<i>Aphanomyces spp.</i>	8
<i>Aspergillus spp.</i>	8
<i>Sordaria sp.</i>	7
<i>Calonectria spp.</i>	7
<i>Nigrospora sphaerica</i>	4

Еще несколько закономерностей можно установить при сравнении видовой состава микромицетов по регионам. Например, вероятность встретить возбудителя пепельной гнили *Macrophomina phaseolina* значительно выше в Краснодарском крае и намного реже – в остальных регионах. Такие данные полностью согласуются с биологическими особенностями этого патогена, поскольку наибольшего развития микромицет достигает при наличии высоких температур – около 30 °С. Еще одна корреляция в видовом составе микобиоты и локализации образцов отмечена для оомицета *Aphanomyces spp.* который был обнаружен лишь в образцах из Тамбовской и Липецкой областей.

В таблице 3 продемонстрировано, что видовой состав фузариевых грибов несколько отличается по регионам. Отметим, что *Fusarium tricinctum* был обнаружен только в образцах из Тамбовской области, а *Fusarium sporotrichioides* – только в образцах из Ставропольского края.

В таблице 4 отражена локальность распространения *Macrophomina phaseolina* в Краснодарском крае и ее полное отсутствие в других регионах. Вместе с тем, доля образцов корнеплодов с возбудителем пепельной гнили там составляет 58 %.

На рисунке показано, что проявление *Rhizoctonia spp* на корнеплодах в Краснодарском крае каким-то образом может быть связано с появлением *Macrophomina phaseolina*, поскольку ризоктония была обнаружена лишь в тех образцах, которые были поражены пепельной гнилью.

Корнеплоды (фото 1) имеют внешнее сходство, при этом, не коррелирующее с наличием или отсутствием возбудителей ризоктониоза и пепельной гнили.

Представленные фото 1–3 показывают, что визуальная оценка может допускать существенную погрешность при попытке определить причину повреждений. Особенно сложно сделать верное предположение при сильном распространении агентов (фото 1).

Таким образом, полученные данные в ходе первого года мониторинга позволяют сделать некоторые выводы о локализации и взаимодействии патогенных грибов. Например, *Macrophomina phaseolina* может представлять реаль-

Таблица 3. Видовой состав микромицетов и оомицетов по регионам

Регион	Виды микромицетов				
	<i>Fusarium spp</i>	<i>Rhizoctonia spp</i>	<i>Oomycota</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	Сапротрофные микромицеты
Краснодарский край	<i>Fusarium spp.</i> <i>F. oxysporum*</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. proliferatum.</i>	<i>Rhizoctonia spp</i>	<i>Pythium spp</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Mucor spp.</i>
Тамбовская и Липецкая области	<i>Fusarium spp.</i> <i>F. oxysporum</i> , <i>F. tricinctum</i> ,	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Pythium spp.</i> , <i>Aphanomyces spp.</i>	-	<i>Nigrospora sphaerica</i> , <i>Alternaria spp.</i> , <i>Sordaria spp.</i> , <i>Mucor spp.</i>
Ставропольский край	<i>Fusarium spp.</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. solani.</i>	<i>Rhizoctonia spp.</i> ,	<i>Pythium spp</i>	-	<i>Alternaria spp.</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Penicillium spp.</i> , <i>Calonectria morganii</i>

Таблица 4. Частота встречаемости *Rhizoctonia spp.*, *Macrophomina phaseolina*, *Pythium spp.* в образцах по регионам

	<i>Rhizoctonia spp.</i> , %	<i>Macrophomina phaseolina</i> , %	<i>Pythium spp.</i> , %
Краснодарский край	25	58	42
Липецкая и Тамбовская области	38	0	31
Ставропольский край	25	0	25

ную угрозу для корнеплодов на юге и практически не встречается в образцах из Центрально-Черноземной зоны. *Rhizoctonia spp* распространена повсеместно, при этом на юге встречается исключительно в комплексе с *Macrophomina phaseolina*. *Aphanomyces spp* выявлен только в ЦЧР, а *Fusarium spp.* есть во всех регионах и на всех корнеплодах (даже на здоровых тканях), однако, видовой состав фузариумов несколько отличается по регионам.

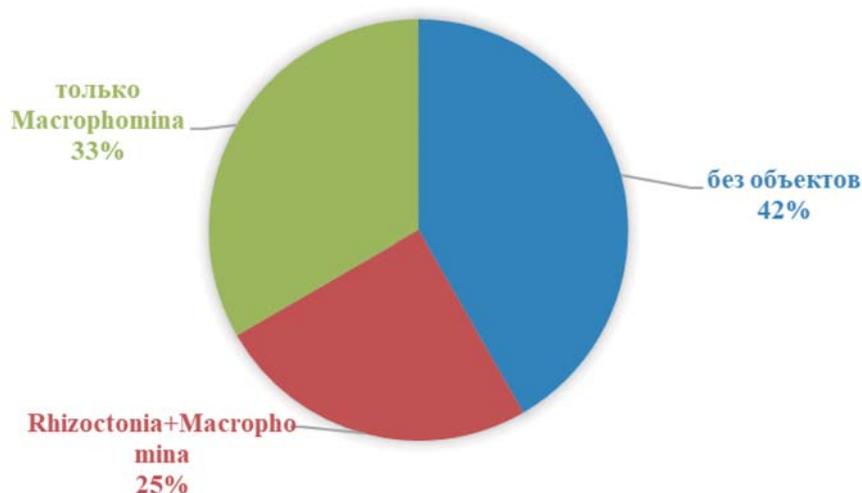


Рисунок. Распространение *Rhizoctonia spp* и *Macrophomina phaseolina* в Краснодарском крае



Фото 1. Корнеплоды из Краснодарского края (слева - выявлены *Rhizoctonia spp* и *Macrophomina phaseolina*, по центру — только *Macrophomina phaseolina*, справа — оба отсутствуют).



Фото 2. Корнеплоды из Липецкой и Тамбовской областей (слева - обнаружена *Rhizoctonia spp*, справа — не обнаружена *Rhizoctonia spp*.)



Фото 3. Корнеплоды из Липецкой и Тамбовской областей (слева - обнаружен *Aphanomyces spp*, справа — не обнаружен *Aphanomyces spp*., в обоих случаях *Rhizoctonia spp* не обнаружена)

Визуальные признаки не могут достоверно говорить о наличии или отсутствии вредного объекта.

Список литературы

1. Бодин, А.Б. Производство сахарной свеклы и сахара в 2018 году. Особенности нового производственного сезона / А.Б. Бодин // [Электронный ресурс] Режим доступа: URL: <https://www.nsss-russia.ru/wp-content/uploads/2018/02/>.

2. Горшенин, В.И. Новая технология возделывания и уборки сахарной свеклы в условиях северо-востока Центрального Черноземья / В.И. Горшенин,

А.Г. Абросимов, С.В. Соловьев, О.А. Ашуркова // Вестник Мичуринского ГАУ. - 2016. - № 3. - С. 165-171.

3. Ларцева, С.А. Оценка эффективности государственной поддержки агропромышленного комплекса / С.А. Ларцева // В сб. статей междунаучно-практ. конф. «Новые модели социально-экономического развития экономических систем». - Уфа: ООО «Аэтерна», 2019. - С. 43-47.

4. Цыба, Я.И. Агробиологическое обоснование защиты сахарной свеклы от церкоспороза в условиях опытного поля центра научных исследований и инноваций ООО «Сингента» / Я.И. Цыба // В Сб. статей 71 научно-практ. конф. студентов по итогам НИР 2015 года «Научное обеспечение АПК». - Краснодар, Кубанский ГАУ, 2016. - С. 62-64.

5. Стогниенко, О.И. Биотические и абиотические факторы в развитии гнилей корнеплодов / О.И. Стогниенко, А.А. Шамин // Сахарная свекла. - 2012. - №. 5. - С. 29-32.

6. Hoffmann, C.M. Yield potential of sugar beet – have we hit the ceiling? / C.M. Hoffmann, C. Kenter // Frontiers in plant science. - 2018. - Т. 9. - С. 289.

7. Лупашку, Г.А. Влияние севооборота и удобрений на видовой состав возбудителей и поражаемость сахарной свеклы корневыми гнилями / Г.А. Лупашку, Г.В. Меренюк // Микология и фитопатология. - 2010. - Т. 44. - №. 3. - С. 255-261.

8. Buhre, C. Integrated control of root and crown rot in sugar beet: combined effects of cultivar, crop rotation, and soil tillage / C. Buhre et al. // Plant Disease. - 2009. - Т. 93. - №. 2. - С. 155-161.

9. Bidwai, A.P. Mechanism of action of *Pseudomonas syringae* phytotoxin, syringomycin: stimulation of red beet plasma membrane ATPase activity / A.P. Bidwai et al. // Plant Physiology. - 1987. - Т. 83. - №. 1. - С. 39-43.

10. Костенко, Е.И. Причина развития гнилей корнеплодов сахарной свеклы неизвестной этиологии в Центрально-Черноземном регионе РФ / Е.И. Костенко // Сахар. - 2016. - №. 2. - С. 32-34.

11. Jacobsen, B.J. Root rot diseases of sugar beet / B.J. Jacobsen // Zbornik Matice srpske za prirodne nauke. - 2006. - №. 110. - С. 9-19.

12. Кремлева, А.А. Питательные среды для микологических исследований по выделению из силоса и сенажа микроскопических грибов, дрожжей и плесеней, имеющих значение в санитарно-микологической оценке их качества / А.А. Кремлева, Ю.А. Скоморина, М.В. Кожевникова,

А.А. Варенцова, В.И. Белоусов

// Труды ВНИИ экспериментальной ветеринарии им. ЯР Коваленко. - 2018. - Т. 80. - №. 2. - С. 210-214.

13. Билай, В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай, И.А. Дудка, С.П. Вассер. - Справочник. - Киев, 1982. - 552 с.

14. White, T.J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics / T.J. White, T. Bruns, S. Lee, J. Taylor. - In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR Protocols: a guide to methods and amplifications. San Diego: Academic Press, 1990. - P. 315-322.

15. Carbone, I. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes / I. Carbone, L.M. Kohn // Mycologia. - 1999. - V. 91. - P. 553-556.

16. Glass, N.L. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes / N. L. Glass, G.C. Donaldson // Applied and environmental microbiology. - 1995. - V. 61(4). - P. 1323-1330.

17. Lievens, B. Real-time PCR for detection and

quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples / B. Lievens, M. Brouwer, A. C. Vanachter, B. P. Cammue, B.P. Thomma // Plant science. - 2006. - V. 171(1). - P. 155-165.

Results of monitoring of pathogens of rot of sugar beet root crops in the main beet growing regions of Russia

V.V. Sheremet, E.S. Mazurin, O.A. Voblova

Summary. Based on the phytopathological laboratory of the research and development station of "Syngenta" LLC, monitoring of the sugar beet root roots was carried out. The aim of the monitoring was to determine the list of fungal phytopathogens causing damage of root crops at all stages of the growing and to determine the patterns of their spread. In total, 36 samples from 7 regions were analyzed. During the work, microbiological and molecular genetic methods were used.

Key words: root rot pathogens, sugar beet, *Macrophomina phaseolina*, *Aphanomyces spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Fusarium spp.*, *Pythium spp.*



СОЮЗ "БЕЛГОРОДСКАЯ
ТОРГОВО-ПРОМЫШЛЕННАЯ ПАЛАТА"



БЕЛЭКСПОЦЕНТР

28-30 сентября 2022

12+

**XXVII межрегиональная
специализированная выставка**

под Патронажем ТПП РФ

**Белгород
АГРО**