

УДК 632.4.01/.08:632.952:632.95.025.8

DOI 10.30679/2587-9847-2024-38-59-64

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *FUSARIUM SPOROTRICHIOIDES*, ВОЗБУДИТЕЛЯ КОРНЕВОЙ ГНИЛИ ЯБЛОНИ ДОМАШНЕЙ, И ОЦЕНКА ЕГО ТОКСИНОГЕННОСТИ И ПАТОГЕННОСТИ

Федорович С.В.¹, Астапчук И.Л.^{1,2}, канд. биол. наук, Якуба Г.В.², канд. биол. наук,
Насонов А.И.², канд. биол. наук

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» (Краснодар)

²Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Северо-Кавказский Федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия» (Краснодар)

Реферат. В статье представлены данные об изучении патогенности штамма *Fusarium sporotrichioides* Sherb., возбудителя корневой гнили яблони. Видовая принадлежность установлена путем секвенирования ITS участка. Нуклеотидные последовательности участков гена данного вида были депонированы в базе данных NCBI, и построено филогенетическое древо. Посредством ПЦР-анализа с использованием специфических праймерных пар, у штамма был обнаружен ген триходиевсинтазы (*tri5*), который отвечает за первый этап синтеза трихотеценовых токсинов, наличие которых может явиться фактором вирулентности, способствующим развитию заболеваний корневой системы яблони.

Ключевые слова: корневая гниль, *Fusarium sporotrichioides*, яблоня домашняя, трихотеценовые токсины

Summary. The article presents data on the study of the pathogenicity of the *Fusarium sporotrichioides* Sherb. strain, the causative agent of apple root rot. The species was determined by sequencing the ITS site. The nucleotide sequences of the gene sections of this species were deposited in the NCBI database, and a phylogenetic tree was constructed. By means of PCR analysis using specific primer pairs, the trichodiensynthase (*tri5*) gene was detected, which is responsible for the first stage of synthesis of trichothecene toxins, the presence of which may be a virulence factor contributing to the development of diseases of the root system of the apple tree.

Keywords: root rot, *Fusarium sporotrichioides*, domestic apple tree, trichothecene toxins

Введение. Промышленное садоводство в России является одной из важнейших отраслей агропромышленного комплекса. Болезни сельскохозяйственных растений, вызываемые грибами, во всем мире наносят существенный ущерб урожаю и приводят к экономическим потерям. Среди заболеваний древесных растений одним из наиболее опасных является корневая гниль. В последние годы в патоккомплексе корневой гнили на плодовых культурах увеличилась частота встречаемости и вредоносность патогена *Fusarium sporotrichioides* Sherb. [1-2], по нашим данным его доля среди возбудителей фузариозной корневой гнили составляет 50 % [3-5]. Головин С.Е. с 2010 г. отмечал присутствие данного возбудителя в патоккомплексе микромицетов корневой гнили

яблони [6-7]. По литературным данным известно, что *F. sporotrichioides* также входит в патоконкомплекс корневой гнили злаковых культур [8-9], подсолнечника [10], *Erigeron breviscapus* в Китае [11], сои в Канаде [12].

Широкая распространенность вида *F. sporotrichioides* в окружающей среде и способность к продуцированию значительных количеств токсинов особенно трихотеценов, ставят его в ряд наиболее опасных фитопатогенов. В естественных условиях трихотецены являются загрязнителями (контаминантами) зерновых культур и выявляются во всем мире. Грибы-продуценты обуславливают болезни растений, преимущественно злаковых, что наносит значительный ущерб экономике. В то же время они представляют серьезную проблему для здоровья людей и домашних животных. По данным литературы, микотоксин Т-2 относится к возможным агентам биотерроризма [13].

Микромицет *F. sporotrichioides* является основным продуцентом Т-2 токсина. Наиболее интенсивное накопление токсинов наблюдается при повышенной влажности и пониженной температуре. На основе последовательности нуклеотидов *tri5* гена, расположенного на 5' конце 28S региона рибосомальной ДНК (rDNA) и контролирующего первый этап синтеза трихотеценовых токсинов, созданы праймеры Tox5-1/Tox5-2, которые в настоящее время широко используются для диагностики штаммов различных видов *Fusarium*, продуцирующих эти токсины [14]. Учитывая тот факт, что возбудители фузариозной корневой гнили все больше колонизируют садовые насаждения [15], диагностика молекулярно-генетическими методами и изучение патогенности доминирующего возбудителя микопатоконкомплекса является актуальным.

Цель работы – идентификация лабораторного штамма *F. sporotrichioides* с помощью секвенирования ITS-последовательностей, диагностика его токсиногенности методом ПЦР, а также оценка его патогенности в условиях *in vivo*.

Объекты и методы исследований. Исследования были проведены в лаборатории биотехнологического контроля фитопатогенов и фитофагов и в ЦКП ФГБНУ «Северо-Кавказский федеральный научный центр садоводства, виноградарства, виноделия». Объектом исследований являлся штамм *F. sporotrichioides*, обнаруженный в патоконкомплексе корневой гнили.

В 2020 г. методом маршрутных обследований в промышленных садах Краснодарского края были отобраны растения с визуальными признаками корневой гнили: двухлетние саженцы сорта Пинк Леди. Был проведен микробиологический анализ образцов: поврежденные участки корней, а также корневой шейки нарезали размером 1-2 см², промывали в течении 20 минут под проточной водой, затем 2 %-м раствором NaClO в течение 50 с и ополаскивали стерилизованной водой, после чего закладывали на картофельно-глюкозный агар (КГА) в трехкратной повторности. Через 7 дней инкубации при температуре 25 °С наблюдали колонии с обильным ватообразным воздушным мицелием белого, со временем розового цвета. Затем стерильной иглой переносили конидию патогена на КГА; через 7 дней роста культуры был получен моноконидиальный изолят, который с помощью методов микроскопии и определительной литературы [16] был идентифицирован как *Fusarium sporotrichioides* Sherb., штамму был присвоен номер RR20VIII/6.2.1 (рис. 1).

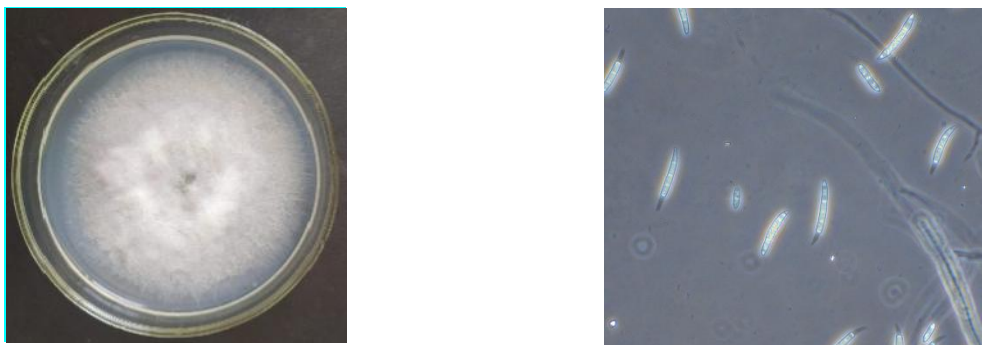


Рисунок 1 – Морфолого-культуральные признаки штамма *F. sporotrichioides*

Далее была выделена ДНК колоний штамма сорбентным методом на магнитных частицах (ЗАО «Синтол», Москва). Реакционная смесь для постановки одной реакции объемом 25 мкл содержала 2.5 мкл 10X Encyclo buffer, 0.5 мкл смеси dNTP (10 mM каждого), 0.5 мкл 50X Encyclo polymerase Mix (ООО «Евроген», Москва), 5 пМ каждого праймера, и 50 нг целевой ДНК. Продукты амплификации анализировали методом гель-электрофореза в 2 %-м агарозном геле и 10x TAE буфере. Полученные последовательности размером 490 – 560 п. о. выделяли из геля с использованием коммерческого набора Cleanup Standard (ООО «Евроген», Москва). Секвенирование продуктов ПЦР проводили методом Сэнгера, с последующим разделением продуктов терминирующей реакции методом капиллярного гель-электрофореза. Терминирующую реакцию проводили с применением BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на автоматическом генетическом анализаторе ABI PRISM 3500xl (Applied Biosystems, США). Для определения видовой принадлежности исследуемых объектов использовали праймерные пары, специфичные к внутреннему транскрибируемому спейсеру ITS [17]. Выравнивание прочтений на референсную последовательность производили с помощью программы «UGEN» (Unipro, Россия). Нуклеотидные последовательности участков генов изучаемых видов анализировали алгоритмом BLAST с использованием базы данных NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Филогенетическое дерево было построено в программе MEGA X.

Амплификацию целевых генов производили с использованием праймерных пар к трихотеценкодирующему гену *tri5* [10]. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 5 мкл 5X qPCRmix-HS SYBR (ООО «Евроген», Москва), 5 пМ каждого праймера, и 50 нг целевой ДНК. Условия ПЦР амплификации для праймерных пар Tox5: 94 °C – 1 мин, 68 °C – 2 мин, 75 °C – 3 мин; 4 цикла. Затем 94 °C – 30 с, 68 °C – 30 с, 75 °C – 1 мин; 36 циклов, с режимом детекции в реальном времени на приборе QuantStudio™ 5 (Thermo Fisher Scientific, США) [14].

Оценка патогенности штамма была проведена в *in vivo* условиях в вегетационной комнате при 25 °C и относительной влажности 70 %. Для этого подвой М 9 в количестве 10 шт. были высажены в вазоны с почвой, которая была пролита 300 мл конидиальной суспензией (1×10^6 conidia/мл). Контрольные подвой были пролиты водой. Через месяц после заражения проводилась оценка симптомов каждую неделю в течении 2-х месяцев. Далее была проведена оценка наличия патогенов в подвойном материале (Постулаты Коха): визуально и методом микроскопирования, далее – закладка материала на питательную среду (КГА).

Обсуждение результатов. Анализ последовательности рДНК-ITS подтвердил видовую принадлежность штамма как *Fusarium sporotrichioides*, который был депонирован в Genbank NCBI под регистрационным номером OM475711. Анализ BLAST

показал, что последовательности ITS имели 100 % идентичность с *F. sporotrichioides* МК543242, МК911670, МК907704, МК729580, МК729569, МК562070, МН299952, МК460800, МН266059, МН281319 соответственно.

Филогенетическое дерево было построено с использованием дополнительных последовательностей, загруженных из GenBank: MZ078645.1, OM106443.1, и внешних групп: LN713975.1, LN713975.1. Результаты показали, что патоген принадлежит к *F. sporotrichioides*, поскольку он сгруппирован с соответствующим кластером (рис. 2).

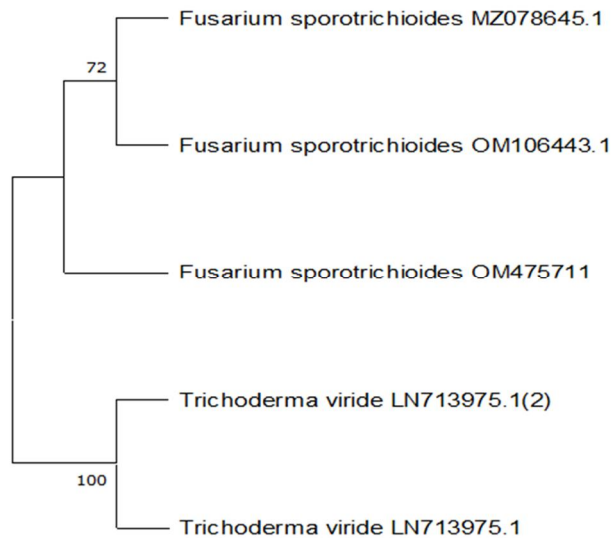


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево, рассчитанное по ITS-области исследуемой выборки вместе с 2-мя другими изолятами *Fusarium sporotrichioides*. Изоляты указаны в дереве по инвентарному номеру коллекции. Цифры на каждом узле указывают на загрузку на основе 1000 репликаций

Аmplификация целевого фрагмента гена триходиенсинтазы (*tri5*) у изучаемого штамма была стабильной, среднее значение C_t равно 28,5 (рис. 3).

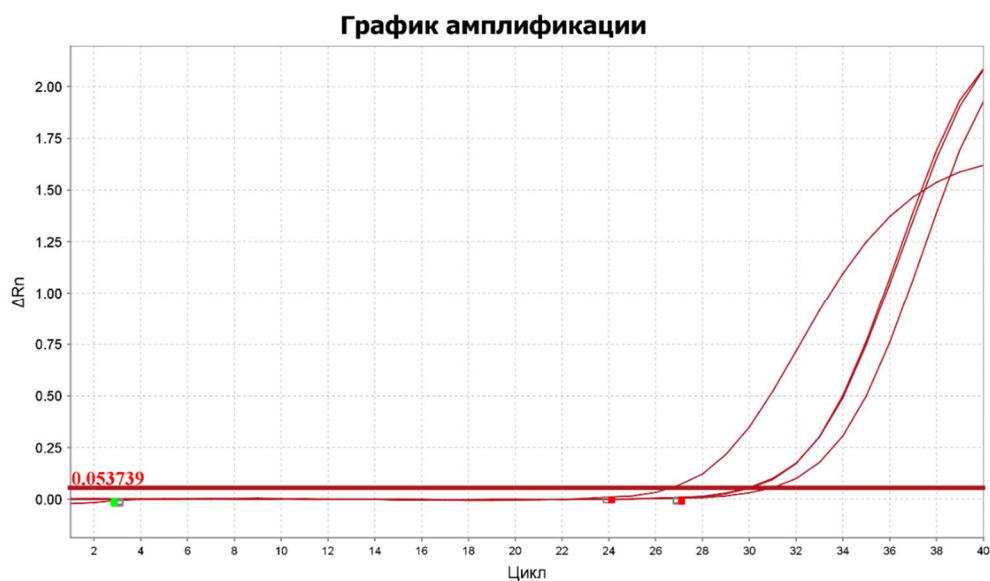


Рисунок 3 – Графики амплификации целевого фрагмента гена *tri5*

В исследовании в *in vivo* условиях через 2 месяца после инокуляции, у восьми из десяти подвоев наблюдали корневую гниль, контрольные варианты оставались бессимптомными. Возбудитель был повторно выделен из пораженных корней на среде КГА, что подтвердило результаты, полученные при выполнении триады Коха, и, таким образом, была доказана патогенность данного штамма как возбудителя гнили корней яблони (рис. 4).



Зараженный подвой М 9 в вазоне с почвой

Вода *Fusarium sporotrichioides*

Повторная изоляция гриба из зараженных корней

Рисунок 4 – Заражение корневой системы саженцев яблони штаммом *F. sporotrichioides* в *in vivo* условиях

Выводы. В результате проведенного исследования лабораторный штамм *F. sporotrichioides* был идентифицирован с помощью ITS праймеров, доказана его патогенность в *in vivo* условиях. Проведена генетическая оценка штамма как потенциального продуцента микотоксинов. Было показано, что данный патогенный штамм содержит последовательность ДНК гена триходиенсинтазы (*tri5*), одного из факторов патогенеза.

Результаты данного исследования значимы для совершенствования фитосанитарного мониторинга и борьбы с корневыми гнилями яблони, поскольку *F. sporotrichioides* может серьезно ограничивать производство яблок в Краснодарском крае.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-26-20114, <https://rscf.ru/project/24-26-20114/>

Литература

1. Якуба Г.В. Изучение основных тенденций в развитии микозов в меняющихся условиях среды // Плодоводство и ягодоводство России, 2013. Т. XXVI, ч. 2 С. 355-360.
2. Смольякова В.М. Болезни плодовых пород Юга России. Краснодар: ИПК «Весть», 2000. 192 с.
3. Astaruchuk, I.L., Yakuba G.V., Nasonov A.I. Pathocomplex of root rot of apple tree in nurseries and young orchards of the South of Russia // BIO Web of Conferences, 2020. P. 06002. DOI 10.1051/bioconf/20202506002.

4. Astapchuk, I.L., Yakuba G.V., Nasonov A.I. Species diversity of root rot pathogens of apple tree of the genus *Fusarium* Link in Southern Russia // Bio web of conferences 2020. P. 00005.

5. Насонов А.И. Культуральное разнообразие вида *Fusarium sporotrichioides* Sherb. - возбудителя корневой гнили яблони Краснодарского края / А. И. Насонов, И. Л. Астапчук, Г. В. Якуба // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2020. № 83. С. 100-105. DOI 10.21515/1999-1703-83-100-105.

6. Головин С.Е. Корневые и прикорневые гнили садовых растений: распространенность, вредоносность, диагностика // Москва: Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, 2016. 440 с.

7. Головин С.Е., Упадышев М.Т. Современные тенденции в защите садов // Защита и карантин растений. 2017. № 12. С. 6-8.

8. Торопова Е.Ю. Факторы доминирования грибов рода *Fusarium* в патокмлексе корневых гнилей зерновых культур / Е. Ю. Торопова, М. П. Селюк, О. А. Казакова // Агрохимия. 2018. № 5. С. 69-78. DOI 10.7868/S0002188118050101.

9. Чекмарев В.В. Активность фунгицидов в отношении возбудителя корневой гнили пшеницы - гриба *Fusarium sporotrichioides* / В. В. Чекмарев // EurasiaScience : сборник статей XXII международной научно-практической конференции, Москва, 30 июня 2019 года / Научно-издательский центр «Актуальность.РФ». Москва: Общество с ограниченной ответственностью "Актуальность.РФ", 2019. С. 18-19.

10. Кузнецов А.А. Методы искусственного заражения подсолнечника грибами рода *Fusarium* Link et Fr. в условиях Тамбовской области / А. А. Кузнецов, А. А. Выприцкая, Ю. В. Зеленева // Вестник Тамбовского университета. Серия: Естественные и технические науки. 2016. Т. 21, № 2. С. 592-597. DOI 10.20310/1810-0198-2016-21-2-592-597.

11. Zhou J.H., Du, B., Liu, C.Q., Yang, S.C., Wang, Y.Y. and Zhu, Y.Y. (2006), First report of *Fusarium sporotrichioides* causing root rot of *Erigeron breviscapus* in China. *Plant Pathology*, 55: 816-816. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01470.x>

12. Ahmed Abdelmagid, Mohamed Hafez, Atta Soliman, Lorne R. Adam & Fouad Daayf (2021) First report of *Fusarium sporotrichioides* causing root rot of soybean in Canada and detection of the pathogen in host tissues by PCR, *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43:4, 527-536, DOI: 10.1080/07060661.2020.1841034

13. Липницкий А.В., Антонов В.А., Гришина М.А. Молекулярно-генетические подходы к идентификации грибов – продуцентов трихотеценовых микотоксинов (Обзор) / Проблемы медицинской микологии, 2007, Т. 9, № 3. С. 16-20.

14. Гагкаева Т. Ю. Метод ПЦР-диагностики фитопатогенных грибов родов *Fusarium* и *Alternaria* /Т.Ю. Гагкаева, Ф.Б. Ганнибал, О.П. Гаврилова // Высокопроизводительные и высокоточные технологии и методы фитосанитарного мониторинга / Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН. – Санкт-Петербург: Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений РАСХН, 2009. С. 4-14.

15. Головин С. Е. Возбудители микозного усыхания, корневых и прикорневых гнилей плодовых культур: диагностика, меры борьбы / С. Е. Головин, Т. И. Романченко. – 2-е издание, дополненное. Москва: Всероссийский селекционно-технологический институт садоводства и питомниководства, 2020. 192 с.

16. Д. Саттон, А. Фотергил, М. Ринальди "Определитель патогенных и условно-патогенных грибов" (издательство "Мир", 2001 год).

17. Martin K.J., Rygiewicz, P.T. Fungal-specific PCR primers developed for analysis of the ITS region of environmental DNA extracts. *BMC Microbiol* 5, 28 (2005). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-5-28>