На правах рукописи

АКОСАХ ЙАВ АБАЙЕ

FUSARIUM КАК КЛЮЧЕВОЙ ТАКСОН В МИКОБИОТЕ КОРНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

03.02.03 – Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань - 2021

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» на базе НИЛ Микробные биотехнологии

Научный руководитель: **Марданова Айслу Миркасымовна**
доктор биологических наук, доцент кафедры микробиологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) государственный университет»

Официальные оппоненты: **Еланский Сергей Николаевич**
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник кафедры микологии и альгологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова» (г. Москва)

Дегтярева Ирина Александровна
доктор биологических наук, доцент, главный научный сотрудник отдела агроэкологии и микробиологии Татарского НИИАХП – обособленного структурного подразделения ФИЦ КазНЦ РАН (г. Казань)

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования **«Южный Федеральный университет»** (г. Ростов-на Дону)

Защита диссертации состоится «03» июня 2021 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета КФУ.03.07 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, аудитория 211.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»: http://www.kpfu.ru

Автореферат разослан «___» _____2021г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук, доцент Кравцова О.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее изученности

Микроскопические грибы играют огромную роль в росте, развитии и продуктивности растений [Babalola *et al.*, 2020]. Особенно важен вклад грибных сообществ корней, формирование которых зависит от многих факторов: типа и характеристик почвы, вида и сорта растения, методов агротехники, климатических условий и различных стрессовых факторов [Bao *et al.*, 2020; Khondoker *et al.*, 2020]. Процесс сборки корневых микробиомов из почвенных сообществ может приводить к колонизации корней представителями патогенных таксонов, вызывая развитие различных заболеваний и снижение продуктивности или гибель растений [Bukhat *et al.*, 2020].

Фузариозное увядание и сухая гниль клубней, вызываемые микромицетами рода *Fusarium,* являются заболеваниями картофеля (*Solanum tuberosum* L.), распространенными в мире и приводящими к потерям урожая при вегетации и в процессе хранения [Guigón-López, 2019; Rampersad, 2020]. Латентное инфицирование семенных клубней может снизить урожайность растений в следующем вегетационном цикле, за счет угнетения развития ростков картофеля и, как следствие, привести к потере до 25% урожая и инфицированию более 60% клубней при хранении [Tiwari *et al.*, 2020]. Известно, что культивары картофеля различаются устойчивостью к различным фитопатогенам [Rietman *et al.*, 2012], что обуславливает важность селекции устойчивых к фитопатогенам сортов. После засухи 2010 г. в разных регионах России, и в Республике Татарстан, увеличилось распространение фузариоза картофеля [Замалиева с соавт., 2015]. Роль представителей *Fusarium* в развитии фузариозного увядания и сухой гнили картофеля в зарубежных регионах земного шара исследуется активно [Koike and Gordon, 2015; Heltoft *et al.*, 2016; Sandipan *et al.*, 2016]. Однако на территории Российской Федерации, и в Республике Татарстан данных о возбудителях этого заболевания картофеля мало. Также недостаточно изучены механизмы молекулярного ответа растений картофеля на фузариозное инфицирование.

Fusarium spp. широко распространены в почве и входят в состав микробиоты, ассоциированной с корнями многих сельскохозяйственных культур [Heltoft *et al.*, 2016]. В настоящее время внимание исследователей привлечено к бактериальным сообществам ризосферы картофеля [İnceoğlu *et al.*, 2012; Guyer *et al.*, 2015; Pfeiffer *et al.*, 2017], в то время как данные о грибной микробиоте ризосферы картофеля малочисленны [Hannula *et al.*, 2012, 2013; Zimudzi *et al.*, 2018]; практически отсутствуют сведения о микобиоте ризопланы. Изучение грибных сообществ, ассоциированных с разными компартментами корней картофеля, исследование динамики популяции *Fusarium* в этих компартментах необходимо для понимания закономерностей

колонизации картофеля патогенными грибами и разработки стратегии контроля фузариоза.

В связи с этим для выяснения роли разных таксонов грибов, в частности *Fusarium*, в физиологии и патологии картофеля актуальна проблема исследования структуры и закономерностей формирования грибных сообществ корней картофеля. Установление молекулярных механизмов влияния фунгицидов на рост и экспрессию генов гриба *Fusarium* и характеристика штаммов-возбудителей фузариоза картофеля, выращенного на полях РТ, является основой разработки новых стратегий контроля этого фитопатогена и представляет практический интерес для сельского хозяйства.

Цель работы – выявить закономерности формирования микобиоты корней картофеля (*Solanum tuberosum* L.) сорта Жуковский ранний на серых лесных почвах и охарактеризовать взаимодействия патогенных штаммов рода *Fusarium* с растениями картофеля.

Для достижения этой цели решались следующие **задачи:**

1. Провести сравнительный анализ структуры грибной микробиоты корней картофеля сорта Жуковский ранний и оценить популяцию *Fusarium* spp. в ризосфере и ризоплане.
2. Оценить влияние стадии вегетации на микобиоту разных компартментов корней картофеля и установить динамику изменения популяции *Fusarium* spp. в зависимости от стадии роста и севооборота.
3. Выделить изоляты *Fusarium* spp. из ризосферы, корневой шейки и клубней картофеля и провести сравнительный анализ их способности вызывать сухую гниль в клубнях разных сортов.
4. Оценить влияние фунгицидов флудиоксонила и пенконазола на рост колоний *Fusarium oxysporum* и экспрессию генов стерол-14-α-деметилазы (*CYP51A*) и гистидин киназы (*HK1*).
5. Определить изменение уровня экспрессии генов ответа (*PR2, PR3* и *PR9*) картофеля при искусственном заражении изолятами *Fusarium oxysporum*.

Научная новизна

В работе впервые исследованы закономерности формирования и динамики структуры грибной микробиоты разных компартментов корней (ризопланы и ризосферы) картофеля сорта Жуковский ранний при культивировании его на серых лесных почвах, которые являются основным типом почвы в регионах выращивания картофеля в Республике Татарстан. Установлено, что микромицеты рода *Fusarium* являются одной из доминантных групп грибов в микробиоте корней этого сорта картофеля, что коррелирует с высокой чувствительностью клубней к фузариозной сухой гнили. Впервые охарактеризованы изменения в структуре грибных сообществ корней картофеля сорта Жуковский ранний под влиянием различных факторов: сезонные

изменения погоды, стадия роста растений и севооборот. Впервые показано, что фунгициды флудиоксонил и пенканазол вызывают у штаммов *F. oxysporum* сверхэкспрессию генов гистидин киназы (*HK1*) и стерол-14-α-деметилазы (*CYP51A*) соответственно. Установлено, что инфицирование картофеля изолятами *F. oxysporum* приводит к повышению уровня экспрессии генов ответа картофеля *PR2, PR3* и *PR9*, что подтверждает участие продуктов этих генов в защите от фузариозной инфекции.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты будут способствовать более детальному пониманию закономерностей формирования грибных сообществ серых лесных почв и корней картофеля, а также биологии патогенных микромицетов рода *Fusarium* – возбудителей фузариоза картофеля. Результаты метагеномных исследований актуальны для разработки современных биотехнологических стратегий агротехнологии картофеля с целью оптимизации микробных сообществ корней и почвы, использования потенциала симбиотических отношений между микробными сообществами почвы и корней сельскохозяйственных культур. Идентификация генов ответа картофеля на фузариозную инфекцию позволит создать новые тест-системы для диагностики и контроля за безопасностью сельскохозяйственной продукции, а также быть основой для селекции сортов картофеля на устойчивость к болезням и вредителям. Сравнительная характеристика способности изолятов *Fusarium* вызывать сухую гниль в клубнях разных сортов картофеля и, в частности, недавно созданного в РТ сорта Регги, важна для целенаправленной селекции устойчивых сортов. Таким образом, полученные новые данные могут быть использованы для разработки новых стратегий контроля фузариоза картофеля.

Положения, выносимые на защиту:

1. Микромицеты рода *Fusarium* являются одной из доминирующих групп в ризосфере и ризоплане картофеля, доля которых варьирует от 9 до 15% и зависит от стадии вегетации растения, а также от севооборота. Штаммы *Fusarium*, возбудители трахеомикозной инфекции, способны вызывать сухую гниль в клубнях различных сортов картофеля.

2. Ген гистидин киназы (*HK1*) *Fusarium oxysporum* сверхэкспрессируется в присутствии фунгицида флудиоксонила, что может обуславливать резистентность микромицетов. Фунгицид пенконазол индуцирует сверхэкспрессию гена стерол-14-α-деметилазы (*CYP51A*).

3. *Fusarium* spp. вызывают в растениях картофеля повышение экспрессии гена пероксидазы (*PR9*) и, в зависимости от вирулентности, в разной степени повышают экспрессию генов хитиназы IV (*PR3*) и β-1,3-глюканазы (*PR2*).

Степень достоверности подтверждается значительным количеством лабораторных и полевых экспериментов, проведенных с использованием современного высокоточного оборудования и проанализированных с помощью соответствующих программных обеспечений, а также публикацией полученных данных в рецензируемых научных изданиях.

Апробация работы и публикации

По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, из которых 3 в журналах, индексируемых Web of Science и Scopus, 4 – в отечественных журналах, индексируемых в базе РИНЦ и рекомендованных ВАК РФ, 11 тезисов.

Материалы диссертации представлены на II Международной научной конференции «Plants and Microbes: the Future of Biotechnology» (Саратов, 2020); на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2020», (Москва, 2020); на Международной Пущинской Школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2020); на Международном российско-германском семинаре "Interaction: from cell to human (Казань, 2019); на Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», (Москва, 2019); на Международной научной конференции «Plants and Microbes: the Future of Biotechnology» (Уфа, 2018); на III Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и Технологии XXI Века» (Казань, 2018); на 72-ой и 73-ей Всероссийских с международным участием школах-конференциях молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление» (Нижный Новгород, 2019; 2020); на IV Всероссийском съезде по защите растений с международным участием «Фитосанитарные технологии в обеспечении независимости и конкурентоспособности АПК России». (Санкт-Петербург, 2019).

Место выполнения работы и личный вклад соискателя

Работа выполнена на базе НИЛ Микробные биотехнологии в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-исследовательских центров. Полевые эксперименты проведены на опытных полях ФГБНУ «ТатНИИСХ» (Республика Татарстан, Лаишевский р-н, Большекабанское сельское поселение). Исследования проводились при поддержке гранта РФФИ No. 19-316-90028. Личный вклад автора работы заключается в анализе данных отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, разработке основной проблемы исследования, планировании, организации и реализации экспериментов, а также интерпретации полученных результатов.

Объём и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 178 страницах машинописного текста. Работа содержит 25 рисунков и 12 таблиц. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы. Библиография включает 372 источника, среди которых 16 российских и 356 зарубежных источников. Приложение включает данные по метагеномным анализам грибных сообществ (таблицы П1-П4).

Благодарности

Автор выражает благодарность научному руководителю д.б.н., доценту кафедры микробиологии КФУ А.М. Мардановой за душевное руководство и полную поддержку; д.б.н., профессору кафедры микробиологии КФУ М.Р. Шариповой за замечания и важные комментарии при обсуждении работы; заведующему отделом сельскохозяйственной биотехнологии (ТатНИИСХ), к.б.н. З. Сташевски и заведующему лабораторией селекции картофеля, к.б.н., с.н.с. С.Г. Вологину за помощь в проведении полевых экспериментов и предоставлении клубней картофеля разных сортов; аспирантам М.Т. Лутфуллину, Г.Ф. Лутфуллиной и З.С. Костенниковой, магистру П. С. Мишеевой, инженеру Н.К. Мочаловой за помощь в организации экспериментов, м.н.с. Д.С. Пудовой за помощь в биоинформатическом анализе полученных данных; к.б.н., с.н.с. НИЛ Экстремальная биология КФУ Е.И. Шагимардановой и к.б.н. Н.Е. Гоголевой за проведение метагеномного секвенирования образцов; сотрудникам Междисциплинарного центра геномных и протеомных исследований КФУ за секвенирование образцов ДНК. Автор выражает признательность всем сотрудникам кафедры микробиологии и НИЛ Микробные биотехнологии КФУ за полезные советы и благожелательную атмосферу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Отбор проб почвы и корней картофеля для метагеномных исследований

Образцы почвы и корней картофеля сорта Жуковский ранний отбирали с экспериментальных участков полей в трех повторах для каждого варианта севооборота во время цветения (1 июля) и старения растений или созревания клубней (15 сентября) растений картофеля.

Из почвы ДНК выделяли согласно методу, описанному в работе [Chowdhury *et al.,* 2013], с помощью коммерческих наборов FastDNA® SPIN Kit for Soil. ДНК из ризосферы и ризопланы картофеля выделяли по методу, описанному в работе [Edwards *et al.*, 2015]. Проводили амплификацию участков ITS (internal transcribed spacer) с использованием универсальных праймеров к

вариабельным участкам ITS гена 5.8S рРНК ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) [Aktaruzzaman *et al.,* 2014; Kawasaki *et al.,* 2016]. Секвенирование амплификатов осуществляли с использованием прибора MiSeq System (Illumina, США). Анализ данных секвенирования проводили в программе «QIIME2» (версия 2020.2) и USEARCH v8.0.1623 _win32 с использованием базы данных NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov]. После проверки качества и фильтрации данные секвенирования были объединены в операционные таксономические единицы (OTE, заменяющие понятие вида в метагеномных исследованиях) на основе 97% порога сходства. Для определения соответствующих таксонов OTE использовали базу данных UNITE (версия 8.2). Параметры бета- и альфа-разнообразия рассчитывали в программе QIIME2; альфа-разнообразие оценивали с использованием индексов видового богатства (число OTE в образце), индекса Симпсона, Шеннона и Chao1 [Чернов с соавт., 2015; Edwards *et al*., 2018]. Для оценки бета-разнообразия использовали метод анализа главных координат (PcoA) в метрике Bray-Curtis. Статистическую обработку данных проводили с использованием вычислительной среды R версия 3.6.3 и Rstudio v.1.3.959-1, с использованием пакетов phyloseq версия.1.32.0, vegan версия 2.5-6, indicspecies версия.1.7.9 и ggplot2 версия.3.3.2.

Выделение микромицетов рода *Fusarium* из ризосферы картофеля осуществляли по методу, описанному в работе [Jogaiah et al., 2017], из корневой шейки – по методу [Garibaldi et al., 2019], из условно здоровых клубней и больных клубней – по методу, описанному в работе [Хадиева с соавт., 2018]. Посевы инкубировали при 28 °С в течение 7 сут и отбирали колонии с характерной морфологией. Для получения чистых культур отобранные колонии пересевали 2-3 раза на чистые среды Чапека.

Молекулярно-генетическая идентификация изолятов.

ДНК микромицетов выделяли согласно методике, описанной в работе [Taylor *et al.,* 2016]. Качество и концентрацию ДНК оценивали на спектрофотометре (NanoPhotometer NP80, Implen, Германия). Поглощение растворов ДНК измеряли при длине волны 260 нм, для оценки качества (содержания примесей) определяли отношение A_{260}/A_{280}. Идентификацию изолятов проводили с помощью стандартного метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ампликонов фрагментов ДНК (ITS локусов гена 5.8S рРНК) в ЗАО Евроген (Москва). Данные секвенирования выравнивали в программе Clone Manager версия 9.0. и проводили биоинформатический анализ с помощью программы NtBLAST и базы данных NCBI [http://www.ncbi.nlm.nih.gov].

Оценка патогенных свойств, выделенных изолятов *Fusarium*, проводилась по способности вызывать сухую гниль клубней картофеля 3

сортов картофеля: Ред Скарлет, Жуковский ранний и Регги. Поверхность условно-здоровых клубней обрабатывали 1% раствором гипохлорита натрия с добавлением 0.1% додецилсульфата натрия (ДСН) в течение 2-3 мин. Затем клубни промывали в стерильной дистиллированной воде, высушивали и на поверхности клубня стерильно делали 2 колотых отверстия глубиной около 1.5-2.0 см, в которые вводили по 20 мкл (10^5) спор микромицетов. Зараженные клубни инкубировали в течение 7-14 суток при 28 °С, а затем еще 14 сут при комнатной температуре. Отмечали день появления первых симптомов (ДПС), оценивали процент пораженных клубней (ППК) и степень поражения (СП). СП оценивали по шкале: «–» – сухой гнили не выявлено; «+» – слабое образование сухой гнили с диаметром пораженного участка < 5 мм; «++» – средняя степень образования гнили с диаметром пораженного участка от 5 до 9.9 мм; «+++» – усиленное образование гнили клубня с диаметром пораженного участка ≥ 10 мм.

Исследование экспрессии *PR*-генов растений картофеля в ответ на инфицирование изолятами *Fusarium*

Для анализа были использованы проростки сорта картофеля Жуковский ранний, асептические безвирусные черенки которых *in vitro* заражали спорами грибов. После появления признаков сосудистого увядания растения собирали и немедленно перемалывали в жидком азоте и порцию весом 100 мг переносили в 1 мл раствора для выделения суммарной РНК «ExtractRNA» (ООО Евроген, Москва, РФ) согласно протоколу производителя. Концентрацию РНК определяли с использованием спектрофотометра «NanoPhotometer NP80» (фирмы “Implen”, Германия). Перед использованием все образы выделенной РНК доводили до концентрации 100 нг/мкл. Для удаления контаминации примесью ДНК, присутствующей в экстрактах, раствор РНК обрабатывали ДНКазой и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. РНК хранили при -20°С до синтеза кДНК.

Экспрессию *PR*-генов (пероксидазы, хитиназы IV и β-1,3-глюканазы) определяли методом ОТ-ПЦР с помощью набора реактивов «OneTube RT-PCRmix» (Евроген, Россия) и праймеров, разработанных для последовательностей генов картофеля. Ген β-актина использовали в качестве гена домашнего хозяйства. «Double delta Ct» (ΔΔCt) рассчитывали после сравнения относительных уровней экспрессии *PR*-генов и β-актина [Livak and Schmittgen, 2001].

Исследование влияния фунгицидов на рост изолятов и экспрессию генов *CYP51A* и *HK1*

Чувствительность изолятов к различным концентрациям фунгицидов (0.63 мкг/мл, 1.25 мкг/мл, 2.50 мкг/мл и 5.00 мкг/мл флудиоксонила; 0.1 мкг/мл, 0.5 мкг/мл, 1.0 мкг/мл, 1.5 мкг/мл и 2.0 мкг/мл пенконазола) оценивали с

использованием метода отравленной среды. Процент ингибирования роста мицелия [RGI (%)] рассчитывали после 72 часа инкубирования при 25 °C по формуле: RGI (%) = [(dc - dt)/(dc - 5)]x100, где dc – средний диаметр колонии в контрольном образце (рост без фунгицида), а dt – средний диаметр колонии в исследуемом образце.

Мицелий 6-сут культур фузарий, выросших на средах с фунгицидами, гомогенизировали в жидком азоте. Выделение РНК и количественное определение уровня экспрессии матричной РНК генов *CYP51A* и *HK1 Fusarium* проводили по протоколам, описанным выше, с использованием праймеров, сконструированных к экзонным нуклеотидным последовательностям исследуемых генов с применением программного обеспечения Primer Blast [Ye *et al*., 2012].

Статистическая обработка данных

Статистические результаты представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM). Данные были проверены на нормальность и однородность дисперсии с использованием критерия Шапиро-Уилка. Нормально распределенные данные сравнивали с использованием двустороннего дисперсионного анализа. Данные, которые не прошли тест на нормальность, сравнивали с использованием критерия Фридмана, дополненного t-критерием с 95% уровнем достоверности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Сравнительный анализ грибной микробиоты корней картофеля сорта Жуковский ранний

Для определения влияния компартмента корней на формирование микобиоты провели экологический анализ полученных данных, связанный с расчетом показателей, альфа- и бета-разнообразия. Оценка параметров альфа-разнообразия (сообщества в пределах одного биогеоценоза) включает различные индексы, отражающие видовое богатство и обилие видов. Известно, что сообщество с наибольшими значениями данных показателей является более разнообразным и устойчивым [Wittebolle *et al*., 2009; Nakamura *et al*., 2020]. Альфа-разнообразие грибных сообществ определяли с использованием суммарного богатства OTE, индексов Шеннона-Винера и Chao1.

Средние значения индекса Шеннона в ризосфере (RS) были выше, чем в образцах ризопланы (RP): для популяций RS грибов – 5.35±0.37, а в RP – 4.43±0.31 (рисунок 1A). В целом, показатели индекса Шеннона свидетельствуют о большем разнообразии видов в грибных микробиотах образцов RS, чем образцов RP. Результаты анализа индексов Chao1 также показали, что богатство грибных сообществ RS картофеля выше, чем в RP. Не выявлено статистически важного различия между индексом Chao1 и

количеством идентифицированных таксонов (OTE), которое составляет 320±51 таксономических единиц в RS, и 188±34 в RP (рисунок 1Б).

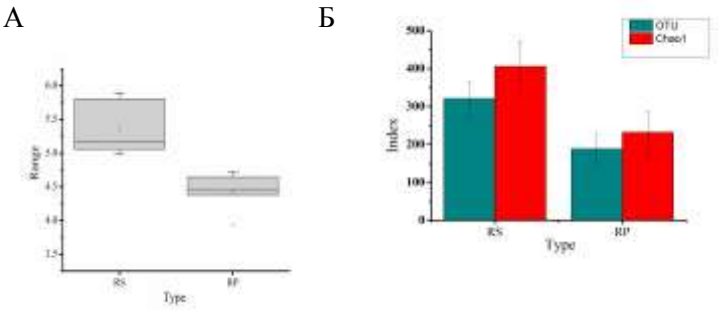

Рисунок 1. А – Оценка альфа-разнообразия (индекс Шеннона) грибных сообществ ризосферы (RS) и ризопланы (RP). Б – Распределение средних значений OTE (сходство 97%) и индекса Chao1 в грибном сообществе ризосферы (RS) и ризопланы (RP).

Был проведен анализ главных компонентов (PCA) грибных сообществ образцов ризосферы и ризопланы, собранных осенью с различных полей (рисунок 2).

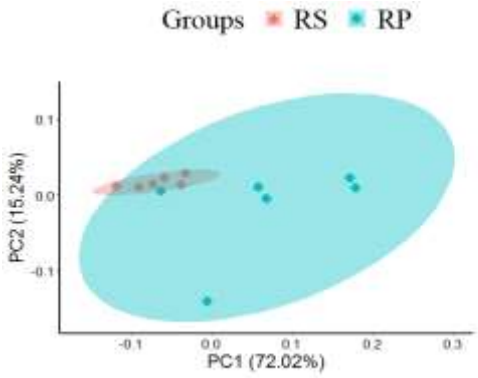

Рисунок 2. Оценка бета-разнообразия грибной микробиоты ризосферы и ризопланы картофеля сорта Жуковский ранний.

Наблюдаются значительные различия между образцами RS и RP. Кластер RS ($P<0.05$) выделяется наиболее четко, что соответствует невысокому количеству достоверных различий между повторностями (рисунок 2).

Таким образом, с корнями растений картофеля сорта Жуковский ранний ассоциированы многочисленные сообщества микроскопических грибов, биоразнообразие которых выше в ризосфере по сравнению с ризопланой. При этом структура микобиоты ризосферных образцов картофеля, отобранного с разных полей, ближе друг к другу, тогда как микобиоты образцов ризопланы значительно различаются между собой. Это может свидетельствовать о селективной роли растений при формировании микробных сообществ в разных компартментах корней.

Структура микобиоты ризосферы и ризопланы картофеля сорта Жуковский ранний. Анализ таксономической структуры сообществ грибов корней картофеля позволил идентифицировать представителей 7 филумов, 32 классов, 95 семейств и 177 родов. Доминировали в обоих компартментах представители трех филумов: *Ascomycota*, *Basidiomycota* и *Zygomycota* (*Mucoromycota*). На их долю приходилось 98–99% от всего разнообразия

грибов. Среди *Ascomycota* наиболее представлены классы *Sardoriomycetes* и *Dothideomycetes* с численностью 43.84±10.05% и 15.05±8.76% в RS и 50.53±9.61% и 9.15±2.74% в RP соответственно. Численность же класса *Eurothiomycetes* значительно различалась: 12.74±5.54% в RS и 1.93±0.91% в RP. В таблице 1 представлены данные о доле микромицетов основных 10 родов.

Таблица 1. Представленность топ-10 доминантных родов грибов в ризосфере и ризоплане

Таксон	**Доля в грибных сообществах, %**	
(Род)	RS	RP
Fusarium	10.34 ± 1.41%	9.96 ± 1.79%
Penicillium	8.64 ± 1.01%	0.74 ± 0.10%
Monographella	7.66 ± 1.43%	9.91 ± 1.87%
Chaetomium	4.95 ± 0.53%	8.33 ± 1.53%
Verticillium	4.6 ± 1.43%	8.27 ± 3.63%
Pseudogymnoascus	2.99 ± 0.43%	0.81 ± 0.13%
Mortierella	2.51±0.56%	4.49±0.31%
Chalastospora	2.34 ± 0.33%	0.96 ± 0.23%
Alternaria	1.84 ± 0.24%	1.40 ± 0.04%
Metacordyceps	1.69 ± 0.15%	4.95 ± 0.27%

Важно отметить, что наиболее распространенными микромицетами в обоих компартментах являются представители родов *Fusarium* (около 10%) и *Monographella* (7.5-10%). Известно, что микромицеты рода *Fusarium* включают как сапротрофные, так и патогенные штаммы, или могут выполнять симбиотрофные функции [Schmidt *et al.*, 2018; Gu *et al.*, 2020]. Многие виды *Fusarium* являются патогенами картофеля (*F. solani, F. sambucinum, F. oxysporum f. sp tuberosi* и др.), снижающими урожайность и качество клубней [Heltoft *et al.*, 2016, a; Azil *et al.*, 2021]. В работе Qin *et al*. [2017] показано, что *Fusarium* является наиболее представленным родом в ризосфере картофеля при разных методах возделывания. Сравнительный анализ здоровых и больных растений томатов выявил резкое увеличение популяций фузарий в ризосфере и ризоплане больных растений [Zhou *et al.*, 2020].

Таким образом, разнообразие грибных сообществ в ризосфере и ризоплане картофеля существенно различается. Наиболее распространенными микромицетами в обоих компартментах корней картофеля являются представители родов *Fusarium* и *Monographella*. Также широко представлены *Chaetomium* и *Verticillium*, но их доля существенно выше в ризоплане.

2. Влияние различных факторов на структуру микобиоты корней картофеля сорта Жуковский ранний

Показано, что рекрутирование растениями почвенных микробов, в том числе и микромицетов, является активным процессом [Sasse *et al.*, 2018].

Конкретные механизмы растений картофеля, которые стимулируют сборку полезных микромицетов, остаются малопонятными. Для выяснения влияния стадии вегетации, сезонных изменений и севооборота на микобиоту корней картофеля мы провели сравнительный анализ образцов корней картофеля сорта Жуковский ранний, культивируемого на серой лесной почве, на стадии цветения (начало июля) и стадии созревания клубней – физиологического старения (середина сентября). Осенью было зафиксировано появление почвенной засухи: величина гидротермического коэффициента Сельянинова составила 0.81±0.02, что свидетельствовало о недостаточном увлажнении почвы.

Таким образом, на структуру грибной микробиоты корней помимо влияния стадии роста или физиологического состояния растения, вероятно, могут оказывать воздействие и сезонные изменения погодных условий. Для выявления изменений, связанных с сезонным фактором, нами проведен сравнительный анализ микобиоты свободной почвы.

Альфа-разнообразие. Оценка α-разнообразия с использованием индексов Chao1, Шеннона и Симпсона выявила снижение биоразнообразия от образцов почвы через ризосферу к ризоплане в осенних пробах (период старения картофеля) (рисунок 3). Интересно отметить, что в почве разнообразие микобиоты осенью не снижалось по сравнению с ризосферой стареющих растений картофеля. Об этом свидетельствует то, что индексы Шеннона, Chao1 и Симпсона для почвенных образцов практически не менялись в зависимости от сезона. Наши результаты согласуются с данными, полученными для других растений. Например, установлено снижение биоразнообразия грибов в ризоплане растения колокольчика по сравнению с ризосферой, что указывает на наличие селективного давления со стороны растения-хозяина [Park *et al.*, 2011]. Похожие результаты были получены для растений бамии (*Abelmoschus esculentus*), риса (*Oryza sativa*) и томата [Edwards *et al.*, 2015; Onaebi *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020]. Это указывает на то, что распространение микромицетов в серой лесной почве не зависит от изменения погодных условий (средней атмосферной температуры и влажности) при переходе от лета к ранней осени.

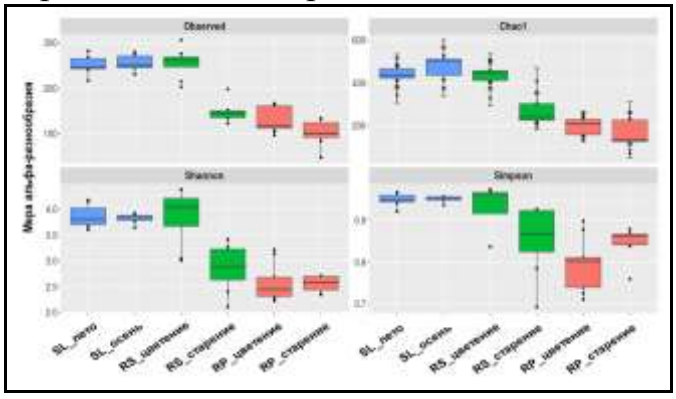

Рисунок 3. Оценка α--разнообразия грибных сообществ почвы, ризосферы и ризопланы. Богатство рассчитано по количеству наблюдаемых OTE и индексу Chao1, тогда как разнообразие определено на основе показателей Симпсона и Шеннона.

Анализ бета-разнообразия подтвердил различия в структуре грибных сообществ свободной почвы и корней картофеля. Установлено, что сообщества ризосферы и ризопланы не только значительно различаются между собой, но и формируют по 2 кластера, соответствующих стадиям роста картофеля (рисунок 4).

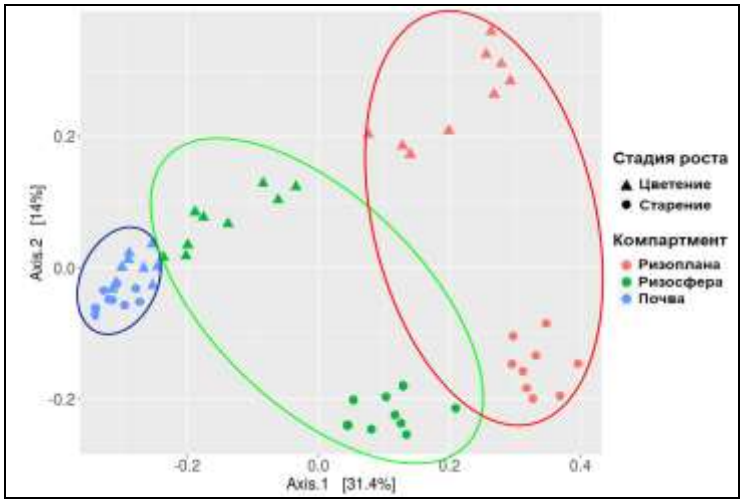

Рисунок 4. Структура грибного сообщества серой лесной почвы и корней картофеля сорта Жуковский ранний. Расстояния Брея–Кертиса и PCoA анализ грибных сообществ оценивали для трех компартментов (почвы, ризосферы и ризопланы) в течение двух периодов вегетации (цветение и старение).

В тоже время образцы свободной почвы образовывали один кластер, который объединял как летние, так и осенние пробы, различия между которыми несравнимо ниже, чем между образцами компартментов корней. Также из графика видно, что по структуре грибные сообщества летних образцов ризосферы ближе всего к сообществу свободной почвы. Структура микобиоты ризопланы значительно отличается от сообщества свободной почвы и в меньшей степени, но также существенно, от образцов ризосферы.

Таким образом, растения картофеля активно модулирует грибное сообщество на своих корнях. Сравнительный анализ микобиот корней и почвы показал, что изменения структуры грибных сообществ корневых компартментов вызваны в в основном влиянием физиологического состояния растения-картофеля, а не сезонными изменениями погодных условий.

Таксономический состав грибных сообществ различных компартментов корней картофеля и свободной почвы. Сравнительный анализ таксономического состава образцов почвы и корневых компартментов на уровне родов и видов также показал существенные изменения в численности разных микромицетов в структуре микобиот корневых компартментов (рисунки 5-6).

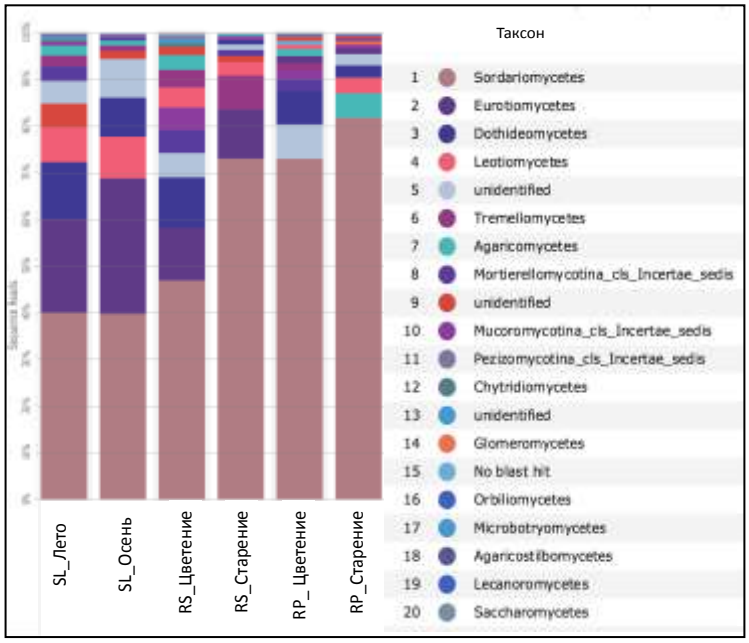

Рисунок 5. Таксономический анализ грибной микробиоты почвы, ризосферы и ризопланы картофеля на уровне классов.

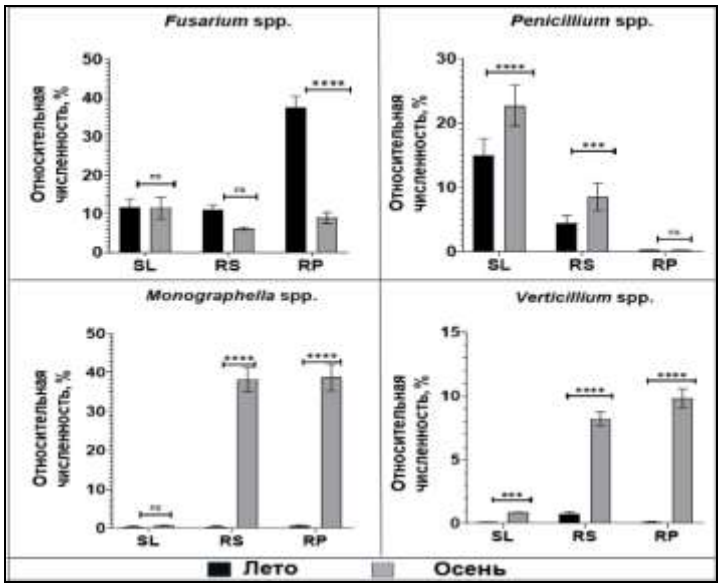

Рисунок 6. Сравнение средней относительной численности значимо представленных родов в почве (SL), ризосфере (RS) и ризоплане (RP) на стадиях цветения (лето) и старения (осень) картофеля сорта Жуковский ранний. Планки погрешностей соответствуют 95% доверительным интервалам. Множественные попарные сравнения проведены с помощью метода TukeyHSD (с расчетом среднего Тьюки). Символы ns, *, **, ***, **** обозначают $P > 0.05$, $P \leq 0.05$, $P \leq 0.01$, $P \leq 0.001$ и $P \leq 0.0001$ соответственно.

Так, во всех образцах широко представлены *Fusarium*, доля которых в почве была стабильной (в среднем около 12%), но менялась в корневых компартментах: в ризосфере снижалась с 11.07±1.31% (летом) до в среднем 6% (осенью), в ризоплане с 37% до 9% в среднем соответственно (рисунок 6). В то же время в ризосфере и ризоплане резко увеличивалась доля таких микромицетов, как *Monographella* (RS – с 0.36±0.03% до 43.4±3.71%; RP – с 1.87±0.26% до 42.38±2.69%). Данные по относительной численности идентифицированных видов микромицетов показали, что во всех образцах почвы и летних образцах ризосферы и ризопланы доминирующим видом был *Fusarium oxysporum*. Согласно данным литературы, изменения в микробиоте корневых компартментов могут быть обусловлены изменениями в секреции корневых экссудатов при старении растений, что дестабилизирует систему привлечения микробов, а также может быть причиной изменения альфа-

разнообразия [Sasse *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2020]. Также могут влиять условия окружающей среды, структура и состав почвы. Установлено, что растения обладают способностью отбирать разные виды микроорганизмов на разных фазах развития, предположительно, для выполнения функций, которые не выполняет основной микробиом [Chaparro *et al.*, 2014; Almario *et al.*, 2017].

Таким образом, сравнительный таксономический анализ грибных сообществ почвы и корней картофеля выявил существенные различия представленности микромицетов различных родов. Наиболее широко были представлены грибы *Fusarium, Monographella, Penicillium* и *Verticillium*, численность которых зависела как от компартмента, так и от стадии развития растений картофеля. Именно на уровне родов микромицетов четко прослеживается роль растений картофеля в селективном отборе разных грибов и дифференцированном формировании структуры микобиоты ризосферы и ризопланы корней (рисунок 6). Известно, что некоторые *Monographella* spp., *Fusarium* spp. и *Verticillium* spp. представляют собой почвенные грибы, вызывающие заболевания различных растений, включая картофель [Stefańczyk *et al.*, 2016; Almas and Kamrodi, 2019; Li *et al.*, 2019].

Влияние севооборота на изменение численности популяции *Fusarium* spp. в грибных сообществах корней картофеля. Известно, что севооборот может способствовать подавлению болезней важных сельскохозяйственных культур за счет снижения численности патогенов в почве, когда в севообороте находятся культуры, не являющиеся хозяевами данного возбудителя [Tiwary *et al.*, 2020].

Картофель сорта Жуковский ранний в эксперименте 2017 г выращивался на участках экспериментальных полей с разными предшествующими культурами (картофель, пшеница, горох) и после черного пара. Провели анализ влияния севооборота на структуру грибных сообществ корней, в частности, на представленность микромицетов рода *Fusarium*. Как видно из диаграммы (рисунок 7), представленность микромицетов этого рода меняется в зависимости от севооборота. Так, доля *Fusarium* в целом максимальна в ризоплане картофеля в период вегетативного роста и развития растений и достигает 48% в случае культивирования картофеля после черного пара. В случае других предшествующих культур представленность фузарий в ризоплане варьируется в среднем от 34 до 21%. В ризосфере, напротив, доля *Fusarium* была выше в образцах картофеля после гороха и картофеля (14.06-18.05%). В осенних пробах представленность данного рода в RP значительно снижалась и составляла 7.4-9.5% после пшеницы и черного пара и ~10.5% при выращивании после картофеля и гороха. В RS низкая численность (4.18-5.44%) фузарий наблюдалась после картофеля и пшеницы. Однако помимо количественного изменения популяции фузарий важно знать численность в них патогенных вариантов.

Рисунок 7 – Влияние севооборота на численность основных родов микромицетов в грибных сообществах ризосферы и ризопланы картофеля сорта Жуковский ранний во время цветения (А) и старения (Б).

Доля *Monographella* также варьируется осенью в компартментах корней картофеля в зависимости от севооборота. Кроме того, после непрерывного выращивания картофеля как предшествующей культуры во всех образцах ризосферы и ризопланы широко представлены неклассифицированные микромицеты, относящиеся к семейству *Nectriaceae*, доля которых достигает в корневых компартментах 33-36%, что свидетельствует о важной роли микромицетов этого семейства, к которому относится и род *Fusarium*, в физиологии картофеля (рисунок 7). Таким образом, *Fusarium* является одним из доминирующих представителей грибного сообщества корней картофеля сорта

Жуковский ранний и может включать как сопротрофные, так и патогенные штаммы. Использование агротехники, основанной на севообороте, является важным методом контроля вредного воздействия инвазивных фитопатогенных грибов за счет изменения состава грибного сообщества корней.

3. Выделение изолятов *Fusarium* spp. и анализ их патогенности в отношении клубней картофеля

Из разных тканей (корневой шейки, клубней и ризосферы) картофеля, выращенного на территории Республики Татарстан, были выделены изоляты *Fusarium* для дальнейшей сравнительной характеристики. Всего было выделено 80 изолятов *Fusarium* spp.: 31 изолят из корневой шейки растений с признаками фузариозного увядания; 27 – из клубней, пораженных сухой гнилью; 13 – из латентно-инфицированных клубней; 9 – из ризосферы.

На основании гомологии ITS участков 5.8S рРНК проведена молекулярно-генетическая идентификация 34 изолятов чистых культур *Fusarium.* На основании 97-100% гомологии с известными штаммами (БД NCBI) 26 изолятов идентифицированы как представители *Fusarium oxysporum*, 4 изолята – *Fusarium solani*, и по одному изоляту *Fusarium sambucinum, Fusarium avenaceum, Fusarium sporotrichioides* и *Fusarium trincinctum.* Преобладание *F. oxysporum* среди выделенных изолятов согласуется с данными литературы, согласно которым данный вид является основной причиной болезни картофеля и многих других культур семейства *Solanaceae* (пасленовые) [Замалиева и соавт., 2015, а; Inami *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2016; Gordon, 2017]. Более того, *F. oxysporum* причислен к видам, ответственным за скрытую инфекцию клубней картофеля [Хадиева и соавт., 2018; Thomsen, 2017].

Таким образом, из различных тканей картофеля, выращенных на опытных полях РТ, представленных серой лесной почвой, выделены изоляты рода *Fusarium*, среди которых преобладали представители *F. oxysporum*, что коррелирует с данными метагеномного анализа.

Анализ восприимчивости клубней различных сортов картофеля к изолятам *Fusarium* spp. Известно, что фузариозная инфекция может вызывать увядание растений картофеля в поле, а при попадании возбудителей в клубни через раны во время сбора урожая, обработки и транспортировки через 2–3 месяца хранения вызывает сухую гниль клубней [Aydin, 2019]. Для характеристики патогенных свойств, выделенных нами и идентифицированных *Fusarium* spp., оценивали их способность вызывать сухую гниль в клубнях картофеля сортов Жуковский ранний, Регги и Ред Скарлет. На рисунках 8 и 9 представлены примеры развития сухой гнили в клубнях и индексы устойчивости каждого сорта.

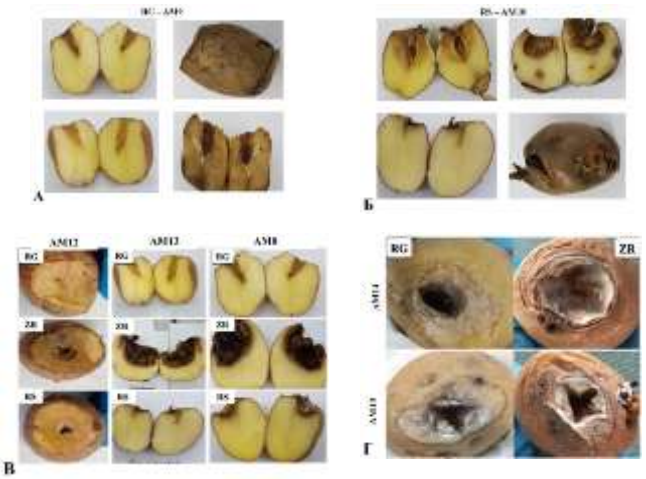

Рисунок 8. Визуализация сухой гнили в искусственно зараженных клубнях картофеля сортов ZR – Жуковский ранний, RG – Регги, RS – Ред Скарлет. На рисунках А, Б и В показаны различные степени сухой гнили (темно-коричневый/черный цвет некроза тканей клубней). На рисунке Г показан рост беловатого мицелия в клубнях сортов Регги и Жуковский ранний.

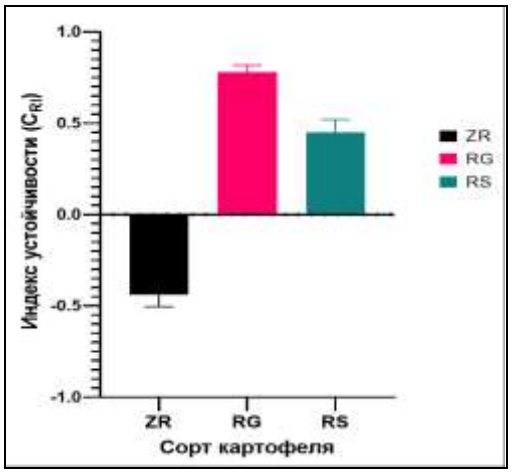

Рисунок 9. Индекс устойчивости (C_{RI}) к фузариозной гнили клубней картофеля сортов: ZR – Жуковский ранний; RG – Регги; RS – Ред Скарлет. C_{RI} = (ΣTH-ΣTA)/ΣTH; где TH и TA – оценки здоровых и пораженных клубней для данного конкретного сорта соответственно.

В результате исследования было установлено, что только 5 из 34 изолятов не проявили патогенность на клубнях. Все остальные 29 изолятов (85.29%) обладали способностью вызывать сухую гниль клубней хотя бы у 1 из 3 сортов картофеля. Однако степень поражения различалась в зависимости от сорта картофеля и штамма. Известно, что разные сорта могут проявлять разную чувствительность к возбудителям [Ayed *et al.*, 2006 a].

Восприимчивость клубней картофеля к изолятам *Fusarium*, выделенным из корневой шейки. Роль представителей разных видов *Fusarium* в увядании картофеля (сосудистая инфекция) или развитии сухой гнили клубней описана в литературе [Heltoft *et al.*, 2016, a, b]. Однако практически нет данных о способности *Fusarium* spp., возбудителей фузариозного увядания, вызывать также сухую гниль клубней при хранении.

Мы оценили способность изолятов *Fusarium*, выделенных нами из тканей стебля-корневой шейки растений картофеля с признаками фузариозного увядания, вызывать сухую гниль клубней различных сортов картофеля (таблица 2).

Согласно результатам теста, 12 из 16 изолятов *Fusarium* spp. обладали способностью вызывать сухую гниль, по крайней мере, у одного из проверенных сортов. Симптомы сухой гнили появлялись в среднем через 8–14 дней после инокуляции. Степень поражения клубней у исследуемых сортов и изолятов *Fusarium* заметно варьировала.

Таблица 2. Характеристика способности микромицетов *Fusarium* spp., выделенных из корневой шейки картофеля, вызывать сухую гниль клубней

№	Штамм	Оценка патогенности разных сортов картофеля								
		Жуковский ранний			Регги			Ред Скарлет		
		ДПС	ППК	СП	ДПС	ППК	СП	ДПС	ППК	СП
1.	*F. oxysporum* AM1	14	33.3	+	>21	-	-	>21	-	-
2.	*F. oxysporum* AM2	12	33.3	+	>21	-	-	>21	-	-
3.	*F. oxysporum* AM3	>21	-	-	>21	-	-	>21	-	-
4.	*F. oxysporum* AM4	>21	-	-	>21	-	-	>21	-	-
5.	*F. oxysporum* AM5	>21	-	-	>21	-	-	>21	-	-
6.	*F. oxysporum* AM6	>21	-	-	>21	-	-	>21	-	-
7.	*F. oxysporum* AM7	14	55.5	++	11	55.5	+	14	55.5	++
8.	*F. oxysporum* AM8	17	55.5	++	14	55.5	+	17	55.5	+
9.	*F. solani* AM9	14	33.3	++	17	30	++	11	33.3	+
10.	*F. oxysporum* AM10	>21	-	-	12	22.2	+	10	50	++
11.	*F. oxysporum* AM11	11	66.67	++	>21	-	-	17	33.3	+
12.	*F. oxysporum* AM12	11	66.67	+	>21	-	-	8	100	++
13.	*F. oxysporum* AM13	14	100	++	17	33.3	++	<21	-	-
14.	*F. oxysporum* AM14	17	100	+++	<21	-	-	14	66.67	+++
15.	*F. oxysporum* AM15	14	33.3	++	<21	-	-	17	33.3	++
16.	*F. oxysporum* AM16	14	88.89	+++	17	33.3	++	<21	-	-

Примечание: ДПС – День появления первых симптомов. ППК – Процент пораженных клубней (%). СП – Степень поражения: «–» образование сухой гнили не выявлено; «+» – слабое образование сухой гнили с диаметром пораженного участка < 5 мм; «++» средняя степень образования сухой гнили с диаметром пораженного участка от 5 до 9.9 мм; «+++» усиленное образование сухой гнили клубня с диаметром пораженного участка ≥ 10 мм.

Изоляты AM7, AM8 и AM9 проявляли патогенность по отношению ко всем трем протестированным сортам. Штамм AM14 с высокой вирулентностью вызывал сухую гниль в клубнях сортов Жуковский ранний и Ред Скарлет. В клубнях, инокулированных изолятами AM3, AM4, AM5 и AM6, признаки сухой гнили не выявили даже через 21 сут инкубации. Все четыре изолята, не проявившие патогенность, были выделены из корневых шеек растений картофеля сорта Зекура. Изолят AM10, выделенный из больных увяданием растений сорта Жуковский ранний, не проявил вирулентности в отношении клубней данного сорта, но в разной степени поражал клубни сортов Регги и Ред Скарлет. Отсутствие вирулентности AM10 в отношении клубней картофеля сорта Жуковский ранний, инокулированных этим изолятом, позволяет предположить, что виды *Fusarium*, вызывающие увядание у определенного сорта растения-хозяина картофеля, не обязательно являются возбудителями сухой гнили клубней того же сорта.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод о том, что штаммы *Fusarium* при патогенезе могут проявлять предпочтения к типу ткани хозяина (стебель, корень, клубень и т. д.) и сорту картофеля.

Восприимчивость клубней картофеля к изолятам *Fusarium*, выделенным из ризосферы. Ризосфера – это зона «боевых» действий для патогенов растений и полезных микробов. Несмотря на то что ризосфера действует как барьер против притока фитопатогенов, иногда некоторым грибковым патогенам удается колонизировать корни [Ali *et al.*, 2017], хотя принято считать, что большинство микроорганизмов ризосферы – это полезные микробы. Сравнительный анализ патогенности штаммов *Fusarium*, выделенных нами из ризосферы, показал, что все три изолята проявили некоторую степень вирулентности в отношении клубней сортов Жуковский ранний и Ред Скарлет (таблица 3). Кроме того, изоляты *F. solani* RS2 и *F. oxysporum* RS3 вызывали слабые симптомы сухой гнили в клубнях сорта Регги. Первые симптомы сухой гнили наблюдались на 14-17 день после инокуляции.

Таблица 3. Характеристика патогенных свойств изолятов микромицетов *Fusarium* spp., выделенных из ризосферы картофеля

№	Видовая принадлежность и № изолята	Жуковский ранний			Регги			Ред Скарлет		
		ДПС	ППК	ОСП	ДПС	ППК	ОСП	ДПС	ППК	ОСП
1.	*F. solani* RS2	17	55.5	++	14	22.2	+	17	22.2	+
2.	*F. oxysporum* RS1	17	11.1	+	<21	-	-	17	33.3	+
3.	*F. oxysporum* RS3	14	66.67	+++	14	33.3	+	17	22.2	+

Таким образом, изоляты *Fusarium*, выделенные из ризосферы картофеля, обладают способностью вызывать сухую гниль в клубнях картофеля различных сортов. Это свидетельствует о том, что патогенные варианты фузарий могут быть выделены с корней здоровых растений. Необходимы дальнейшие исследования, направленные на анализ вирулентных свойств штаммов *Fusarium*, заселяющих корни картофеля.

Восприимчивость клубней к изолятам, выделенных из больных клубней. Из клубней, пораженных сухой гнилью, нами было выделено и идентифицировано до вида 12 изолятов *Fusarium*, которые были протестированы на способность вызывать сухую гниль в клубнях при их искусственном инфицировании. Установлено, что 11 из 12 исследованных изолятов проявляют вирулентные свойства при инфицировании клубней сорта Жуковский ранний. Наиболее высокую степень вирулентности проявили изоляты DR36, DR45, DR47 и DR57 (таблица 4).

Среди изолятов, выделенных из сухой гнили клубней, доминировали представители *F. oxysporum* (7 изолятов) и все эти изоляты проявляли вирулентность к клубням исследуемых сортов. Также были выделены штаммы видов *F. solani* (2 изолята), *F. sambucinum, F. trincinctum, F. sporotrichioides*, из которых только штамм *F. trincinctum* DR12 оказался не вирулентным. Клубни, инокулированные изолятом *F. trincinctum* DR12, не проявляли признаков сухой

гнили даже через 21 сут инкубации (таблица 4). Во всех остальных случаях уже через 3-7 суток после инокуляции в клубнях на месте укола образовывались очаги сухой гнили, а через 21 день во всех случаях диаметр пораженного участка превышал 10 мм.

Таким образом, сухую гниль клубней картофеля на территории РТ могут вызывать фузарии разных видов, но чаще всего это штаммы *F. oxysporum*. Знания о видах *Fusarium* spp., присутствующих в клубнях картофеля с сухой гнилью, важны для минимизации потери урожая и селекции устойчивых к данным грибам сортов картофеля.

Восприимчивость клубней к изолятам, выделенным из латентно-инфицированных клубней. При системном поражении растений грибы рода *Fusarium* способны длительное время «скрываться» в клубнях в форме латентной (бессимптомной) инфекции. Они передаются с посадочным материалом новой репродукции вегетативного потомства. Чаще всего скрытая инфекция обуславливает существенное снижение всхожести посаженных клубней. В связи с этим, проводили характеристику патогенных свойств трех идентифицированных микромицетов рода *Fusarium*, изолированных из визуально здоровых клубней картофеля. Все изоляты обладали способностью вызывать сухую гниль.

Через 4 сут после искусственного инфицирования изолятом LT3 признаки сухой гнили появились во всех клубнях сорта Жуковский ранний, а через 8 сут – в 66% клубней сорта Ред Скарлет. Штаммы *F. oxysporum* LT1 и LT2 показали высокую вирулентность по отношению к клубням Жуковский ранний, при этом штамм LT1 не поражал клубни других сортов, а штамм LT2 вызывал появление сухой гнили через 14 сут после инокуляции в 66% клубней Ред Скарлет.

Вирулентность любого микроорганизма зависит от широкого спектра факторов, включая генотип и фенотип изолята, свойства хозяина и условий окружающей среды и т.д. [Meena *et al.*, 2018]. Считается, что представители рода *Fusarium* обладают сложной патогенностью из-за их гетерогенности и широкого разнообразия возможных хозяев [Garnica and Nucci, 2013; Ma *et al.*, 2013]. Отсутствие вирулентности патогена в клубнях исходного растения-хозяина указывает на то, что изоляты *Fusarium*, вызывающие болезнь увядания у картофеля, не обязательно вызывают сухую гниль клубней того же сорта. По аналогии с данными, полученными в экспериментах с ананасами [Souza *et al.*, 2018], мы можем предположить, что штаммы *Fusarium* могут демонстрировать предпочтения к типу ткани хозяина (стебель, корень, клубень и т.д.) во время патогенеза.

Таким образом, *Fusarium* spp. способны присутствовать бессимптомно в условно-здоровых клубнях, а визуальный осмотр не может выявить латентно инфицированные клубни или клубни с низкой степенью поражения. Скрытая инфекция клубней представляет серьезную проблему в борьбе с сухой гнилью

картофеля и определяет необходимость разработки и использования молекулярных методов скрининга и выявления латентных инфекций клубней в первую очередь в семенном материале.

4. Влияние фунгицидов на рост штаммов *F. oxysporum* и экспрессию генов

Рост устойчивости патогенов и проблема биобезопасности, связанная с нерациональным использованием химических фунгицидов, вызывает обеспокоенность во всем мире [Lucas *et al.*, 2015]. На территории РФ одним из широко применяемых фунгицидов против заболеваний картофеля является флудиоксонил [Агансонова, 2018]. Еще один набирающий популярность фунгицид – пенконазол [Амелин с соавт., 2012]. Нами была проведена характеристика чувствительности изолятов *F. oxysporum* AM7, AM8, AM10 и AM14 (таблица 7), вызывающих сосудистое увядание и сухую гниль картофеля, к фунгицидам флудиоксонилу и пенконазолу. Эффективность фунгицида характеризуется E_{50} – концентрацией, при которой процент ингибирования роста мицелий (RGI) равен 50%.

Как видно из рисунка 10, все изоляты *F. oxysporum* проявили высокую резистентность к флудиоксонилу (FLU) в концентрациях 0.63-5.00 мкг/мл. В литературе описываются случаи устойчивости к FLU среди штаммов *Fusarium* spp. Так, сообщается о развитии резистентности к FLU и другим фунгицидам патогенных к томатам штаммов *F. oxysporum* f. sp. Lycopersici, что снижает эффективность этих препаратов [Akram *et al.*, 2018]. Опыты, проведенные в США и Великобритании, также выявили устойчивость к FLU штаммов *F. oxysporum*, выделенных из клубней картофеля [Yoshimi *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 2008; Gachango *et al.*, 2011; 2012].

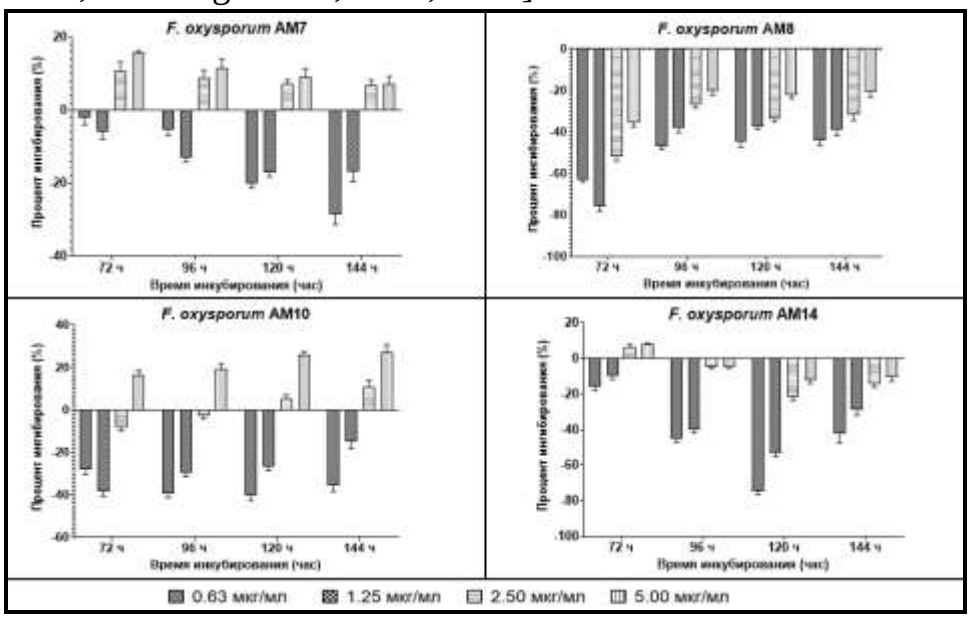

Рисунок 10. Влияние флудиоксонила в различных концентрациях на рост штаммов *F. oxysporum*. (По данным литературы доза E_{50} флудиоксонила для разных микромицетов равна 0.001-5.000 мкг/мл).

Таким образом, исследованные штаммы *F. oxysporum* показали высокую устойчивость к флудиоксонилу в концентрациях, рекомендованных по данным

литературы для использования в практической деятельности. Тот факт, что применение FLU в концентрациях 0.63-1.25 мкг/мл привело к стимулированию роста всех изолятов *Fusarium*, предполагает, что эти грибы, вероятно, способны быстро включать токсикант в свой метаболизм в качестве химического источника энергии. Это вполне возможно, учитывая, что *Fusarium* spp. и *Pseudomonas* spp. (первоначальный продуцент флудиоксонила) в изобилии присутствуют в сельскохозяйственных почвах и постоянно вовлечены в антагонизм и эволюционную борьбу друг с другом в ближней корневой зоне [Al-Mughrabi, 2010; Reardon, 2015; Mardanova *et al.*, 2019].

Также исследовали рост мицелия штаммов *F. oxysporum* AM7, AM8, AM10 и AM14 в присутствии пенконазола (PEN) в концентрациях от 0.1 до 2.0 мкг/мл среды (рисунок 11). Значение EC_{50} пенконазола в отношении микромицетов *Fusarium* еще не описано в литературе, но для большинства других мицелиальных грибов EC_{50} PEN составляет менее 1.0 мкг/мл [Beresford *et al.*, 2012; Pitt *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2017].

В отличие от флудиоксонила, все изученные штаммы *F. oxysporum* были чувствительны к пенканазолу в использованных концентрациях. Как видно из рисунка 11, эффективная доза (E_{50}) фунгицида составляла ~1.5-2.0 мкг/мл для всех изолятов. Ингибирующий эффект фунгицида зависел от дозы и был максимален при 2.0 мкг/мл, достигая 55-80% для разных штаммов. Сильнее других ингибировался рост мицелия штамма AM10.

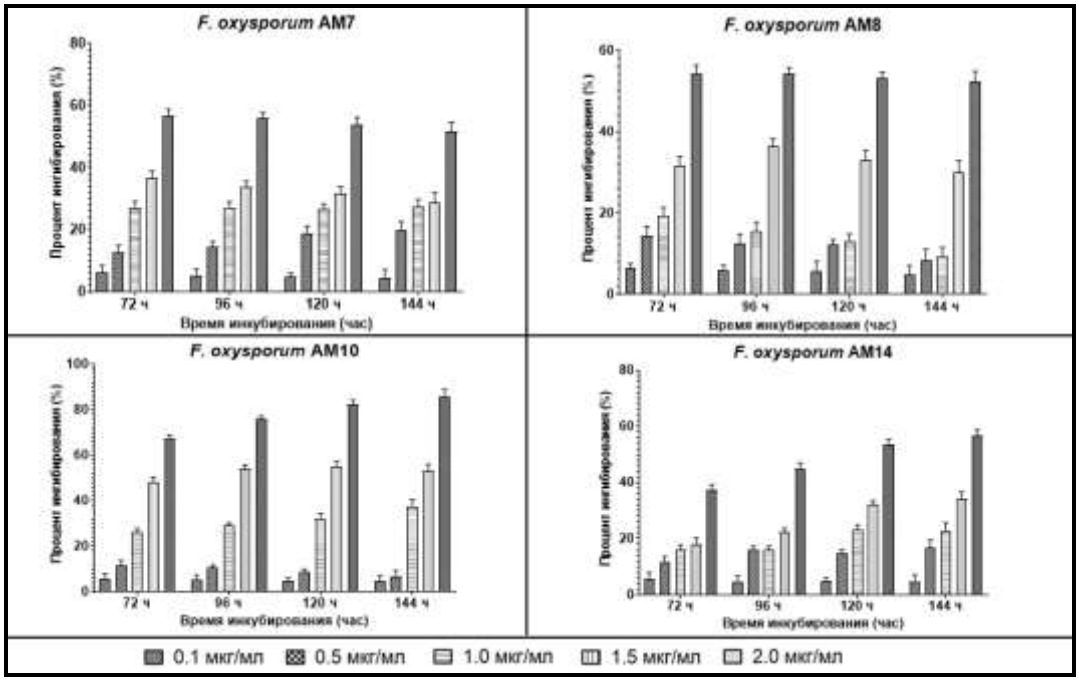

Рисунок 11. Ингибирование роста штаммов *F. oxysporum* в присутствии пенконазола.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что пенконазол является эффективным средством против возбудителей фузариоза, но эффективная доза (E_{50}) для штаммов *F. oxysporum* превышает 1.5 мкг/мл, что выше описанных в литературе данных для других микромицетов (0.5 -1.0

мкг/мл) [Beresford *et al.*, 2012; Pitt *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2017]. В работе Palani и Lalithakumari [1999] была продемонстрирована вероятность развития устойчивости к пенконазолу у *Venturia inaequalis* с использованием химического мутагенеза дикого изолята патогена, ранее не подвергавшегося воздействию пенконазола. Позднее была зарегистрирована устойчивость *V. inaequalis* к PEN в различных регионах выращивания яблок в Новой Зеландии [Beresford *et al.*, 2013], а также устойчивость гриба *Erysiphe necator* – патогена виноградной лозы [Hajian Shahri *et al.*, 2012]. Все эти данные подтверждают существование механизмов резистентности к пенконазолу нитчатых грибов.

Таким образом, низкие концентрации флудиоксонила напротив, вместо ингибирования, стимулируют рост микромицетов, а высокие концентрации незначительно подавляют рост только у некоторых штаммов. Пенконазол является эффективным средством против возбудителей фузариоза, но происходит постепенная выработка резистентности штаммов *Fusarium* к данному фунгициду.

Влияние фунгицидов на экспрессию генов *CYP51A* и *HK1 Fusarium oxysporum.* В литературе много данных о механизмах чувствительности фитопатогенных грибов к фунгицидам, но данные, описывающие их действие на *Fusarium* spp., очень ограничены [Lucas *et al.*, 2015]. Мы исследовали с помощью метода РТ-ПЦР с обратной транскрипцией влияние флудиоксонила (FLU) и пенконазола (PEN) на уровни экспрессии генов гистидин киназы (*HK1*) и стерол-14-α-деметилазы (*CYP51A*) в изолятах *F. oxysporum*. Как видно из диаграмм, представленных на рисунке 12, в мицелии всех изолятов *F. oxysporum*, культивируемых в присутствии обоих фунгицидов, наблюдалось увеличение относительной экспрессии генов *CYP51A* и *HK1* в разной степени.

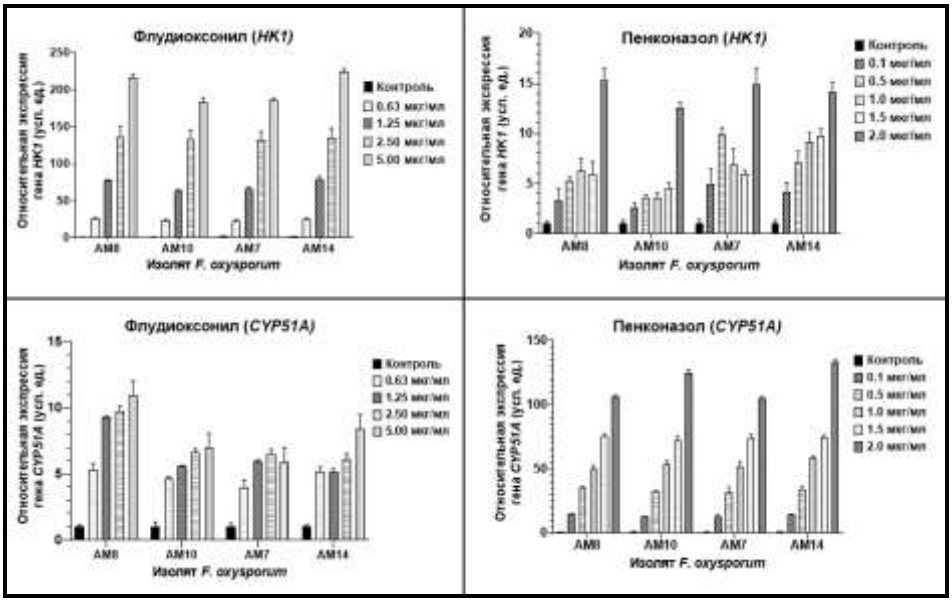

Рисунок 12. Количественная оценка уровней мРНК генов стерол 14-α-деметилазы (*CYP51A*) и гистидин киназы (*HK1*) штаммов *F. oxysporum* в присутствии флудиоксонила и пенконазола.

Экспрессия гена фермента гистидинкиназы (*HK1*) приводит к активации сигнального пути высокоосмолярного глицерина (High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway) [Brandhorst *et al.*, 2019]. Также ген *HK1* был идентифицирован как главная детерминанта устойчивости к флудиоксонилу у различных грибов [Furukawa *et al.*, 2012; Lawry *et al.*, 2017]. Вдобавок инактивация *HK1* привела к устойчивости *F. oxysporum* к фунгицидам класса фенилпиррола и дикарбоксимида, а также к повышенной чувствительности к гиперосмотическому стрессу и окислительному стрессу при одновременном снижении вирулентности *F. oxysporum* [Rispail and Di Pietro, 2010].

Уровни экспрессии генов *CYP51A* и *HK1* сильно варьировались в зависимости от гена, штамма и концентрации используемого фунгицида. В то время как уровни экспрессии *HK1* существенно не повышались для грибов, обработанных пенконазолом, экспрессия *CYP51A* в тех же изолятах повышалась в 100-130 раз относительно контроля (рисунок 12). Напротив, в присутствии 5 мкг/мл флудиоксонила происходило сильное повышение (в 180-220 раз) экспрессии гена *HK1*, в то время как экспрессия гена *CYP51A* повышалась не более чем в 6-11 раз.

Таким образом, пенконазол вызывает суперэкспрессию гена *CYP51A*, что не связано с резистентностью, но, по-видимому, является механизмом адаптации микромицета к токсическому соединению. Также эти данные по сверхэкспрессии *CYP51A* могут быть использованы для оценки чувствительности *F. oxysporum* к пенконазолу. Высказано предположение о том, что увеличение уровня мРНК коррелирует с увеличением в клетке уровня *CYP51A*, вызывая снижение чувствительности патогенов к азолам [Price *et al.*, 2015]. Флудиоксонил же вызывал суперэкспрессию гена *HK1*, и это коррелировало с высокой устойчивостью изолятов к фунгициду, что позволяет предположить участие этого фермента в формировании резистентности грибов. Дальнейшие исследования по влиянию фунгицидов на дифференциальную экспрессию различных генов необходимы для разработки новых стратегий контроля и понимания молекулярных механизмов развития резистентности фитопатогенных микромицетов к фунгицидам.

5. Экспрессия гипотетических генов ответа в растениях картофеля при инфекции *Fusarium* spp.

Иммунитет растений, защищающий их от абиотических и биотических факторов повреждения, регулируется рядом генов, называемых генами ответа или *PR*-генами [Zaynab *et al.*, 2017]. Некоторые из этих генов кодируют такие ферменты, как β-глюканазы и хитиназы, направленные на разрушение клеточной стенки грибов [Ali *et al.*, 2018]. Фермент пероксидаза синтезируется в растениях при любых стрессовых ситуациях, особенно при повреждении тканей растений [Isah, 2019]. В литературе описана роль продуктов генов *PR2*,

PR3 и *PR9* в защите растения томата при фузариозе, однако для картофеля роль этих генов в защите от фузариоза неизвестна.

Мы оценили уровни экспрессии мРНК генов β-1,3-глюканазы (*PR2*), хитиназы IV (*PR3*), и пероксидазы (*PR9*) в проростках растения картофеля сорта Жуковский ранний при инфицировании изолятами *F. oxysporum* AM7, AM8, AM10 и AM10 с помощью метода количественного ПЦР. Установлено, что при инфицировании растения картофеля в лабораторных условиях исследованные гены экспрессируются в проростках картофеля в разной степени (рисунок 13). Штаммы AM7, AM8 и AM14 вызывают значительное ($P<0.001$) повышение уровня экспрессии гена пероксидазы (180-213 раз) и в разной степени повышение экспрессии генов хитиназы IV (80-150 раз) и β-1,3-глюканазы (130-170 раз).

Заражение проростков изолятом *F. oxysporum* AM10, который проявлял умеренную способность вызывать сухую гниль клубней картофеля сортов Регги и Ред Скарлет, но не повреждал клубни сорта Жуковский ранний, привело к сверхэкспрессии только гена пероксидазы (170.2±1.99 раз). Относительная экспрессия генов хитиназы IV (30.78±3.75 раз) и β-1,3-глюканазы (40.92±2.79 раз) была значительно ниже по сравнению с другими изолятами *F. oxysporum*. Штамм AM10 вероятно является очень слабым патогеном картофеля, он не вызывает сухую гниль в клубнях сорта Жуковский ранний, а само растение в свою очередь не сверхсинтезирует белки ответа при инфицировании этим штаммом.

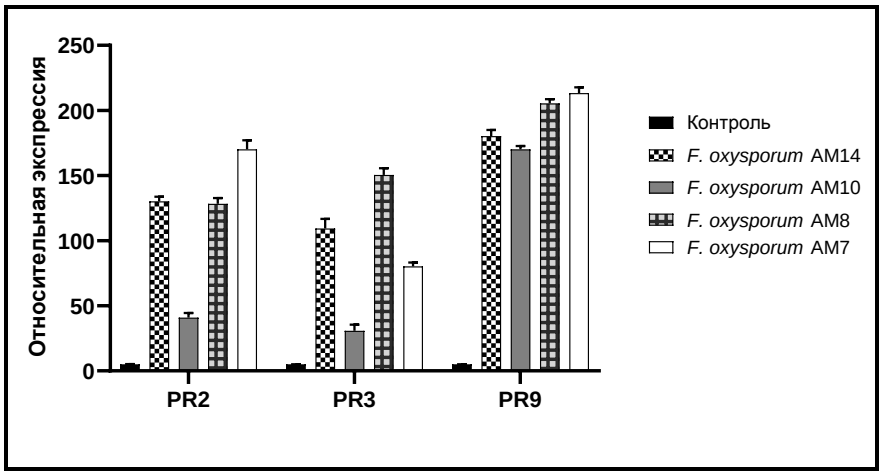

Рисунок 13. Количественная оценка уровня м-РНК PR-генов в проростках картофеля, зараженных изолятами *Fusarium* spp., выделенными из корневой шейки. Данные нормализованы в соответствии со значениями уровней экспрессии гена актина.

Аналогичные результаты по экспрессии *PR*-генов были получены для других сортов картофеля и других возбудителей. Например, недавно сообщалось о дифференциальной экспрессии PR-генов картофеля, связанных с сигнальным путем защиты в ответ на слабо- и высокоагрессивные изоляты *Verticillium dahliae* [Derksen *et al.*, 2013]. Установлено, что экспрессия *PR*-генов напрямую связана с развитием устойчивости растений картофеля к патогенам. Недавно было продемонстрировано, что экспрессия гена хитиназы риса в

генетически модифицированном картофеле придает устойчивость к патогенным видам родов *Fusarium* и *Rhizictonia* [Zaynab *et al.*, 2017]. Аналогичные результаты были получены для растений томата – близкого родственника картофеля [Jabeen *et al.*, 2015]. Установлено, что сверхэкспрессия генов *PR2* и *PR3* направлена на разрушение клеточной стенки патогена [Ali *et al.*, 2018]. Пониженная экспрессия этих генов в растениях, инфицированных изолятом АМ10, свидетельствует об отсутствии (или низкой) вирулентности изолята по отношению к данному сорту картофеля.

Таким образом, гены ответа по-разному активируются в растении картофеля в зависимости от типа и вирулентности фитопатогена, атакующего его. Повышение экспрессии гена пероксидазы может быть частью общего ответа картофеля на стресс при внедрении микромицетов, в то время как корреляция экспрессии генов хитиназы IV (*PR3*) и β-1,3-глюканазы (*PR2*) и вирулентности изолятов свидетельствует об участии этих генов в ответе картофеля на внедрение патогенных штаммов *F. oxysporum.*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным подходом к разработке новых стратегий контроля заболеваний картофеля и повышения его урожайности является исследование взаимодействия растений с их микробиотой, и в первую очередь микробиотой корней, в которой могут быть представлены микромицеты рода *Fusarium* – ключевые патогены различных растений. Мы впервые продемонстрировали значительные различия в составе грибной микробиоты, ассоциированной с разными компартментами корней картофеля сорта Жуковский ранний, культивируемого в серых лесных почвах Татарстана. Сравнительный анализ структуры и биоразнообразия грибного сообщества почвы и корней показал, что микобиота почвы стабильна, в то время как в грибных сообществах ризосферы и ризопланы наблюдаются значимые сдвиги в зависимости от стадии роста растения и севооборота. Полученные данные подтверждают преобладание патотрофов в прикорневой зоне растения картофеля сорта Жуковский ранний, что коррелирует с высокой чувствительностью этого сорта к фузариозу. Результаты нашей работы вносят фундаментальный вклад в глубокое понимание закономерностей формирования грибной микробиоты ризопланы корней картофеля, а также некоторых молекулярных механизмов ответа картофеля на фузариозную инфекцию. Полученные нами данные о влиянии фунгицидов флудиоксонила и пенконазола на экспрессию генов *Fusarium oxysporum* важны для выяснения механизма формирования устойчивости патогенов.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Сравнительный анализ грибной микробиоты ризосферы и ризопланы картофеля сорта Жуковский ранний выявил более высокое разнообразие видов в ризосфере (ОТЕ=320±30), чем в ризоплане (ОТЕ=170±20). Популяции *Fusarium* относятся к доминантным группам микромицетов, и их доли в ризосфере и ризоплане составляют 10.3% и 9.9% соответственно.

2. Структура грибных сообществ ризосферы и ризопланы картофеля отличается от структуры микобиоты серой лесной почвы и меняется в зависимости от стадии вегетации картофеля. Популяция *Fusarium* в ризосфере и ризоплане картофеля является одной из наиболее представленных групп во время цветения, но при созревании клубней картофеля доминирующей группой становится *Monographella*.

3. Анализ видового состава изолятов показал, что основным возбудителем трахеомикозной инфекции и сухой гнили картофеля в РТ является *Fusarium oxysporum.* Возбудители фузариозного увядания в разной степени способны вызывать сухую гниль клубней картофеля, развитие которой при искусственном инфицировании здоровых клубней зависит от свойств штамма *F. oxysporum* и сорта картофеля. Сорт Жуковский ранний проявляет высокую чувствительность в сравнении с сортами Ред Скарлет и Регги, что коррелирует с данными метагеномного анализа о доминирующем положении *Fusarium* в микробиоте корней сорта Жуковский ранний.

4. Штаммы *Fusarium oxysporum* проявляют резистентность к фунгициду флудиоксонилу в широком диапазоне концентраций и чувствительны к пенконазолу, который в концентрации 2 мкг/мл ингибирует рост колоний на 50-80%. При культивировании штаммов *F. oxysporum* в присутствии фунгицида пенконазола происходит индукция сверхэкспрессии гена стерол 14-α-деметилазы *CYP51A,* а в присутствии флудиоксонила – гена гистидин киназы *HK1*. Индукция гена *HK1* коррелирует с устойчивостью штаммов к флудиоксонилу.

5. Инфицирование картофеля изолятами *F. oxysporum* приводит к индукции экспрессии *PR*-генов (*PR2*, *PR3*, *PR9*), но в различной степени. Все изоляты вызывают повышение экспрессии гена пероксидазы (*PR9*) в 170-220 раз, в то время как уровень экспрессии генов хитиназы IV (*PR3*) и β-1,3-глюканазы (*PR2*) варьирует в зависимости от штамма.

Список статей, опубликованных по теме диссертации

1) **Akosah, Y. A.** *Fusarium oxysporum* strains from wilting potato plants: Potential causal agents of dry rot disease in potato tubers / Y. A. Akosah, S. G. Vologin, M. T. Lutfullin, G. F. Hadieva, N. F. Scyganova, F. F. Zamalieva, A. M. Mardanova // Research on Crops. – 2021. – V. 22. – P. 49-53. https://doi.org/10.31830/2348-7542.2021.012 (Scopus Q3 IF=0.25)

2) Kostennikova, Z. Molecular identification and comparative characterization of *Fusarium* isolates, obtained from potato plants / Z. Kostennikova, **Y. Akosah**, A. Mardanova // In E3S Web of Conferences. – 2020. – V. 222. – No. 02045. https://doi.org/10.1051/e3sconf/202022202045 (Scopus, Q3 IF=0.52)

3) Mardanova, A. Structure and variation of root-associated microbiomes of potato grown in alfisol / A. Mardanova, M. Lutfullin, G. Hadieva, **Y. Akosah**, D. Pudova, D. Kabanov, E. Shagimardanova, P. Vankov, S. Vologin, N. Gogoleva, Z. Stasevski // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2019. – V. 35, No. 12. – P. 181. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2761-3 9 (Scopus, WoS, Q2 IF=2.47)

4) **Акосах, Й. А.** Характеристика микромицетов рода *Fusarium* - возбудителей увядания и сухой гнили картофеля / Й. А. Акосах, А. М. Марданова // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 24-28. (РИНЦ).

5) Костенникова, З. С. Характеристика целлюлазной активности изолятов *Fusarium* spp., выделенных из ризосферы картофеля / З. С. Костенникова, Т. Е. Гритчина, **Й. А. Акосах**, А. М. Марданова // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – Пермь, 2020. – С. 142-145. (РИНЦ)

6) Миндубаев, А. З. Фосфиноксид как предполагаемый интермедиат биологических процессов / А. З. Миндубаев, **Й. А. Акосах**, Д. Г. Яхваров // Бутлеровские сообщения. – 2018. – Т. 53, № 3. – С. 1-34. Обзор. (РИНЦ, ВАК)

7) Хадиева, Г. Ф. Анализ микромицетов рода *Fusarium*, изолированных из инфицированных клубней картофеля, выращенных в Республике Татарстан / Г. Ф. Хадиева, М. Т. Лутфуллин, **Й. А. Акосах**, А. В. Малова, Н. К. Мочалова, С. Г. Вологин, З. Сташевский, А. М. Марданова // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. № 3. – С. 34-39. https://doi.org/10.24411/0235-2451-2018-10307 (РИНЦ, ВАК)

Тезисы и материалы конференций по теме диссертации

1) **Akosah, Y. A.** The influence of growth stage on the structure and formation of fungal microbiota in potato root / Y. A. Akosah, D. S. Pudova, S. G. Vologin, A. M. Mardanova // 2nd International Conference “Plants and Microbes: the Future of Biotechnology”. – Saratov, 2020. – P. 13.

2) Akosah, Y. A. Analysis of fungal community structure in the root microbiome of the potato cultivar Zhukovskij rannij / Y. A. Akosah, M. T. Lutfullin, G. F. Hadieva, S. G. Vologin, A. M. Mardanova // All Russian plant protection congress with international participation «Phytosanitary technologies in ensuring independence and competitiveness of the agricultural sector of Russia». – Saint Petersburg, 2019. – P. 210.

3) **Акосах, Й. А.** Устойчивость к флудиоксонилу микромицетов рода *Fusarium* / Й. А. Акосах, Н. Ф. Цыганова, А. М. Марданова // 73-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2020. – С. 11.

4) Цыганова, Н. Ф. Влияние вегетационного периода на формирование грибной микробиоты корней картофеля / Н. Ф. Цыганова, **Й. А. Акосах**, Т. Е. Гритчина, А. М. Марданова // Международная Пущинская Школа-конференция "Биология – наука XXI века". – Пущино, 2020. – С. 167.

5) Цыганова, Н. Ф. Резистентность к флудиоксонилу микромицетов рода *Fusarium* – возбудителей увядания и сухой гнили картофеля // Н. Ф. Цыганова, **Й. А. Акосах** // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2020». Подсекция «Микология и альгология». – Москва, 2020.
6) **Akosah, Y. A.** Effect of copper salt on white phosphorus biodegradation / Y. A. Akosah, A. Z. Mindubaev, E. V. Babynin // Vth International Conference “Actual Scientific & Technical Issues of Chemical Safety” (ASTICS-2020). – Kazan, 2020. – P. 92.
7) **Akosah, Y. A.** Isolation and characterization of *Fusarium* spp. causing dry rot disease in potato // Y. A. Akosah, N. F. Scyganova, A. M. Mardanova // Russian-German seminar dedicated to the 30th anniversary of partnership between Justus Liebig University Giessen and Kazan Federal University «Interaction form cell to human». – Kazan, 2019. – P. 35.
8) **Акосах, Й. А.** Оценка восприимчивости клубней разных сортов картофеля к *Fusarium* spp. – возбудителям сухой гнили / Й. А. Акосах, Н. Ф. Цыганова, С. Г. Вологин, А. М. Марданова // 72-я Всероссийская с международным участием школа-конференция молодых ученых «БИОСИСТЕМЫ: организация, поведение, управление». – Нижний Новгород, 2019. – С. 20.
9) **Акосах, Й. А.** Оценка патогенных свойств возбудителей фузариоза картофеля в Республике Татарстан / Й. А. Акосах // Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов – 2019». Подсекция «Микология и альгология». – Москва, 2019. – С. 1.
10) **Akosah, Y. A.** Resistance of different potato cultivars against latent infection of *Fusarium* spp. / Y. A. Akosah, A. V. Malova, G. F. Hadieva, M. T. Lutfullin, S. G. Vologin, A. M. Mardanova // International Scientific Conference "Plants and microbes: the future of biotechnology". – Ufa, 2018. – P. 8.
11) **Акосах, Й. А.** Восприимчивость различных сортов картофеля к *Fusarium* spp. – возбудителям сухой гнили / Й. А. Акосах, М. Т. Лутфуллин, Г. Ф. Хадиева, О. Э. Моисеева, С. Г. Вологин, А. М. Марданова // III Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы И Технологии XXI Века». – Казань, 2018. – С. 108.

E-mail автора: akosah2005@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров и Ученому секретарю Диссертационного совета КФУ.03.07 Кравцовой Ольге Александровне, E-mail: okravz@yandex.ru