

ОЦЕНКА ОБРАЗЦОВ САХАРНОЙ СВЕКЛЫ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КОРНЕВЫМ ГНИЛЯМ НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ФИТОПАТОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

С.В. Майсеня, заведующая селекционно-семеноводческим комплексом
РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле»
e-mail: majsenya@bk.ru

Л. В. Можаровская

С. В. Пантелеев, кандидат биологических наук

О.Ю. Баранов, доктор биологических наук

ГНУ «Институт леса НАН Беларуси»

e-mail: betula-belarus@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты молекулярно-фитопатологического анализа селекционных образцов сахарной свеклы на устойчивость к ризоктониозной и фузариозной гнилям. Установлены селекционные образцы с повышенной устойчивостью к корневым гнилям.

Ключевые слова: полимеразно-цепная реакция (ПЦР), праймеры, сахарная свекла, ризоктониоз, фузариоз.

Одной из стратегических сельскохозяйственных культур в мире является сахарная свекла, размеры посевов которой определяются в современных условиях показателями рентабельности ее возделывания. На показатели производства сахарной свеклы влияет множество факторов, включая эффективность противодействия неблагоприятным абиотическим факторам, среди которых доминирующее положение занимают вредители и инфекционные болезни.

Корневые гнили принадлежат к группе широко распространенных и экономически значимых заболеваний культуры, поражающих растения на различных стадиях онтогенеза. Инфекционными агентами обычно выступают почвообитающие микромицеты, принадлежащие к родам *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phoma*, *Crinipellis*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus*. В агроклиматических условиях Беларуси наибольшее распространение среди возбудителей корневых гнилей сахарной свеклы получили фитопатогенные грибы *Rhizoctonia spp.* и *Fusarium spp.*

Rhizoctonia solani Kuhn. является видовым комплексом близкородственных почвообитающих микромицетов, способных вызывать ризоктониальную и корончатую гнили (ризоктониоз) сахарной свеклы. Этот патоген встречается повсеместно и может стать определяющим фактором потери урожая культуры. Среднестатистическая гибель растений от ризоктониоза составляет около 2 %. При неблагоприятном

инфекционном фоне ущерб растениям может колебаться от 30 до 60 %, а в отдельных случаях принимать характер эпифитотий. Заболевание развивается наиболее интенсивно при температуре от 22 до 35 °С и повышенной влажности почвы. Кроме взрослых растений *Rh. solani* может активно поражать молодые, что выражается преимущественно в их послевсходовом полегании, но также способна вызывать гибель прорастающих семян сахарной свеклы на довсходовой стадии [1].

Fusarium oxysporum Schlecht. emend. Snyd. & Hans. представляет собой большой и разнообразный комплекс морфологически сходных анаморфных грибов с множественным филогенетическим происхождением, поражающий широкий спектр сельскохозяйственных растений и приводящий к значительным количественным и качественным потерям мирового урожая [2]. Грибы видового комплекса *F. oxysporum* у сахарной свеклы вызывают не только корневую гниль, но и пожелтение и увядание листьев, что значительно повышает вредоносность данного возбудителя. Кроме того, микромицеты рода *Fusarium* являются продуцентами огромного диапазона вторичных метаболитов, которые характеризуются токсическими свойствами как по отношению к растениям, так и к животным организмам, включая человека. Таким образом, вредоносность фузариоза связана не только с потерей урожая, но и с загрязнением токсинами сельхозпродукции, употребление которой может явиться причиной ослабления иммунной системы или фактором, определяющим возникновение онкопатологий [3, 4].

Важное значение в борьбе с корневыми гнилями сахарной свеклы, кроме совершенствования химических и биологических средств защиты растений, представляет собой селекционная работа, направленная на создание сортов, гибридов и линий с повышенной ре-

зистентностью к фитопатогенам. Исходя из того, что признак резистентности зачастую имеет полигенную детерминацию, проведение селекционного отбора, как правило, должно осуществляться с использованием комплексных критериев. Одним из способов молекулярно-генетического скрининга селективируемых форм и образцов является сравнительный анализ морфофизиологического состояния растений и структуры их эндофитного микробиома в условиях явно выраженного инфекционного фона. Инфицированные растения без признаков болезни относят к толерантной группе, а в случае отсутствия и биологического материала патогенов данные образцы определяются как резистентные.

Цель данной работы — проведение молекулярно-фитопатологического анализа растений в условиях искусственного инфекционного фона *Rhizoctonia spp.* и *Fusarium spp.* для последующего отбора форм по признаку резистентности к корневым гнилям.

Объекты исследования — мужскокостерильные формы, закрепители стерильности, многосемянные опылители, межвидовые гибриды, гибриды сахарной свеклы.

На первом этапе исследований был проведен отбор вирулентных изолятов, вызывающих гибель растений сахарной свеклы в полевых условиях. Для этого в выявляемых очагах корневой гнили культуры оценивали вредоносность инфекции и отбирали биологический материал (инфицированные ткани корнеплодов) для последующей верификации возбудителей болезни и получения чистых культур фитопатогенных микромицетов *F. oxysporum* и *Rh. solani*.

Для создания культур *in vitro* использовали картофельно-глюкозную агаровую питательную среду. Верификацию видовой принадлежности изолятов к *F. oxysporum* (рис. 1) и *Rh. solani* (рис. 2) подтверждали, как микробиологическими, так и молекулярно-генетическими методами. Инокулом фитопатогенных грибов приготавливали в стерильных условиях на основе автоклавированных зерен ячменя, на которую высевали суспензию культур *F. oxysporum* и *Rh. solani*. С целью получения гомогенной структуры инокулюма зараженный субстрат регулярно встряхивали. После окончательного обрастания субстрата грибницей (рис. 3, 4) инфицированное зерно рассыпали тонким слоем до 3 см и просушивали на воздухе. В фазу 5–6 пар настоящих листьев раскладывали под каждый



Рисунок 1. Чистая культура *Fusarium oxysporum*



Рисунок 2. Чистая культура *Rhizoctonia solani*



Рисунок 3. Внешний вид инокулюма *Fusarium oxysporum*



Рисунок 4. Внешний вид инокулюма *Rhizoctonia solani*

корнеплод зараженное зерно, чтобы иницировать процесс заражения. В течение вегетационного периода влажность почвы выдерживали на уровне 80 % с помощью орошения.

В процессе исследований была разработана система для оценки уровня зараженности образцов изучаемых линий сахарной свеклы фитопатогенными грибами методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Для этого проводили сравнительный анализ титра видоспецифических локусов фитопатогенных грибов *Rh. solani* (Rs2.1, праймеры для амплификации F: GTTGTAGCTGGCCCATTC', R: GGTGTGAAGCTGCAAAAG) и *F. oxysporum* (FOR1, праймеры для амплификации F: CGCCAATCAATTTGAGGAACG, R: ACATACCACTTGTTGCCTCG) по отношению к ДНК сахарной свеклы (MS0235, праймеры для амплификации F: AATGCCGTTAGATTTCCC, R: ACAAACATTGGACGATGC; MS0246, праймеры для амплификации F: TCAAACGGACCAAACACT, R: GAGGAAACAACTTGGGAA).

Использовали также универсальный ДНК-маркер, позволяющий выявлять грибную инфекцию в растительных образцах — участок оперона рибосомальной ДНК (ITS1F-ITS4), включающий в себя фрагмент гена 18S рРНК, внутренний транскрибируемый спейсер (BTC) 1, ген 5,8S рРНК, BTC 2 и фрагмент гена 28S рРНК (праймеры для амплификации ITS1F: CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA, ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC).

Оценку устойчивости образцов сахарной свеклы проводили по следующим показателям — нормализованный титр (количество копий) ДНК фитопатогена в диагностируемом образце (определяется в ходе количественной ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), и условный балл зараженности, полученный в результате денситометрического анализа ампликонов на электрофореграммах (от 1 до 5; 1 — продукт амплификации не выявлен).

В ходе проведенных исследований изучено 300 образцов 24 линий сахарной свеклы, из них — 155 образцов были заражены микромицетом *Rh. Solani* и 145 — *F. oxysporum*. Полученные данные относительно присутствия эндогенной инфекции в исследуемых образцах линий сахарной свеклы были проанализированы и обобщены в сводной таблице.

Наименьшие средние значения условного балла

Таблица. Данные результатов молекулярно-фитопатологического анализа образцов сахарной свеклы

Племенное обозначение	<i>Rhizoctonia sp.</i>		<i>Fusarium sp.</i>	
	Средний условный балл зараженности	Среднее количество копий ДНК фитопатогена	Средний условный балл зараженности	Среднее количество копий ДНК фитопатогена
ММ 663871	2,3	4085	3,4	29580
ММ 663872	2,3	4543	3	2456
PI 574626	2,4	5198	4,4	34902
PI 574625	2,4	5464	3	24201
PI 634210	2,2	4770	2,3	19055
PI 594911	2,4	4993	3	24810
PI 594910	2	3453	3	24804
PI 590844	1,8	2179	2,8	22310
PI 590843	1,6	2005	2,8	22357
Полибел	1,8	3116	2,2	17294
Белполь	1,6	1738	3	28644
МС 333-3	1,6	2073	3	23574
ОП 222-2	1,6	1652	3,2	26398
МС 223-2	1,4	892	2,4	16725
МС 336-2	1,0	95	2,6	20253
ОП 336	1,4	932	3	25259
1/603,2716	1,6	1539	3	26119
МС 2/358,8	2	3062	3	24362
МС 2/358,10	1,8	2177	2,6	21246
МС 2/358,12	1,2	539	3,2	27499
ОП 1/603,17	2,4	5687	3,4	26832
Янаш СУГ	1,8	3194	2,8	22685
М080 195/89	2	4183	2,8	23199
Си Апель	1,8	2915	3	24617

зараженности по отношению к ризоктониозу наблюдали у образцов МС 336-2, ОП 336, МС 223-2, МС 2/358,12 (1,0; 1,4; 1,4; 1,2 соответственно).

Повышенной устойчивостью к фузариозу обладали образцы Полибел, PI 634210, МС 223-2, МС 336-2. Их усредненный условный балл зараженности составил 2,2; 2,3; 2,4 и 2,6, а среднее количество копий ДНК фитопатогена – 17294; 19055; 16725 и 20253 соответственно. Необходимо отметить, что во всех образцах титр фузариоза в абсолютных числах выше, чем ризоктониоза.

В результате анализа общего грибного спектра (маркерный локус рДНК) было установлено, что практически во всех образцах имелись дополнительные фракции. Это свидетельствовало о том, что инфекция носила смешанный характер, и в процессе инфицирования растений сахарной свеклы принимали участие не только ризоктония и фузариум, но и другие микроорганизмы. В ходе выборочного секвенирования смешанных образцов установили, что доминирующим видом в инфицированных корнеплодах являлся микромикет из порядка Гелосциевые, не имеющий микологического описания (идентифицированная нуклеотидная по-

следовательность данного гриба была депонирована в международной генетической базе данных GenBank NCBI под номером MT160413).

Необходимо также отметить, что для образцов сахарной свеклы, обладающих повышенной устойчивостью к ризоктониозу и фузариозу, также характерны невысокие средние баллы зараженности другими грибами. Возможно, это связано с тем, что данные растения обладают общей системной устойчивостью к грибной инфекции.

Таким образом, в результате исследований по полученным данным были выделены три односемянные линии сахарной свеклы (МС 336-2, МС223-2, ОП 336), устойчивые к корневым гнилям, для которых составлены мультилокусные генетические паспорта с использованием RAPD- и SSR-маркеров.

Список литературы

1. Neher, O.T. Rhizoctonia on Sugar Beet: Importance, Identification and Control in the Northwest / O.T. Neher, J.J. Gallian [Electronic resource]. Available at: <https://www.cals.uidaho.edu/edcomm/pdf/PNW/PNW629.pdf> (date of access: 24.11.2016).

2. Desjardins, A. E. Occurrence of Fusarium species and mycotoxins in Nepalese maize and wheat and the effect of traditional processing methods on mycotoxin levels / A. E. Desjardins [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. - 2000. - V. 48(4). - P. 1377-1383.

3. Doohan, F.M. The use of species-specific PCR-based assays to analyse Fusarium ear blight of wheat / F.M. Doohan [et al.] // Plant pathology. - 1998. - V. 47(2). - P. 197-205.

4. Withanage, G.S. Agonistic and antagonistic effects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines / G.S. Withanage [et al.] // Veterinary and human toxicology. - 2001. - V. 43(1). - P. 6-10.

Evaluation of sugar beet samples for resistance to root rot based on molecular phytopathological analysis

S.V. Maisenya, L.V. Mozharovskaya, S.V. Panteleev, O.Yu. Baranov,

Summary. The results of molecular phytopathological analysis of sugar beet breeding samples for the resistance to *Rhizoctonia* and *Fusarium* rot are presented. Breeding samples with increased resistance to root rot have been established.

Key words: polymerase chain reaction (PCR), primers, sugar beet. *Rhizoctonia* spp., *Fusarium* spp.