

**PHENOTYPIC VARIABILITY AND SPREAD OF LUPINE
ANTHRACNOSE IN BELARUS**
Yu. A. Dashkevich, E. V. Zarembo

The article presents the results of route surveys of lupine conducted in Belarus for establishing the spread of the disease and identifying morphological types of anthracnose pathogen colonies.

УДК 633.63:632.21.4

**АКТУАЛИЗАЦИЯ ВИДОВОГО СОСТАВА ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
БОЛЕЗНЕЙ ЛИСТОВОГО АППАРАТА САХАРНОЙ СВЕКЛЫ
НА ОСНОВАНИИ ДАННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-
ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

С.В. Майсеня, Л.В. Можаровская¹

РУП «Опытная научная станция по сахарной свекле»,

e-mail: majsenya@bk.ru

¹ГУ «Институт леса НАН Беларуси», e-mail: milamozh@yandex.by

Основным лимитирующим фактором урожайности и качества сахарной свеклы являются болезни инфекционной природы. При этом доминирующая роль принадлежит грибным заболеваниям, вызываемым широким видовым спектром патогенных микромицетов. Одним из наиболее вредоносных заболеваний является поражение листового аппарата сахарной свеклы во время вегетации и вызывается такими возбудителями как: *Cercospora beticola* (болезнь – церкоспороз), *Ramularia beticola* (рамуляриоз), *Phoma betae* (фомоз), *Erysiphe betae* (мучнистая роса), *Peronospora schachtii* (пероноспороз), *Uromyces betae* (ржавчина). Данные болезни приводят к нарушению всех физиологических процессов, протекающих в растениях. Активность транспирации пораженного листового аппарата увеличивается в пять раз, в 10 раз снижается ассимиляция углекислого газа и нарушается азотистый обмен. Массовое отмирание листьев приводит к снижению прироста корнеплодов и уменьшает выход сахара на 20-50 %. Воздействие патогена ухудшает технологические показатели сырья, увеличивает содержание небелкового азота, токсичного для человека и снижает содержание доброкачественного сока. Для корнеплодов пораженных растений наблюдается снижение лежкости и при хранении отмечается развитие комплексов возбудителей кагатной гнили. Успех борьбы с возбудителями зависит от отбора, создания и использования устойчивых линий и гибридов сахарной свеклы. Основное внимание в решении вопроса повышения устойчивости, при сохранении показателей

продуктивности сахарной свеклы уделяется селекционно-генетическим и молекулярным методам [1-4].

Целью настоящего исследования была актуализация видового состава основных возбудителей болезней листового аппарата сахарной свеклы в исследуемый период.

Объектом исследований явились мужскостерильные формы, закрепители стерильности, многосемянные опылители, межвидовые гибриды, гибриды сахарной свеклы, а также чистые культуры 20 изолятов фитопатогенных грибных видов – возбудителей доминирующих инфекционных заболеваний листового аппарата сахарной свеклы (*Phoma betae* A. B. Frank, *Erysiphe betae* (Vanha) Weltzien, *Cercospora beticola* Sacc., *Ramularia beticola* Moesz et Smar, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Alternaria brassicae* (Berk) Sacc., *Ascochyta betae* Prill. et Del. (*Neocamarosporium calvescens* (Fr. ex Desm.) Ariyaw. & K.D. Hyde), *Peronospora schachtii* Fckl.), предоставленные Институтом микробиологии НАН Беларуси.

При проведении молекулярно-генетического анализа в качестве ДНК-маркера выбран участок оперона рДНК 18S-ITS1-5,8-ITS2-28S. Выбор данного маркера основан на широкой изученности рибосомального оперона грибов, высокой степени полиморфности и видоспецифичности [5].

Для исследуемых чистых культур фитопатогенов был проведен молекулярно-генетический анализ с целью установления нуклеотидной последовательности локуса рДНК (18S-ITS1-5,8-ITS2-28S) и разработки набора молекулярно-генетических маркеров для их идентификации. Верификацию разработанного набора молекулярно-генетических маркеров проводили с использованием онлайн ресурса NCBI BLAST.

На основании проведенного ПЦР-анализа и последующего секвенирования локусов рДНК доминирующих видов фитопатогенов были рассчитаны точные размеры амплифицируемых локусов рДНК. В ходе изучения нуклеотидной структуры изолятов микромицетов было установлено, что размер рДНК-маркера является величиной видоспецифичной и постоянной внутри вида. Данная особенность рДНК-маркера позволила использовать данный признак – размер амплифицируемых локусов, как диагностический критерий при проведении видовой идентификации. Для выявления видоспецифичных ДНК-маркеров могут быть использованы следующие сочетания праймеров: 1) ITS1F-ITS4 (фрагмент 18S рДНК, ITS1, 5,8S рДНК, ITS2, фрагмент 28 S рДНК); 2) ITS1F-ITS2 (фрагмент 18S рДНК, ITS1, фрагмент 5,8S рДНК); 3) ITS3-ITS4 (фрагмент 5,8S рДНК, ITS2, фрагмент 28S рДНК). Рассчитанные на основании результатов секвенирования раз-

меры ампликонов для изученных доминирующих видов фитопатогенов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Размеры ампликонов при проведении электрофоретического анализа маркерных локусов фитопатогенных грибных видов, вызывающих болезни листового аппарата сахарной свеклы

Вид	ITS1F-ITS4	ITS1F-ITS2	ITS3-ITS4
<i>Phoma betae</i>	621	304	337
<i>Erysiphe betae</i>	686	339	367
<i>Cercospora beticola</i>	574	263	331
<i>Ramularia beticola</i>	567	259	328
<i>Alternaria alternata</i>	608	282	346
<i>Alternaria brassicae</i>	607	283	344
<i>Ramularia beticola</i>	567	259	328
<i>Neocamarosporium calvescens</i>	643	323	340
<i>Peronospora schachtii</i>	923	334	609

Одним из методов, позволяющим выявлять различия в нуклеотидном составе сравниваемых образцов ДНК, является рестрикционный анализ. На основании результатов секвенирования локусов рДНК доминирующих видов фитопатогенов с использованием программного обеспечения NEBCutter 2.0, были смоделированы рестрикционные спектры рДНК-маркера видов фитопатогенов, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Рестрикционные спектры фитопатогенных грибных видов, вызывающих болезни листового аппарата сахарной свеклы

Вид	Рестриктаза, электрофоретический спектр (в п.н.)		
	MspI	TaqI	AluI
<i>Phoma betae</i>	30, 138, 453	53, 59, 221, 288	198, 423
<i>Erysiphe betae</i>	46, 156, 159, 325	51, 53, 80, 115, 128, 200	191, 227, 268
<i>Cercospora beticola</i>	144, 161, 269	53, 56, 59, 89, 102, 215	136, 438
<i>Ramularia beticola</i>	55, 85, 427	53, 59, 212, 243	567
<i>Alternaria alternata</i>	141, 467	53, 59, 230, 266	31, 176, 401
<i>Alternaria brassicae</i>	140, 467	53, 59, 96, 171, 228	205, 402
<i>Ramularia beticola</i>	55, 85, 427	53, 59, 212, 243	567
<i>Neocamarosporium calvescens</i>	131, 138, 374	53, 59, 224, 307	128, 201, 314
<i>Peronospora schachtii</i>	218, 301, 403	7, 49, 59, 89, 110, 142, 149, 317	204, 718

Для разработанного набора молекулярно-генетических маркеров фитопатогенных грибных видов, вызывающих болезни листового аппарата сахарной свеклы, были сконструированы праймеры, характеризующиеся наибольшей специфичностью (таблица 3).

Таблица 3 – Нуклеотидные структуры видоспецифических праймеров и размеры ампликонов ДНК-маркеров изученных фитопатогенных грибных видов

Вид	F-праймер	R-праймер	Размер ампликона, п.н.
<i>Phoma betae</i>	CCTCGTGGCTCTACTT CTGC	GCATTTTCGCTGCGT TCTTCA	204
<i>Erysiphe betae</i>	CCCACCCGTGTGCGATT TGTA	TCTGTGCGCGAGAA GCAAGTT	452
<i>Cercospora beticola</i>	CACAACCTTGTTGCTTC GGGG	GAAATGACGCTCG AACAGGC	262
<i>Ramularia beticola</i>	TGAGGGAGAAATCCC GACCT	GAAATGACGCTCG AACAGGC	295
<i>Alternaria alternata</i>	CTCTCGGGGTTACAGC CTTG	ACCAAGCAAAGCT TGAGGGT	319
<i>Alternaria brassicae</i>	ACGACGGCCTTGCTGA ATTA	ACCAAGCAAAGCT TGAGGGT	313
<i>Ramularia beticola</i>	TGAAGAACGCAGCGA AATGC	TCCCTACCTGATCC GAGGTC	285
<i>Neocamarosporium calvescens</i>	CCTTTGCCCATCTGT CTGA	GCATTTTCGCTGCGT TCTTCA	190
<i>Peronospora schachtii</i>	GTTGCTGGTTGTGAAG GCTG	CGCACAGCACAAAT TTCCCAA	260

Использование предложенных методов идентификации фитопатогенных грибных видов (по размеру ампликонов при проведении электрофоретического анализа; рестрикционный анализ; ДНК-маркирование с использованием видоспецифичных праймеров) позволяет напрямую проводить определение грибных видов, вызывающих болезни листового аппарата сахарной свеклы в условиях *in planta*, снижает срок проведения и себестоимость видовой идентификации микромицетов.

Для проведения анализа в полевых условиях создавали искусственный инфекционный фон. Заражение растений проводили в фазу начала

смыкания рядков (в середине лета), так как в данный период создается микроклимат, благоприятный для развития болезней листового аппарата растений сахарной свеклы (температура выше 15 °С при оптимальной влажности выше 90-95 %). Для искусственного заражения опытной культуры использовали собранные с полей прошлогодние листья сахарной свеклы, характеризующиеся симптомами инфицирования, предварительно высушенные и измельченные, методом разбрасывания в рядах. Визуальный учет развития и распространения болезней листового аппарата сахарной свеклы проводили через 1,5 месяца после заражения.

По результатам визуальной оценки селекционных номеров растений сахарной свеклы наблюдалось поражение листового аппарата с симптоматикой, характерной для церкоспороза: многочисленные мелкие пятна округлой формы бурого цвета с ярко-выраженной красно-коричневой каймой. Распространение данного заболевания среди исследуемых групп растений составило 100 %, за исключением номера ММ 663872 с показателем поражения 97,2 %. Развитие церкоспороза находилось в пределах от 33,3 % (FMSG_{r14}22хот636336) до 76 % (Н-2зас).

Для молекулярно-генетической диагностики основных возбудителей болезней листового аппарата растений сахарной свеклы отобрали образцы листовых пластин с различным уровнем поражения, в общем количестве 250 штук. Спектрофотометрический анализ по результатам выделения и создания коллекций препаратов суммарной ДНК инфицированных образцов сахарной свеклы показал, что образцы высечки листовых пластин, содержали более 50 нг суммарной ДНК, соотношение экстинкций A260/A280 находилось в диапазоне 1,80-1,88, что удовлетворяет требованиям, предъявляемым к методике выделения. Молекулярно-генетическую диагностику проводили с использованием разработанного набора молекулярно-генетических маркеров согласно общепринятой методике [5].

Видовая идентификация в базе данных NCBI GenBank установила 100 % гомологию с нуклеотидной последовательностью возбудителя церкоспороза *Cercospora beticola*: спектр депозитов NCBI GenBank MF681169.1 и др. В следовом количестве диагностированы возбудители инфекционных заболеваний листового аппарата сахарной свеклы: *Phoma betae* A. B. Frank, *Ramularia beticola* Moesz et Smar, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.

Литература

1. Корниенко, А.В. Система для создания адаптивных и устойчивых гибридов сахарной свеклы / А.В. Корниенко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – №. 72. – С. 196-202.
2. Путилина, Л.Н. Формирование технологического качества и продуктивности сахарной свеклы в результате действия современных фунгицидов / Л.Н.Путилина, Н.А. Лазутина // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2021. – №. 1. – С. 38-51.
3. Жеряков Е.В. Устойчивость различных гибридов сахарной свеклы к поражению заболеваниями листового аппарата / Е.В. Жеряков, Е.С. Бредучева // Вестник Мичуринского государственного аграрного университета. – 2021. – Т. 2. – №. 65. – С. 20.
4. Stevanato P. Identification and validation of a SNP marker linked to the gene HsBvm-1 for nematode resistance in sugar beet // Plant Molecular Biology Reporter. – 2015. – V. 33. – №. 3. – P. 474-479.
5. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

ACTUALIZATION OF CAUSATIVE AGENTS OF SUGAR BEET LEAVES DISEASES (BASED ON THE MOLECULAR GENETIC DATA ANALYSIS)

S.V. Maysenya, L.V. Mozharovskaya

*Methods of identification of phytopathogenic fungal species causing diseases of sugar beet leaf apparatus are presented. A set of DNA markers and primers for their diagnosis is developed. Under experimental conditions, when creating an artificial infectious background, molecular genetic identification of the main pathogens of the sugar beet leaf apparatus was carried out. It has been established that the dominant phytopathogenic micromycete is the causative agent of cercosporosis *Cercospora beticola* Sacc.*

УДК 633.321:632.95:631.559

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И ХОЗЯЙСТВЕННАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТРАВИТЕЛЯ ТИРАДА, СК ПРИ ОБРАБОТКЕ СЕМЯН КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

**А.А. Боровик, Л.В. Володькина, В.В. Крицкая, Е.И. Чекель,
И.А. Черепок**

РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию»

Протравливание семенного материала является основой для получения здоровых, дружных всходов, так как защищает семена и проростки от многих возбудителей болезней. В строго выверенной норме они положительно влияют на развитие семян и их посевные качества. Под их влиянием растения становятся более устойчивыми к неблагоприятным условиям, засухе, поражению болезнями, вредителями и