

РАЗНООБРАЗИЕ И ПАТОГЕННОСТЬ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*, ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ В МИКОБИОТЕ СОИ*

О.П. Гаврилова, А.С. Орина, Т.Ю. Гагкаева, кандидаты биологических наук

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений,
196608, Санкт-Петербург, ш. Подбельского, 3
E-mail: t.gagkaeva@mail.ru

Исследования проводили с целью уточнения видового состава грибов *Fusarium*, встречающихся в микобиоте сои из различных регионов РФ, а также характеристики их физиолого-биохимических свойств. Выявление таксономического статуса 21 штамма грибов, выделенных в 2006–2021 гг. из семян (7 шт.), стеблей (10 шт.) и корней (4 шт.) образцов сои различного географического происхождения (Амурская обл. – 7 шт., Краснодарский край – 5 шт., Воронежская, Курская, Тамбовская обл., Приморский край – по 2 шт., Рязанская обл. – 1 шт.), проводили методом филогенетического анализа нуклеотидных последовательностей гена фактора элонгации трансляции EF-1 α . Идентифицированы пять видов грибов: *F. oxysporum* (11 штаммов), *F. equiseti* (4), *F. proliferatum* (3), *F. solani* (2), а также *F. commune* (1 штамм), впервые выявленный в микобиоте сои на территории РФ. При культивировании на картофельно-сахарозной агаризованной среде оптимальным температурным диапазоном роста всех штаммов оказался 25...30 °C. Наибольший диаметр колоний в таких условиях выявлен у штаммов *F. equiseti* и *F. commune* – в среднем 68,5...74,0 мм, наименьший – у штаммов *F. solani* (49,5...55,8 мм). Наиболее агрессивными были три штамма *F. oxysporum* и штамм *F. commune*, выделенные из стеблей сои, которые вызвали значительные некрозы листьев у сорта Изидор длиной в среднем 16,7...21,7 мм, у сорта Селекта 201 – 10,7...23,3 мм. В то же время большинство проанализированных грибов *Fusarium* (52...67 % в зависимости от сорта сои) были непатогенными. Отмечена высокая внутривидовая вариабельность патогенности среди штаммов *F. oxysporum* и *F. proliferatum*.

DIVERSITY AND PATHOGENICITY OF THE *FUSARIUM* FUNGI OCCURRED IN SOYBEAN MYCOBIOTA

O.P. Gavrilova, A.S. Orina, T.Yu. Gagkaeva

All-Russian Institute of Plant Protection,
196608, Sankt-Petersburg, sh. Podbelskogo, 3
E-mail: t.gagkaeva@mail.ru

The aim of present study was to reveal the species composition of *Fusarium* fungi found in the soybean mycobiota from the various origins of Russia, as well as to characterize physiological and biochemical properties of isolates. Identification of the taxonomic status of 21 *Fusarium* strains isolated from seeds, stems and roots of soybeans was clarified according to data using phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of the gene of translation elongation factor 1 α . Five fungal species have been identified: *F. oxysporum* (11 strains), *F. equiseti* (4), *F. proliferatum* (3), *F. solani* (2), as well one strain of *F. commune*, which was identified for the first time in soybean mycobiota in Russia. The morphological and cultural characteristics of the isolates and their pathogenicity to leaves of two soybean varieties in the laboratory conditions were also analyzed. At the cultivation of *Fusarium* fungi on potato-sucrose agar medium, the optimal temperature range for the growth of all isolates has been established as 25–30 °C, at which the largest colony diameter 68,5–74,0 mm was found in *F. equiseti* and *F. commune* strains, and the smallest colonies (49,5–55,8 mm) was detected in *F. solani* strains. Three *F. oxysporum* strains and one *F. commune* strain, isolated from the stems, were characterized by high pathogenicity to the leaves of two soybean varieties. These strains caused the necrosis of leaves of the Isidor variety in the range of average length 16,7–21,7 mm, and the necrosis of leaves of the Selecta 201 variety in the range of 10,7–23,3 mm. At the same time, the most of the analyzed *Fusarium* strains (52–67 % depending on the soybean variety) were non-pathogenic. A high intraspecific variability of pathogenicity to soybean leaves was noted among *F. oxysporum* and *F. proliferatum* strains.

Ключевые слова: *Fusarium commune*, соя (*Glycine max*), температурный оптимум, метод листовых сегментов, некроз, хлороз.

Key words: *Fusarium commune*, soybean (*Glycine max*), temperature optimum, detached leaf assay, necrosis, chlorosis.

Соя – важная сельскохозяйственная культура, традиционно выращиваемая во многих регионах мира. Увеличение потребности в продуктах питания, а также в кормах на основе сои, привело к росту посевных площадей этой культуры в РФ за десять лет в 2,5...3,5 раза, или до 3380 тыс. га в 2022 г. [1]. В связи с этим необходимо расширение генетического разнообразия сортов, адаптированных к регионам выращивания, характеризующихся высокой продуктивностью и устойчивостью к абиотическим и биотическим факторам среды. К одной из проблем возделывания сои относят её восприимчивость к заболеваниям грибной этиологии, из-за которой потенциальные потери урожая в зависимости от вида патогена, времени заражения, сорта и условий окружающей среды могут быть значительными [2].

Фузариозы сои могут вызывать различные грибы *Fusarium*, заболевания проявляются в виде корневой

гнили, увядания, некротических и хлоротичных пятнистостей листьев и стеблей, инфицирования семян. Интенсивные исследования видового состава грибов *Fusarium* в различных регионах возделывания сои позволили идентифицировать около 20 видов, из которых наиболее часто выявляют *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. oxysporum* Schltdl., *F. acuminatum* Ellis & Everhart, *F. equiseti* (Corda) Saccardo, *F. graminearum* Schwabe, *F. avenaceum* (Fries) Sacc., *F. sporotrichioides* Sherb., *F. tricinctum* (Corda) Sacc. [3, 4, 5]. Анализ заражённости образцов сои, выращенной в разных регионах РФ, также выявил значительное разнообразие грибов *Fusarium*, ассоциированных с семенами, корнями и вегетирующими частями растения [6].

Идентификацию грибов *Fusarium* до видового уровня традиционно проводят путем анализа их микроморфологических и культуральных характеристик [7].

* работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 19–76–30005).

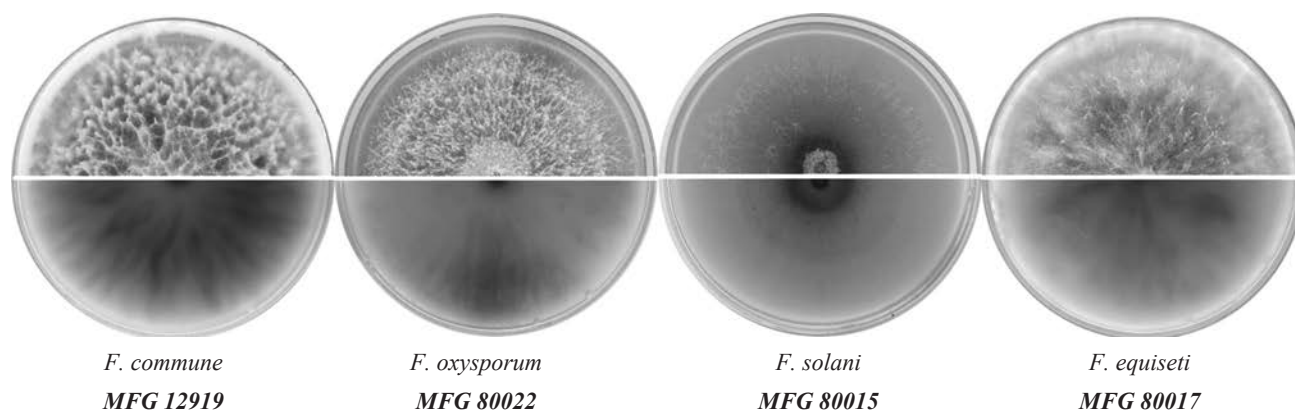


Рис. 1. Фенотипическое разнообразие грибов рода *Fusarium*, выделенных из сои (КСА, 25 °С, 12 суток, в темноте). Верхняя часть круга – поверхность, нижняя – реверс культуры гриба; в подписи указаны вид гриба и коллекционный номер штамма.

По морфолого-культуральным признакам многие фузариевые грибы можно уверенно определить только до уровня комплекса видов *Fusarium*, а точное установление таксономического статуса штаммов требует применения молекулярно-генетических методов, основанных на анализе нуклеотидных последовательностей филогенетически информативных участков генома [8, 9]. На сегодняшний день корректно идентифицировать виды *Fusarium* позволяет только сочетание морфологического описания и филогенетического анализа [9].

Одним из основных препятствий для эффективной борьбы с болезнями сои, вызываемыми видами *Fusarium*, считают отсутствие информации о видовом разнообразии и вредоносности этих грибов, а также устойчивости возделываемых сортов [2].

Цель исследования – уточнение видового состава грибов *Fusarium*, встречающихся в микобиоте сои из различных регионов РФ, а также характеристика их физиолого-биохимических свойств.

Методика. В исследования включили 21 штамм грибов *Fusarium*, выделенных в период 2006–2021 гг. из семян (7 шт.), стеблей (10 шт.) и корней (4 шт.) образцов сои различного географического происхождения, собранных в Амурской области (7 шт.), Краснодарском крае (5 шт.), Воронежской, Курской, Тамбовской областях, Приморском крае (по 2 шт.), Рязанской области (1 шт.). Все штаммы хранятся в коллекции лаборатории микологии и фитопатологии Всероссийского научно-исследовательского института защиты растений. Предварительно, по морфологическим признакам, их идентифицировали как представители четырёх комплексов видов *Fusarium*: *F. fujikuroi*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. oxysporum* и *F. solani* (рис. 1).

Штаммы выращивали на картофельно-сахарозной агаризованной среде (КСА) в течение 7...10 суток. Выделение ДНК осуществляли из 10...50 мг мицелия грибов, собранного с поверхности выращенных колоний, по адаптированной методике с использованием 2 %-ного раствора цетилтриметиламмоний бромидом и хлороформа [9].

Уточнение таксономического статуса грибов проводили путем секвенирования участка гена фактора элонгации трансляции EF-1 α [9]. Нуклеотидные последовательности фрагментов определяли с использованием секвенатора ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, Япония) и набора реактивов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), проверяли с помощью инструмента BLAST на сходство с депонированными в базе данных NCBI GenBank, из которой были

выбраны 16 референсных последовательностей. Филогенетические отношения между таксонами оценивали методами максимального правдоподобия и максимальной экономии с использованием программы MEGA X 10.1. Достоверность топологии филогенетических деревьев определяли посредством бутстрэп-анализа (1000 повторений). Полученные нуклеотидные последовательности были размещены в базе данных NCBI GenBank (OK626390, OR778746 – OR778760).

Температурный оптимум роста штаммов определяли, культивируя их в темноте на КСА в диапазоне от 10 °С до 40 °С с шагом 5 °С. Из колоний грибов микробиологическим сверлом вырезали диски диаметром 4 мм и помещали мицелием вниз на поверхность питательной среды в центр чашки Петри. Эксперимент проводили в двукратной повторности. Через пять суток измеряли диаметр каждой колонии в двух перпендикулярных направлениях и рассчитывали среднее значение.

Оценку патогенности штаммов осуществляли в лабораторных условиях при инокуляции листьев сои сортов Изидор и Селекта 201. Растения выращивали в почве в течение 2 недель. Затем листья разрезали на сегменты и раскладывали абаксальной стороной вверх в кювету на фильтровальную бумагу, увлажненную стерильной водой. Каждый листовой сегмент прокалывали препаровальной иглой и на место повреждения помещали диск диаметром 5 мм, вырезанный из культуры гриба. В контрольных вариантах раскладывали диски чистой КСА. Кюветы инкубировали при 22...24 °С и естественном освещении в течение 7 суток. Каждым штаммом инокулировали не менее 6 сегментов листьев. Патогенность штаммов оценивали по вызываемым некрозам (длина 0...5 мм – непатогенные; 6...10 мм – относительно агрессивные; более 10 мм – высокоагрессивные) и хлорозам (балл поражения 0 – нет симптома; 1 – слабый; 2 – средний; 3 – сильный) листьев сои.

Расчет средних значений показателей, их доверительных интервалов при уровне значимости 95 %, а также коэффициентов корреляции проводили с использованием статистических методов в программах Microsoft Excel 2010 и Statistica 10.0.

Результаты и обсуждение. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей позволил установить принадлежность штаммов к пяти комплексам видов: *Fusarium oxysporum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. fujikuroi*, *F. solani* и *F. nivikadoi* (рис. 2). Таким образом, подтверждена идентификация 11 штаммов *F. oxysporum*, 4 – *F. equiseti*, 3 – *F. proliferatum* и 2 – *F. solani*. Частая встречаемость этих фузариевых грибов в семенах

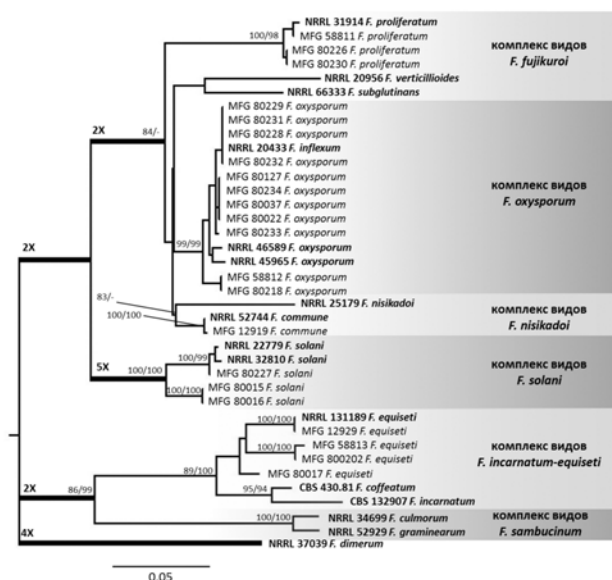


Рис. 2. Дендрограмма филогенетического сходства *Fusarium* spp., построенная на основе последовательностей фрагмента гена фактора элонгации трансляции EF-1α методом максимального правдоподобия. В узлах приведены значения бутстреп-поддержки (> 70 %) при анализе методами максимального правдоподобия и максимальной экономии. В качестве внешней группы использован штамм NRRL 37039 *F. dimerum*.

[2, 4, 10], а также в качестве возбудителей корневой гнили [5, 11, 12] ранее неоднократно продемонстрирована.

Штамм MFG 12919, предварительно идентифицированный как *F. oxysporum* и выделенный из стебля сои из Приморского края, кластеризовался совместно с группой штаммов вида *F. commune*, относящегося к комплексу видов *F. nissikadoi* [13]. Это первая находка *F. commune* на сое в РФ. Морфолого-культуральные признаки *F. commune* сходны с *F. oxysporum*, поэтому зачастую его определяют как представителя комплекса видов *Fusarium oxysporum* [14]. Ранее на территории РФ *F. commune* выявляли в микобиоте лиственницы из Красноярского края [15] и картофеля из Московской области [16]. В составе комплекса возбудителей корневой гнили сои вид *F. commune* был идентифицирован в США [17], Канаде [5], Китае [12], Южной Корее [18]. По всей видимости, *F. commune* – широко распространённый на разных растениях патоген.

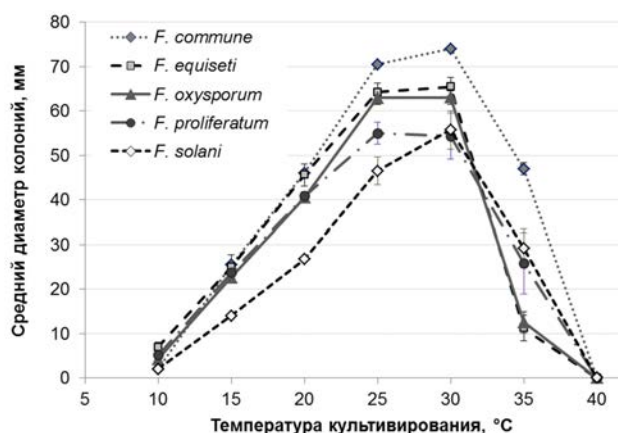


Рис. 3. Влияние температуры культивирования на рост штаммов грибов *Fusarium*, выделенных из сои (КСА, 5 суток, в темноте).

Оптимальной температурой роста штаммов *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* был диапазон 25...30 °C, тогда как у штаммов *F. solani* и *F. commune* отмечен достоверный пик роста при 30 °C (рис. 3). Такой диапазон температур считают оптимальным для роста большинства видов грибов рода *Fusarium* [7]. При 35 °C штаммы *F. equiseti* и *F. oxysporum* демонстрировали слабый рост, диаметр их колоний уменьшился на 75...78 % от средней величины этого показателя при оптимальных температурах. В то же время штаммы других видов, особенно *F. commune*, проявили относительную толерантность к такой высокой температуре. Критической температурой, при которой рост штаммов всех видов прекращался, была 40 °C.

Условия возделывания сои влияют на видовой состав патогенов, их реакцию взаимодействия с растением и, в итоге, на урожайность [2]. Выявленный широкий диапазон температур (10...35 °C) роста всех проанализированных штаммов указывает на экологическую пластичность грибов в отношении этого фактора среды и, как следствие, возможный значительный ареал их распространения.

Анализ патогенности штаммов *Fusarium* выявил их различия по способности вызывать некрозы и хлорозы листьев сои (рис. 4). Доля штаммов *Fusarium* непатогенных для сои сортов Изидор и Селекта 201 составила 52 % и 67 % соответственно. Наиболее агрессивными, вызывающими некрозы листьев длиной 13,3...23,3 мм, оказались штаммы *F. oxysporum* MFG 80037 и MFG 80022, а также *F. commune* MFG 12919, выделенные из стеблей сои, выращенной в Приморском крае и Амурской области. Инокуляция листьев сортов Изидор и Селекта 201 анализируемыми штаммами только в 10 % и 19 % случаев соответственно приводила к появлению заметных хлорозов, из которых самые обширные индуцировали штаммы *F. commune* MFG 12919 (2 балла, сорт Изидор), *F. equiseti* MFG 80017 (2,7 балла, сорт Селекта 201) и *F. oxysporum* MFG 80037 (2,3 балла, сорт Селекта 201). Коэффициент корреляции между размерами некрозов листьев двух сортов сои, вызываемых штаммами, был равен 0,92 (при $p < 0,001$), а связь между выявленными хлорозами листьев оказалась слабее – 0,51 (при $p = 0,019$).

Среди 11 штаммов *F. oxysporum*, включенных в исследование, 6 штаммов оказались непатогенными, а 5 штаммов продемонстрировали относительную и высокую агрессивность. Полученные результаты согласуются с данными других авторов, которые отмечали значительную вариабельность патогенности среди штаммов *F. oxysporum* [11, 18]. В нашем исследовании штамм *F. commune* MFG 12919 оказался высоко агрессивным в отношении листьев сои. Ранее также было показано, что инокуляция растений сои изолятами *F. commune* приводила к некротическим повреждениям семядолей и проростков [5, 17, 18].

Штаммы *F. equiseti* и *F. solani*, выделенные из растительной ткани с симптомами поражения, продемонстрировали низкую агрессивность. Из трёх проанализированных штаммов *F. proliferatum* только один, выделенный из семян сои, выращенной в Краснодарском крае, вызывал заметные некрозы листьев, тогда как остальные были непатогенными. Ранее сообщали о высокой агрессивности штаммов *F. proliferatum* к проросткам сои [19], а также других штаммов, относящихся к комплексу видов *F. fujikuroi*, в том числе *F. proliferatum*, по сравнению со штаммами комплекса видов *F. incarnatum-equiseti*, в отношении бобов, семян и корней сои [4].

Патогенность грибов – физиолого-биохимический признак, который реализуется при участии многих

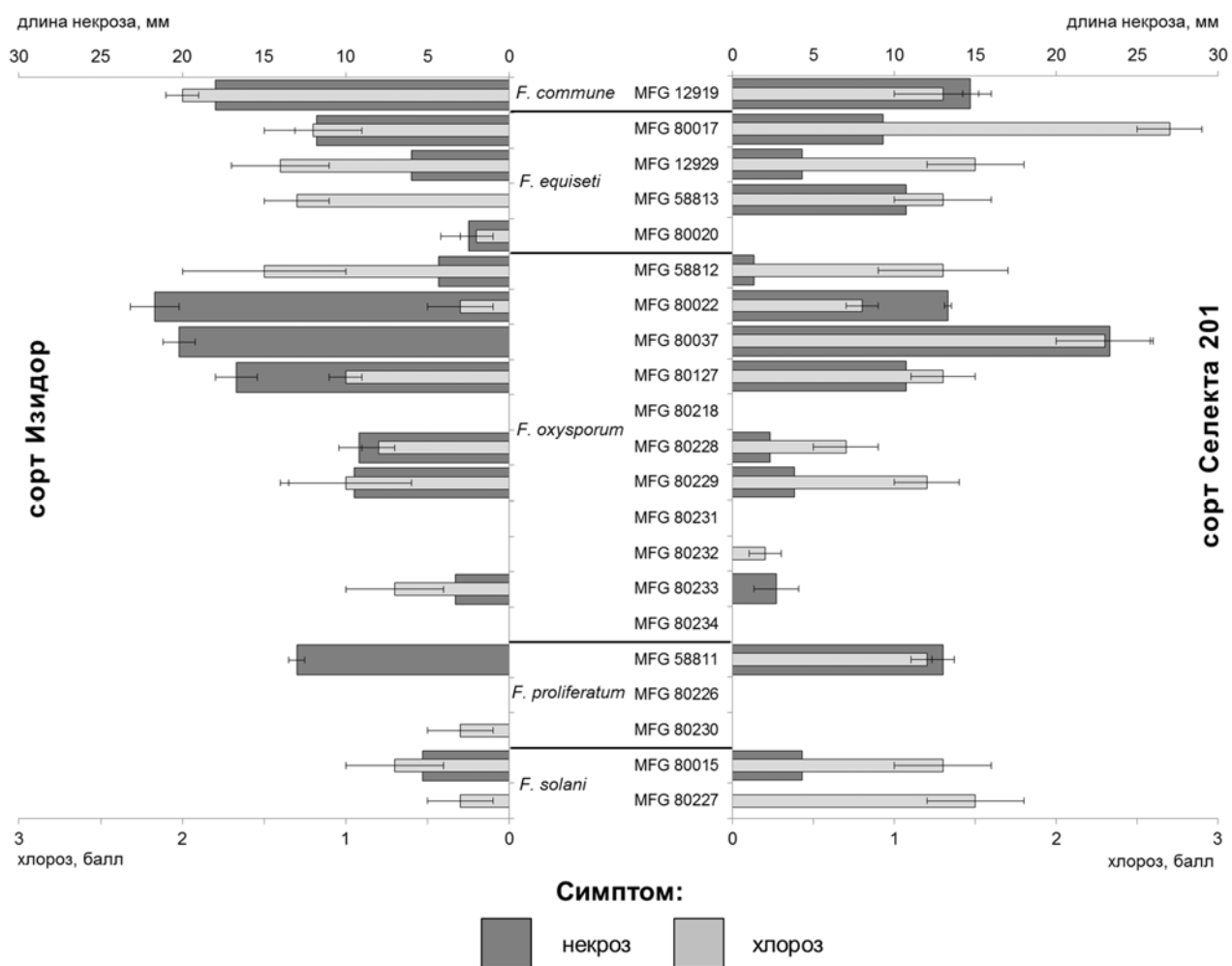


Рис. 4. Симптомы некроза и хлороза листьев сои сортов Изидор и Селекта 201, вызываемые штаммами грибов *Fusarium* (отрезками указаны доверительные интервалы средних значений при уровне значимости 95 %).

факторов, в частности образующихся ферментов, низкомолекулярных специфических и неспецифических соединений, по отношению к растению. Фитотоксины грибов *Fusarium* способны распространяться от корней к листьям, индуцировать образование активных форм кислорода клетками растения в ответ на внедрение патогена, приводя к образованию хлорозов и некрозов у восприимчивых сортов [20, 21]. Так, широко известное вредоносное заболевание «синдром внезапной гибели сои» вызывают грибы комплекса видов *F. solani*, продуцирующие фитотоксины, в том числе цитринин, фузарионовую кислоту и радицикол [21, 22].

Известно, что бесклеточные фильтраты из культур *F. solani*, выращенных при 15, 20, 25 °C, вызывали достоверно более сильные хлорозы и некрозы листьев сои, чем штаммы, выращенные при 30 °C [23]. В наших экспериментах по оценке патогенности грибов (при 22...24 °C) отмечена частая несогласованность проявления количественных признаков заболевания при инокуляции листьев двух сортов. Достоверные различия между сортами сои при их инокуляции фузариевыми грибами, как в проявлении симптомов – некрозов и/или хлорозов листьев, так и в количественном их выражении, демонстрируют возможность успешного применения этой методики для лабораторного скрининга устойчивости сортов этой зернобобовой культуры.

Информация о точной идентификации грибов *Fusarium*, встречающихся в посевах сои, а также выявление факторов среды, влияющих на распространение отдельных видов, их взаимодействие с растением-хозяином и другими участниками инфекционного процесса – основа разработки актуальных методов защиты этой культуры.

Выводы. В результате исследований с использованием метода филогенетического анализа элонгации транскрипции EF-1α уточнена видовая принадлежность грибов *Fusarium*, выделенных из сои различного происхождения, трудно идентифицируемых по морфологическим характеристикам – *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum*, *F. solani* и *F. commune*. В лабораторных экспериментах выявлены оптимальные температуры роста штаммов (25...30 °C) и установлена высокая патогенность к сое штаммов *F. oxysporum* и *F. commune*.

Литература

1. Экспертно-аналитический центр агробизнеса. URL : <https://ab-centre.ru/news/soya-ploschadi-sbory-i-urozhaynost-v-2001-2019-gg> (дата обращения : 02.11.2022).
2. Characterization and pathogenicity of *Fusarium* species associated with soybean pods in maize/soybean strip

- intercropping / M. Naeem, H. Li, L. Yan, et al. // *Pathogens*. 2019. Vol. 8. Article. 245. URL : <https://www.mdpi.com/2076-0817/8/4/245> (дата обращения : 22.03.2023).
3. Characterization of species of *Fusarium* causing root rot of Soybean (*Glycine max* L.) in South Dakota, USA / P. N. Okello, K. Petrovic, A. K. Singh, et al. // *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2020. Vol. 42. P. 560–571.
4. Evaluation of pathogenic *Fusarium* spp. associated with soybean seed (*Glycine max*) in Hubei province, China / L. Zhao, X. Wei, T. Zheng, et al. // *Plant Disease*. 2022. Vol. 106. P. 3178–3186.
5. Genetic diversity and aggressiveness of *Fusarium* species isolated from soybean in Alberta, Canada / Q. Zhou, N. Li, Chang K.-F., et al. // *Crop Protection*. 2018. Vol. 105. P. 49–58.
6. Действие фунгицидов на рост патогенов сои из рода *Fusarium* / А. С. Орина, Н. П. Шпилова, Е. Л. Гасич и др. // *Защита и карантин растений*. 2019. № 3. С. 17–19.
7. Leslie J. F., Summerell B. A. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing : Ames, IA, USA, 2006. 388 p.
8. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana : concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies / K. O'Donnell, H. C. Kistler, E. Cigelnik, et al. // *PNAS*. 1998. Vol. 95. P. 2044–2049.
9. DNA sequence-based identification of *Fusarium* : a work in progress / K. O'Donnell, B. K. Whitaker, I. Laraba, et al. // *Plant Disease*. 2022. Vol. 106. P. 1597–1609.
10. Natural deoxynivalenol occurrence and genotype and chemotype determination of a field population of the *Fusarium graminearum* complex associated with soybean in Argentina / G. Barros, M. S. Alaniz Zanon, A. Abod, et al. // *Food Additives and Contaminants : Part A*. 2012. Vol. 29. P. 293–303.
11. Diaz Arias M. M., Leandro L. F., Munkvold G. P. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybeans // *Phytopathology*. 2013. Vol. 103. P. 822–832.
12. Identification of *Fusarium* species associated with soybean root rot in Sichuan Province, China / X. Chang, H. Dai, D. Wang, et al. // *European Journal of Plant Pathology*. 2018. Vol. 151. P. 563–577.
13. One Fungus, One Name : Defining the genus *Fusarium* in a scientifically robust way that preserves longstanding use / D. M. Geiser, T. Aoki, Ch. W. Bacon, et al. // *Phytopathology*. 2013. Vol. 103. P. 400–408.
14. *Fusarium commune* is a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data / K. Skovgaard, S. Rosendahl, K. O'Donnell, et al. // *Mycologia*. 2003. Vol. 95. P. 630–636.
15. Phylogenetic analysis and molecular typing of trichothecene-producing *Fusarium* fungi from Russian collections / A. A. Stakheev, L. V. Samokhvalova, O. D. Mikityuk, et al. // *Acta Naturae*. 2018. Vol. 10. No. 2. P. 79–92.
16. Грибы рода *Fusarium* на клубнях картофеля / А. Ф. Белосохов, М. М. Ярмеева, А. М. Долгов и др. // *Современная микология в России*. 2022. Т. 9. С. 250–252.
17. First report of *Fusarium commune* causing root rot of soybean seedlings in Indiana / C. Detranaltes, M. Saldanha, S. Scofield, et al. // *Plant Disease*. 2022. Vol. 106. Article 3216. URL : <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-22-0870-PDN> (дата обращения : 22.03.2023).
18. Choi H.-W., Kim S., Hong S. K. Diversity and pathogenic characteristics of *Fusarium* species isolated from wilted soybeans in Korea // *The Korean Journal of Mycology*. 2020. Vol. 48. P. 297–312.
19. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot in soybean (*Glycine max* L.) in Canada / K. F. Chang, S. F. Hwang, R. L. Conner, et al. // *Crop Protection*. 2015. Vol. 67. P. 52–58.
20. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid : toxic and signaling effects / B. Bouizgarne, H. El-Maarouf-Bouteau, C. Frankart, et al. // *New Phytologist*. 2006. Vol. 169. P. 209–218.
21. Hartman G. L., Huang Y. H., Li S. Phytotoxicity of *Fusarium solani* culture filtrates from soybeans and other hosts assayed by stem cuttings // *Australasian Plant Pathology*. 2004. Vol. 33. P. 9–15.
22. Identification of multiple phytotoxins produced by *Fusarium virguliforme* including a phytotoxic effector (FvNIS1) associated with sudden death syndrome foliar symptoms / H. X. Chang, L. L. Domier, O. Radwan, et al. // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2016. Vol. 29. No. 2. P. 96–108.
23. Hartman G. L., Chang H.-X., Leandro L. F. Research advances and management of soybean sudden death syndrome // *Crop Protection*. 2015. Vol. 73. P. 60–66.

Поступила в редакцию 10.02.2023

После доработки 22.03.2023

Принята к публикации 18.04.2023