

Изучение свойств местных изолятов фитопатогенного гриба *Parastagonospora nodorum*

© 2022. А. В. Бакулина, к. б. н., зав. лабораторией,
Д. В. Попыванов, к. б. н., н. с.,
А. В. Харина, к. с.-х. н., н. с.,
Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н. В. Рудницкого,
610007, Россия, г. Киров, ул. Ленина д. 166а,
e-mail: mol-biol@fanc-sv.ru

С целью изучения культурально-морфологических и патогенных свойств грибов-возбудителей септориоза пшеницы в условиях Кировской области с поражённых растений выделяли изоляты фитопатогенных грибов. В ходе работы из 38 выделенных в чистую культуру изолятов восемь были идентифицированы по культурально-морфологическим показателям как возбудители септориоза колоса пшеницы (*Parastagonospora nodorum*). Видовая принадлежность подтверждена с помощью ПЦР в реальном времени с использованием коммерческой тест-системы «Септориоз злаков (*Stagonospora nodorum*)» («АгроДиагностика», Россия). На основании экспериментальных данных предложена модификация методики выделения грибов-возбудителей септориоза пшеницы. Культурально-морфологические признаки местных изолятов *P. nodorum* (TR1, TR2, P12, H7, H9, KR, SB, TC) охарактеризованы на картофельно-глюкозном (КГА) агаре. Установлено, что использование в качестве питательной среды солодово-дрожжевого агара в сравнении с КГА стимулировало скорость роста изолята *P. nodorum* KR и не повлияло на интенсивность роста других изолятов гриба. Оценка патогенных свойств местных изолятов *P. nodorum* на растениях пшеницы показала, что к высокопатогенным относятся изоляты TC и H9. Их следует рекомендовать для скрининга устойчивости к септориозу широкого спектра генотипов пшеницы, выращиваемых в условиях Кировской области.

Ключевые слова: септориоз колоса пшеницы, *Parastagonospora nodorum*, культурально-морфологические свойства, пикноспоры, скорость роста, патогенность.

Study of the properties of local isolates of *Parastagonospora nodorum*

© 2022. A. V. Bakulina ORCID: 0000-0002-5171-2476
D. V. Popov ORCID: 0000-0002-4978-4542
A. V. Kharina ORCID: 0000-0002-0554-5814
Federal Agricultural Research Center of North-East named N. V. Rudnitsky,
166a, Lenina St., Kirov, Russia, 610007,
e-mail: mol-biol@fanc-sv.ru

To study the cultural, morphological and pathogenic properties of fungi that cause Septoria blotch of wheat in the conditions of the Kirov region, phytopathogenic fungi were isolated from the affected plants. Of the 38 fungal isolates selected in pure culture, eight were identified by cultural and morphological features as *Parastagonospora nodorum* which causes Septoria nodorum blotch (SNB). To confirm the species identity, the DNA of fungi was used for real-time PCR using the commercial test system “Septorioz zlakov (*Stagonospora nodorum*)” (“AgroDiagnostika”, Russia). Based on experimental data, a modification of the method for isolating fungi that cause Septoria blotch of wheat is proposed. Cultural and morphological properties of local *P. nodorum* isolates (TR1, TR2, P12, H7, H9, KR, SB, TC) were characterized on potato-glucose agar (PGA). The use of malt-yeast agar as a medium in comparison with PGA stimulated the growth rate of the *P. nodorum* KR isolate and did not affect the growth rate of other fungal isolates. Evaluation of the pathogenic properties of local *P. nodorum* isolates on wheat plants showed that TC and H9 isolates are highly pathogenic. These isolates can be used to screen the resistance to SNB of a wide range of wheat genotypes grown in the Kirov region.

Keywords: Septoria nodorum blotch, *Parastagonospora nodorum*, cultural and pathogenic properties, pycnidospores, growth rate.

Септориоз листьев и колоса долгое время является одним из наиболее распространённых и вредоносных заболеваний пшеницы на всей территории её возделывания [1]. В России возбудители септориоза занимают доминирующее положение среди грибных болезней пшеницы, а потери урожая этой важнейшей зерновой культуры, вызванные септориозом, составляют в разные годы от 10 до 60% [2]. Среди превентивных мер борьбы с заболеванием выделяют: контроль заражённости посевного материала, соблюдение сроков посева, либо использование фунгицидов, оказывающих негативное влияние на состояние окружающей среды. Экологически безопасным и эффективным способом борьбы с септориозом является создание устойчивых генотипов пшеницы. Посевы устойчивых сортов способны препятствовать развитию эпифитотического процесса и ограничить географическую экспансию патогена [1, 3]. При этом эффективность «главных» генов (major genes) устойчивости хозяина, которые преимущественно используются в селекции, в значительной мере обусловлена генетическими особенностями самого патогена [4]. Создание коллекции местных популяций грибов необходимо для изучения патогенного комплекса возбудителя и отбора устойчивых форм растений.

Возбудителями септориоза пшеницы являются преимущественно два вида грибов: *Zymoseptoria tritici* и *Parastagonospora nodorum*, соотношение которых в значительной степени зависит от региона выращивания. На юге России доминирует вид *Z. tritici*, а по направлению к северу и востоку соотношение возбудителей меняется в сторону вида *P. nodorum*. Гораздо реже по сравнению с двумя этими видами встречается гриб *Parastagonospora avenae* f. sp. *triticea*, который, хотя и отмечен во всех высевающихся пшеницу регионах страны, никогда не является доминирующим в патоконтакте [5].

Целью настоящей работы явилось выделение, идентификация и изучение культурально-морфологических признаков и патогенности изолятов грибов-возбудителей септориоза пшеницы в условиях Кировской области.

Объекты и методы исследования

Для выделения местных изолятов возбудителей септориоза использовали поражённые листья и колосковые чешуи яровой мягкой пшеницы различных сортов, отобранные на

опытном поле ФГБНУ ФАНЦ Северо-Востока (с. Красное, г. Киров). Сравнивали эффективность двух методик выделения чистых культур: 1) извлечение пикнид гриба иглой с поражённых тканей растений с использованием стереомикроскопа (увеличение 200) и последующим переносом пикнид на питательную среду (ПС); 2) высев методом штриха споровой суспензии гриба, полученной в асептических условиях с временного препарата фрагментов поражённых тканей, с использованием светового микроскопа (увеличение 400) [6].

Культивирование грибов проводили на картофельно-глюкозном агаре (КГА) с добавлением цефотаксима (100 мг/л) для подавления роста бактерий. Через 7–8 сут культивирования при 20–25 °С единичные колонии отсеивали, отслеживая стабильность изолятов при трёх последовательных пересевах 10-суточных колоний на свежую ПС. Культурально-морфологические признаки изолятов оценивали на среде КГА согласно [7–9]. Для стимуляции спорообразования колонии *P. nodorum* выращивали в закрытых стеклянных чашках Петри при постоянном облучении эритемной лампой ЛЭ-30А с длиной волны 253,7 нм в течение 30 сут. Скорость роста колоний оценивали на двух средах: КГА и солодово-дрожжевом агаре (СДА). Для определения радиальной скорости роста колоний (K_r , мм/сут) проводили ежесуточное измерение диаметра колоний в двух взаимно-перпендикулярных направлениях. Расчёт осуществляли по формуле:

$$K_r = (d_2 - d_1) / (t_2 - t_1), \quad (1)$$

где d_1 и d_2 – диаметр колоний (мм) в начальный и конечный момент времени t_1 и t_2 (сут).

Молекулярно-генетическую идентификацию грибов проводили методом ПЦР в режиме реального времени. Выделение ДНК осуществляли с помощью набора проба ЦТАБ («ДНК-технология», Москва), согласно инструкции изготовителя. Для постановки ПЦР использовали коммерческую тест-систему «Септориоз злаков (*Stagonospora nodorum*)» («Агродиагностика», Россия). Реакцию амплификации проводили на приборе ДТ-Лайт («ДНК-технология», Россия), регистрирующем флуоресценцию. Реакционная смесь (35 мкл) содержала 5 мкл исследуемой ДНК, режим ПЦР согласно рекомендациям изготовителя. В качестве отрицательного контроля использовали образец контроля выделения,

прошедший все стадии выделения ДНК, но не содержащий мицелия гриба. Учёт результатов ПЦР проводили автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.9. Кривые флуоресценции анализировали путём прямого сравнения кривых, вычисляя значение точки C_p (crossing point) на графике накопления ДНК по форме кривой (метод максимума второй производной).

Изучение патогенных свойств выделенных изолятов грибов проводили на растениях пшеницы. Споровую суспензию получали при твёрдофазном культивировании грибов на субстрате из перловой крупы в культивационных ёмкостях объёмом 500 мл. Для их инокуляции использовали выращенные на КГА колонии, мицелий отбирали пробочным сверлом диаметром 10 мм. Количество посевного материала: 2 агаровых блока с мицелием диаметром 10 мм. Культивирование осуществляли при 22–25 °С и облучении 14 ч/сут эритемной лампой ЛЭ-30 в течение 10 сут. Для приготовления споровой суспензии субстрат с мицелием гриба разводили стерильной дистиллированной водой, измельчали и фильтровали через марлю. Для подсчёта количества спор использовали камеру Горяева.

Оценку патогенности местных изолятов проводили на яровой пшенице сортов Баженка (слабовосприимчивый), Уйская (восприимчивый), Дарья (устойчивый), подобранных по степени поражения септориозом согласно оценке в естественных полевых условиях. Семена выращивали в рулонной культуре по 25 шт., повторность трёхкратная. Споровую суспензию (10^6 спор/мл) наносили на растения при помощи пульверизатора на 10 сут. После инокуляции среднюю степень поражения сортов (%) учитывали [10] несколько раз через равные промежутки времени. К слабопатогенным относили штаммы, поражающие тест-сорта менее чем на 20%, к среднепатогенным – 20–50%, к сильнопатогенным – более 50% [11]. Также определяли площадь под кривой развития болезни (ПКРБ) в условных единицах [12, 13] по формуле:

$$S = 1/2(x_1 + x_2)(t_2 - t_1) + \dots + (x_{n-1} + x_n)(t_n - t_{n-1}), \quad (2)$$

где S – площадь под кривой развития болезни; n – количество учётов; x_1 – степень развития болезни на момент первого учёта, %; x_2 – степень развития болезни на момент второго учёта, %; x_n – степень развития болезни на момент последнего учёта, %; $(t_2 - t_1)$ – ко-

личество дней между вторым и первым учётом; $(t_n - t_{n-1})$ – количество дней между последним и предпоследним учётом.

Обработку полученных данных проводили стандартными статистическими методами [14] с использованием пакета программ Microsoft Excel 2010.

Результаты и обсуждение

С фрагментов поражённых септориозом тканей пшеницы в чистую культуру было выделено 38 изолятов фитопатогенных грибов. Ни один из 24 изолятов, выделенных путём посева иглой из пикнид, не принадлежал к родам *Zymoseptoria* и *Parastagonospora*. На основании культурально-морфологических свойств данные изоляты отнесены к родам: *Acremonium*, *Ulocladium*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* [7].

Большую эффективность показал подход, заключающийся в посеве споровой суспензии с характерными для целевых видов пикноспорами (конидиями) непосредственно с временного препарата после его микроскопии. Таким образом, в чистую культуру было выделено 14 изолятов фитопатогенных грибов, из которых в дальнейшем восемь (57%) были идентифицированы как *P. nodorum* – возбудитель септориоза колоса пшеницы.


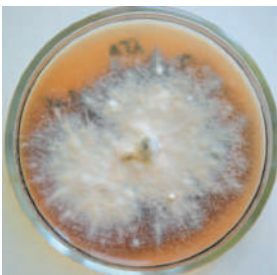
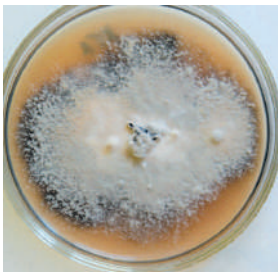





Культурально-морфологические свойства полученных изолятов *P. nodorum* оценивали на КГА на 20 сут культивирования. Внешний вид колоний, их описание и диаметр приведены в таблице 1 (см. цв. вкладку VI). Изоляты TR1, TR2, P12, H7, H9, KR согласно [8] имели морфотип I (однородный, светлый), изоляты SB и TC – морфотип III (смешанный). Известно, что морфология колоний *P. nodorum* связана со спорулирующей способностью: высокой спорулирующей способностью отличаются изоляты с гранулированным типом колоний, редким мицелием и большим количеством пикнид [8]. У исследованных изолятов *P. nodorum* не выявлено способности к формированию на среде КГА большого количества пикнид.

При росте на КГА большинство изолятов (62,5%) характеризовались как быстрорастущие ($d > 70$ мм), один изолят (TR1) – как медленно растущий ($d < 60$ мм), два изолята (H-7 и SB) имели среднюю скорость роста ($d = 60–70$ мм) [8]. С целью выбора оптимальной среды для культивирования местных изолятов *P. nodorum* сравнивали их скорость роста на КГА и СДА. Средний диаметр коло-

А. В. Бакулина, Д. В. Попыванов, А. В. Харина
«Изучение свойств местных изолятов фитопатогенного гриба
***Parastagonospora nodorum*». С. 213.**

Таблица 1 / Table 1

Культурально-морфологические признаки местных изолятов *P. nodorum* на КГА
 Cultural and morphological characteristics of local *P. nodorum* isolates on the PGA

Изолят (сорт пшеницы), тип колонии Isolate (wheat cultivar), colony type	Изолят (сорт пшеницы), тип колонии Isolate (wheat cultivar), colony type
TR1 (Терция)	TR2 (Терция)
 <p>мицелиальные, серо-розовые, гранулированные, с выраженным светлым растущим краем $d^* = 44,5$</p>	 <p>мицелиальные, серые, отсутствие чётко выраженной краевой зоны, воздушный мицелий $d = 81,3$</p>
P12 (Росинка)	H7 (Нива 2)
 <p>мицелиальные, серые, гранулированные, край более тёмного цвета, воздушный мицелий $d = 71,8$</p>	 <p>мицелиальные, серые, мицелий в центре более плотный, выпячивающийся над субстратом, редкий по краям $d = 67,0$</p>
H9 (Нива 2)	KR (Красноярская)
 <p>мицелиальные, серые, гранулированные со светлыми вкраплениями, краевая зона не чёткая $d = 83,0$</p>	 <p>мицелиальные, белые, мицелий в центре более плотный, выпячивающийся над субстратом, редкий по краям $d = 80,7$</p>
SB (Sibia)	TC (Torridon)
 <p>мицелиальные, плотные, центр колонии светло-серый, средний слой светло-коричневый, край тёмно-оливковый, радиально расходящаяся складчатость $d = 69,2$</p>	 <p>мицелиальные, в окраске 2–3 цвета, преобладает оливковый, отмечаются концентрически расходящиеся круги (разного оттенка), чётко выраженная краевая зона $d = 80,3$</p>

* Средний диаметр 3 колоний (мм) / The average diameter of the 3 colonies (mm)

ний 75% исследованных культур при выращивании на СДА, превосходил этот показатель на КГА (от 1,8 до 23,0 мм в зависимости от изолята). На среде СДА было отмечено достоверное увеличение K_r у *P. nodorum* KR, тогда как у остальных изолятов гриба данный показатель на использованных ПС значительно не различался (рис. 1). Изоляты SB, TC, TR1 при культивировании на СДА характеризовались увеличением K_r на 0,8–1,1 мм/сут. Таким образом, для большинства исследованных изолятов *P. nodorum* культивирование на СДА не выявило преимуществ в росте гриба в сравнении с КГА.

Для подтверждения видовой идентификации ДНК восьми местных изолятов грибов подвергали ПЦР-анализу с использованием коммерческой тест-системы «Септориоз злаков (*Stagonospora nodorum*)». У всех исследованных изолятов на основании молекулярно-генетического анализа подтвердилась принадлежность к виду *P. nodorum*. Кривые амплификации и значения C_p приведены на рисунке 2.

В связи с разнообразием культурально-морфологических свойств патогенов *P. nodorum* и *Z. tritici*, длительным спорообразованием и наличием видов, обладающих фенотипическим сходством использование молекулярно-генетического подхода значительно упрощает

процедуру выделения целевых патогенов. На рисунке 3 показана использованная нами схема выделения и идентификации гриба *P. nodorum*, которая за счёт селективных приёмов (споровая суспензия после микроскопии для посева и ПЦР для подтверждения видовой принадлежности), позволяет быстро и эффективно выделить данный патоген. В связи с доступностью на рынке ПЦР тест-систем для идентификации различных видов фитопатогенных грибов данная схема выделения в чистую культуру может быть применима и для других видов.

Важным свойством гриба *P. nodorum* является патогенность его различных штаммов. Патогенность местных изолятов гриба *P. nodorum* исследовали на растениях яровой мягкой пшеницы сортов Баженка, Дарья и Уйская. Установлено, что по средней степени поражения тест-сортов к слабопатогенным относится изолят Н7, к среднепатогенным – большинство изолятов (TR1, TR2, SB, KR, P12, Н9), к высокопатогенным – ТС (рис. 4).

Согласно показателю ПКРБ, отражающему степень нарастания септориоза во времени, выявлено, что наибольшей патогенностью характеризуются штаммы ТС и Н9. При инокуляции всех исследованных сортов пшеницы ПКРБ для изолятов ТС и Н9 превышал 150 усл. ед. (рис. 5) и значительно превосходил

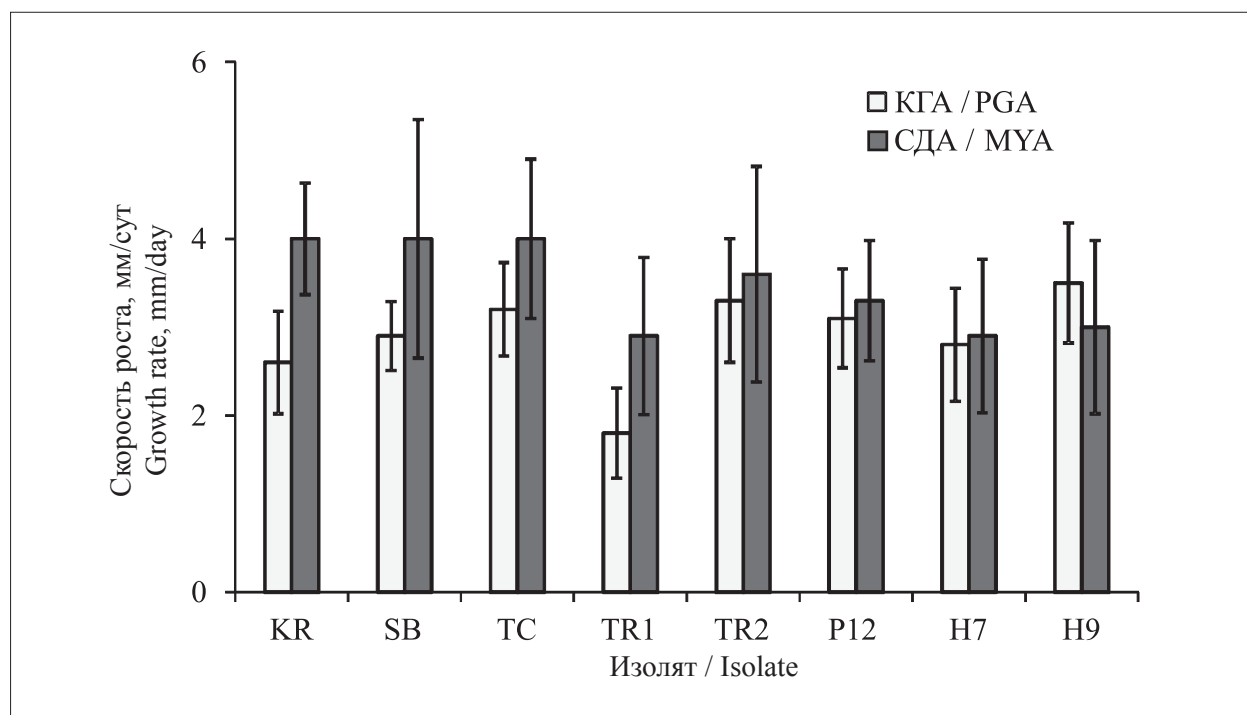
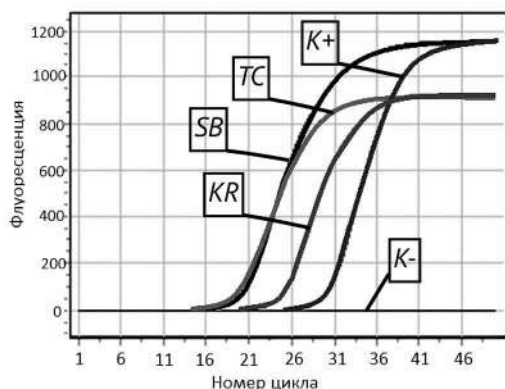


Рис. 1. Скорость роста изолятов *P. nodorum* на КГА и СДА
 Fig. 1. Growth rate of *P. nodorum* isolates on PGA and MYA

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, C_p	Результат
A1	KR	25,1	+
A3	SB	20,6	+
A4	TC	20,3	+
A6	K+	30,4	+
A7	K-		-

Изоляты KR, SB, TC



Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, C_p	Результат
A1	TR1	28,7	+
A4	TR2	27,0	+
A5	P12	29,0	+
A8	H7	23,2	+
F2	H9	27,9	+
F3	K+	30,4	+
F5	K-		-

Изоляты TR1, TR2, P12, H7, H9

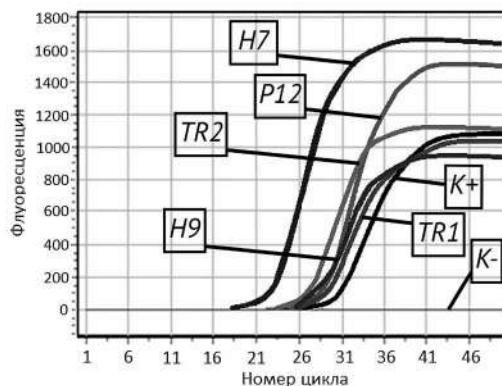


Рис. 2. Результаты амплификации ДНК местных изолятов *P. nodorum*. Идентификатор пробирки соответствует наименованию изолята, цвет кривой флуоресценции соответствует таковому для номеров лунок, «K+» – положительный контроль; «K-» – отрицательный контроль; C_p – значение точки crossing point; «+» – положительный результат, «-» – отсутствие амплификации
Fig. 2. Results of DNA amplification of local *P. nodorum* isolates. The tube identifier corresponds to the name of the isolate, the color of the fluorescence curve corresponds to that of the well numbers, “K+” – positive control; “K-” – negative control; C_p – the value of the crossing point; “+” positive result, “-” no amplification

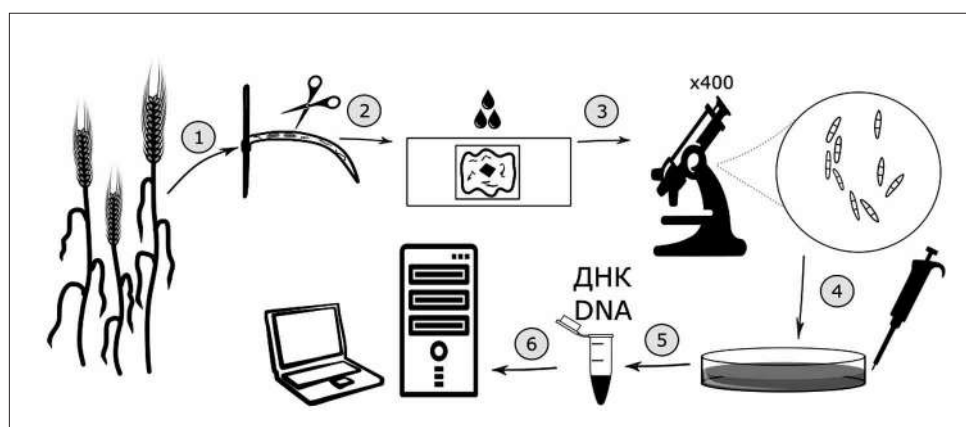


Рис. 3. Схема выделения и идентификации изолятов *P. nodorum*:
 1 – отбор материала с поражённых септориозом растений пшеницы; 2, 3 – приготовление временного препарата и микроскопирование (увеличение $\times 400$); 4 – посев споровой суспензии на ПГА;
 5 – выделение ДНК из колоний гриба; 6 – проведение ПЦР со специфичными праймерами
Fig. 3. Scheme of isolation and identification of *P. nodorum* isolates:
 1 – selection of material from wheat plants affected by Septoria blotch; 2, 3 – preparation and microscopy of a temporary preparation (magnification $\times 400$); 4 – sowing of a spore suspension on PGA; 5 – isolation of DNA from fungal colonies; 6 – PCR with specific primers

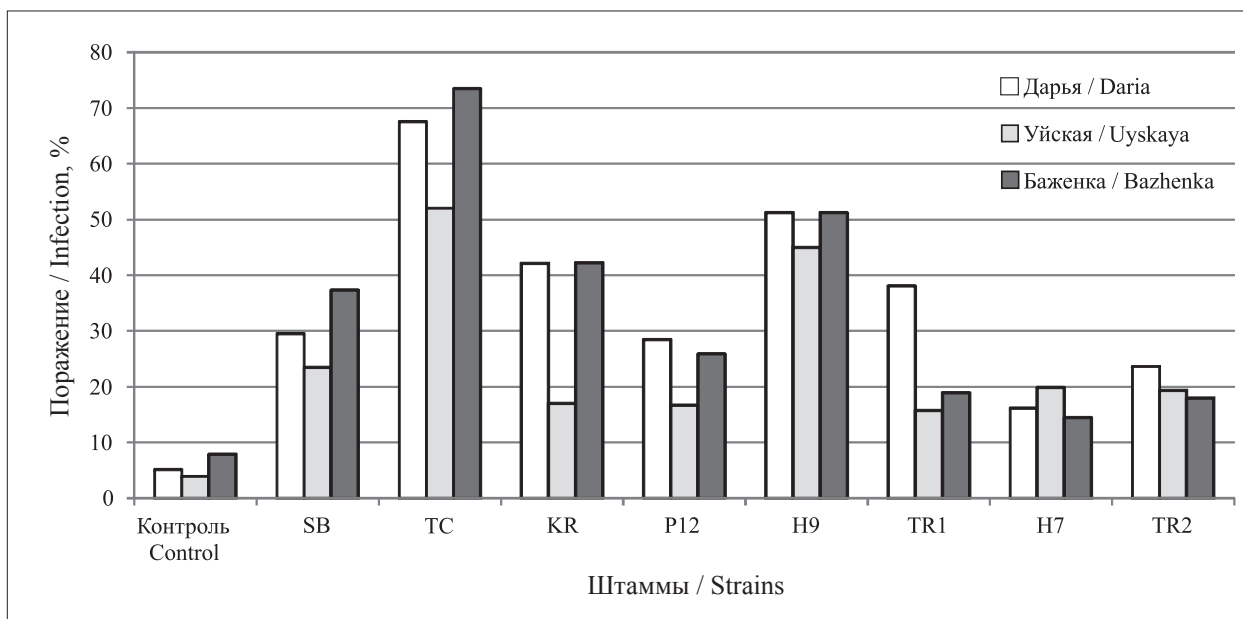


Рис. 4. Степень поражения яровой пшеницы в рулонной культуре на 10 сутки после инокуляции споровой суспензией местных изолятами *P. nodorum*
Fig. 4. The value of the disease to spring wheat in a roll culture on the 10th day after inoculation with a spore suspension with local *P. nodorum* isolate

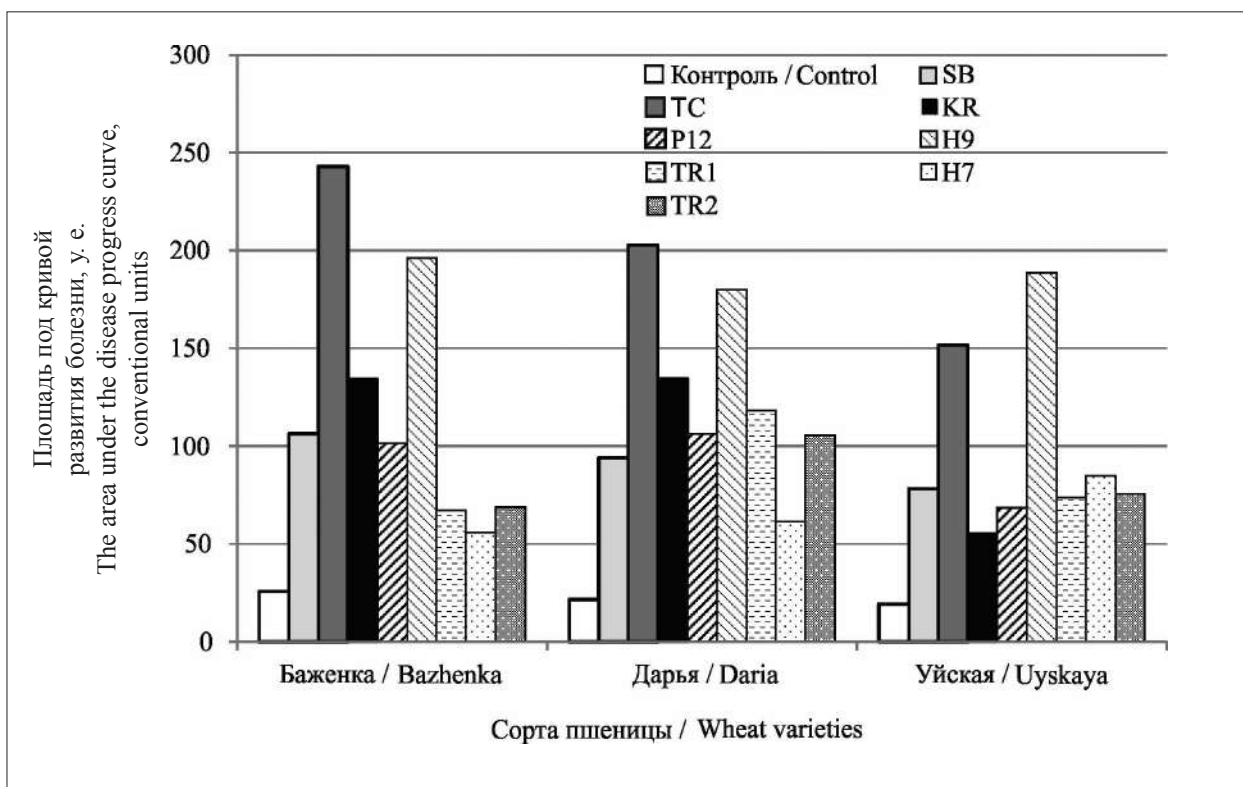


Рис. 5. Степень нарастания септориоза при инокуляции пшеницы различных сортов местными изолятами *P. nodorum*
Fig. 5. The degree of increase of SNB during inoculation of three wheat varieties with local *P. nodorum* isolates

этот показатель, рассчитанный для остальных исследуемых изолятов. Таким образом, изоляты *P. nodorum* ТС и Н9 в дальнейшем могут быть использованы для скрининга устойчивости к септориозу широкого спектра генотипов пшеницы, выращиваемых в Кировской области.

Заключение

Итак, в результате проведённых исследований предложена модификация методики выделения грибов-возбудителей септориоза пшеницы с применением ПЦР-анализа, доступная для использования ввиду наличия коммерческих тест-систем. Выявлено, что местные изоляты фитопатогенного гриба *P. nodorum* имеют преимущественно однородный светлый морфотип колоний, быстрорастущих на КГА. Выделенные высокопатогенные изоляты *P. nodorum* ТС и Н9 рекомендованы для скрининга исходного материала яровой мягкой пшеницы в условиях Кировской области при ведении селекции на устойчивость к септориозу, которая служит эффективным и экологически безопасным подходом для борьбы с заболеванием. Дальнейшие исследования будут сосредоточены на мониторинге динамики изменения видового состава грибов, входящих в патоккомплекс поражённых септориозом растений пшеницы в регионе, а также пополнении коллекции местных изолятов возбудителей септориоза штаммами *Z. tritici* и *P. avenae*.

References

1. Toropova E.Yu., Kazakova O.A., Piskarev V.V. *Septoria* blotch epidemic process on spring wheat varieties // Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2020. V. 24. No. 2. P. 139–148. doi: 10.18699/VJ20.609
2. Zeleneva Y.V., Afanasenko O.S., Soodnikova V.P. Influence of agroclimatic conditions, life form and host species on the species complex of wheat *Septoria* pathogens // Povolzhskiy J. of Ecology. 2020. No. 2. P. 177–190 (in Russian). doi: 10.35885/1684-7318-2020-2-177-190
3. Orlovskaya O.A., Vakula S.I., Khotyleva L.V. Study of bread wheat lines with genetic material of *Triticum* species for resistance to fungal diseases // Agricultural Biology. 2021. V. 56. No. 1. P. 171–182 (in Russian). doi: 10.15389/agrobiol.2021.1.171eng
4. Bakulina A.V., Kharina A.V., Shirokikh A.A. *Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum* blotch of wheat: genetic control of host resistance (review) // Theoretical and Applied Ecology. 2020. No. 2. P. 26–35 (in Russian). doi: 10.25750/1995-4301-2020-2-026-035
5. Pakholkova E.V., Sal'nikova N.N., Akimova E.A., Sanina A.A. Features of the spread of pathogens *Septoria* on wheat crops in the Russian Federation // Current Mycology in Russia: Manual of proceedings. V. 5. Moskva, 2015. P. 107–108 (in Russian).
6. Sanina A.A., Antziferova L.V. Isolation and storage methods of *Septoria* pathogens on the wheat // Mikologiya i Fitopatologiya. 1989. V. 23. No. 2. P. 172–175 (in Russian).
7. Satton D., Fotergill A., Rhinaldi M. Key pathogenic and conditionally pathogenic fungi. Moskva: Mir, 2001. 486 p. (in Russian).
8. Pakholkova E.V. *Septoria* of grain crops in various regions of the Russian Federation: Abstract of the dissertation for the degree of candidate of biological sciences. Bolshie Vyazemy, 2003. 28 p. (in Russian).
9. Zeleneva Y.V., Sudnikova V.P., Kashkovsky A.A. Study of culturally-morphological characteristics of fungi of genus *Septoria* on territory of CBR growing on potato-glucose culture medium // Tambov University Reports. Series: Natural and Technical Sciences. 2012. No. 17 (1). P. 384–389 (in Russian).
10. Kolomiets T.M., Pakholkova E.V., Pankratova L.F., Skatenok O.O. The role of genetic collections in the breeding of spring wheat for immunity to *Septoria* // Modern Science Success. 2017. V. 2. No. 9. P. 130–137 (in Russian).
11. Pakholkova E.V., Sal'nikova N.N., Kurkova N.A. Genetic structure of regional populations of *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*), the *Septoria* leaf blotch agent of wheat // Agricultural Biology. 2016. V. 51. No. 5. P. 155–160 (in Russian).
12. Hogenson R.O., Hosford R.M. Sexual reproduction in *Leptosphaeria avenaria* f. sp. *triticea* induced by wave lengths of light greater than 560 mμ // Mycologia. 1971. V. 63. No. 5. P. 958–963. doi: 10.1080/00275514.1971.12019190
13. Shaner G., Finney R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat // Phytopathology. 1977. V. 67. No. 8. P. 1051–1056.
14. Lakin G.F. Biometrics. Moskva: Vysshaya shkola, 1990. 352 p. (in Russian).