

В.А. Яковлева, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник
Ю.В. Цветкова, младший научный сотрудник
А.А. Кузнецова, старший научный сотрудник
 Всероссийский центр карантина растений
 РФ, 140150, Московская обл., г. Раменское, р.п. Быково, ул. Пограничная, 32
 E-mail: yakovleva_va@mail.ru

УДК 632.4.01/08

DOI: 10.30850/vrsn/2022/2/60-64

РЕЗУЛЬТАТЫ АПРОБАЦИИ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОКОЯЩИХСЯ ЗООСПОРАНГИЕВ *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* (SCHILB.) PERC. В ОБРАЗЦАХ ПОЧВЫ И ПРОВЕДЕНИЯ БИОПРОВЕРКИ ДЛЯ СНЯТИЯ КАРАНТИНА С ОЧАГОВ

В российских исследовательских лабораториях для проведения прямого тестирования почвенных образцов на присутствие зооспорангиев возбудителя рака картофеля *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. используют метод флотации в четыреххлористом углероде (высокотоксичный препарат). В работе представлены результаты по апробации и совершенствованию метода выделения зооспорангиев гриба из почвенных образцов с использованием суспензии каолина и 40%-го р-ра хлорида кальция. Данный метод рекомендован диагностическим протоколом Европейской организации по карантину и защите растений. Для снятия карантина с очагов рака картофеля наряду с прямым тестированием почвы необходимо проводить лабораторную биологическую проверку с использованием восприимчивого к раку сорта картофеля. Цель работы – апробация и совершенствование метода выделения зооспорангиев *S. endobioticum* из почвенных образцов с помощью нетоксичных для персонала веществ (суспензия каолина и 40%-й р-р хлорида кальция), а также элементов лабораторной биологической проверки почвы на отсутствие жизнеспособных спор гриба с использованием восприимчивого сорта картофеля. В статье представлены экспериментальные данные по отработке элементов биологической проверки для получения достоверных результатов. Применение усовершенствованного метода с каолином и хлоридом кальция позволило выделить значительное количество спор целевого организма во всех протестированных почвенных образцах, включая торфянистую почву. Проведена детализация, подробно описаны использованные в экспериментах элементы биологической проверки почвы на зараженность *S. endobioticum*, по результатам которой снимается карантин с очагов рака картофеля. Их применение позволит получать достоверные результаты зараженности почвы жизнеспособными зооспорангиями *S. endobioticum* (поражение более 50 % растений в положительном контроле), на основании этого они могут быть рекомендованы для использования в лабораторной практике.

Ключевые слова: карантин растений, рак картофеля, *Synchytrium endobioticum*, биологическая проверка.

V.A. Yakovleva, PhD in Biological sciences, Leading Researcher
Yu.V. Tsvetkova, Junior Researcher
A.A. Kuznetsova, Senior Researcher
 All-Russian Plant Quarantine Center
 RF, 140150, Moskovskaya obl., g. Ramenskoe, r.p. Bykovo, ul. Pogranichnaya, 32
 E-mail: yakovleva_va@mail.ru

RESULTS OF APPROBATION AND IMPROVEMENT OF METHODS FOR DETECTION OF RESTING *SYNCHYTRIUM ENDOBIOTICUM* (SCHILB.) PERC. ZOOSPORANGIA IN SOIL SAMPLES AND BIOTESTING TO REMOVE QUARANTINE FROM OUTBREAKS

In Russian research laboratories for direct testing of soil samples for the presence of zoosporangia of the causative agent of potato wart disease *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. use the flotation method in carbon tetrachloride (highly toxic preparation). The paper presents the results of approbation and improvement of the method for isolating fungus zoosporangia from soil samples using a suspension of kaolin and 40% calcium chloride solution. This method is recommended by the European Plant Protection Organization's diagnostic protocol. In order to remove the quarantine from the foci of potato wart disease, along with direct testing of the soil, it is necessary to conduct a laboratory biological test using a potato variety susceptible to scab. The purpose of the work is to test and improve the method for isolating *S. endobioticum* zoosporangia from soil samples using substances that are non-toxic for personnel (kaolin suspension and 40 % calcium chloride solution), as well as elements of a laboratory biological soil test for the absence of viable fungal spores using susceptible potato variety. The article presents experimental data on the development of elements of biological testing to obtain reliable results. Application of the improved method with kaolin and calcium chloride was resulted to allocate the significant amount of target organism spores organism in all soil samples tested, including peaty soil. Detailing was carried out, the elements used in the experiments of the soil biological testing for infestation with *S. endobioticum*, which were used in the experiments are described in detail, as a result of which quarantine is removed from the foci of potato wart disease. Their usage will allow obtaining reliable results about soil contamination with viable *S. endobioticum* zoosporangias (damage to more than 50 % of plants in positive control), on the basis of which they can be recommended for using in laboratory practice.

Keywords: plant quarantine, potato wart disease, *Synchytrium endobioticum*, bioassay.

К числу карантинных видов, связанных с картофелем, относится возбудитель рака — гриб *Synchytrium endobioticum*. Это заболевание распространено во многих странах мира, в том числе и на территории РФ. Несмотря на жесткие карантинные меры, применяемые на государственном уровне, проблема рака картофеля остается актуальной. Очаги *S. endobioticum*, среди них и вирулентные патотипы, выявлены в странах, почвенно-климатические условия которых считались неблагоприятными для его жизнедеятельности (Болгария, Греция, Грузия, Турция, Тунис). [1-3, 5-7]

Большой фитосанитарный риск связан с проникновением в РФ новых вирулентных патотипов *S. endobioticum* с импортируемыми партиями семенного и продовольственного картофеля, а также другого посадочного материала, выращенного в зараженной почве. Эти данные свидетельствуют об актуальности применения достоверных методов тестирования почвы на выявление спор гриба и определения их жизнеспособности.

В российских лабораториях для выявления зимних покоящихся зооспорангиев *S. endobioticum* в почвенных образцах используют метод флотации в четыреххлористом углероде. Он обладает высокой чувствительностью, не требует специального оборудования и позволяет получить результаты тестирования в короткое время. Однако данный метод не позволяет получать достоверные результаты при выделении спор из почв с большим количеством органики, например, из торфянистой почвы, в связи с флотацией большого количества органических частиц, что затрудняет просмотр препаратов при микроскопировании. Кроме того, четыреххлористый углерод как летучее высокотоксичное вещество, может быть опасным для персонала лабораторий.

На основании анализа методов прямого тестирования почвы на выявление спор гриба был выбран и апробирован наиболее перспективный для применения в лабораторной практике — метод экстракции зооспорангиев гриба с использованием каолина и хлорида кальция, рекомендованный диагностическим протоколом Европейской организации по карантину и защите растений (ЕОКЗР). [4]

Для снятия карантина с очагов рака картофеля должны быть получены данные об отсутствии жизнеспособных зооспорангиев гриба в почве с использованием метода прямого выделения спор патогена из почвы с последующим определением их жизнеспособности при микроскопировании в сочетании с методом биологического тестирования в контролируемых условиях с использованием восприимчивого к выявленному патотипу *S. endobioticum* сорта картофеля. [4] Это связано с тем, что не всегда микроскопирование позволяет определить жизнеспособность зооспорангиев из-за наличия у гриба переходных состояний протопласта — от зернистых, жизнеспособных до проросших, пустых. Проведение биологического тестирования с провокационной посадкой восприимчивой культуры картофеля — процесс длительный и трудоемкий, но позволяет получить надежные результаты при поражении патогеном не менее 50% клубней в положительном контроле.

Цель работы — апробация и совершенствование метода выделения зооспорангиев *S. endobioticum* из

почвенных образцов с помощью нетоксичных для персонала веществ (суспензия каолина и 40%-й р-р хлорида кальция), а также элементов лабораторной биологической проверки почвы на отсутствие жизнеспособных спор гриба с использованием восприимчивого сорта картофеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для апробации метода прямого тестирования почвы на присутствие спор гриба *S. endobioticum* с применением суспензии каолина и хлорида кальция использовали искусственно зараженную супесчаную почву в вариантах — 500, 5 000 и 20 000 зооспорангиев/100 г почвы. Искусственное заражение почвы проводили следующим образом: из инфекционного порошка, полученного путем растирания в фарфоровой ступке высушенных наростов рака и последующего просеивания через набор сит, получили фракцию, собранную с сита с диаметром отверстий 0,25 мкм, содержащую зимние зооспорангии гриба. Затем добавляли дистиллированную воду и рассчитывали концентрацию зооспорангиев в 1 мл полученной суспензии. Определенное количество суспензии с известной инфекционной нагрузкой смешивали с почвенной навеской.

Кроме того, совершенствование данного метода выделения зооспорангиев гриба проводили с использованием зараженного компоста, состоящего из перегнивших наростов рака картофеля, супесчаной и торфянистой почв, отобранных с очагов рака картофеля с неизвестной степенью зараженности.

Апробацию метода прямого тестирования почвы с каолином и 40%-м р-ом хлорида кальция (удельный вес 1,4) проводили в точном соответствии со стандартом ЕОКЗР. [4]

В ходе проведенных экспериментов метод усовершенствовали, при этом улучшились результаты по количеству выделяемых зооспорангиев в сочетании с уменьшением трудоемкости. Например, изменили первую часть метода — использовали сухое просеивание образцов почвы без промывания водой.

Воздушно-сухой образец почвы массой 100 г просеивали через два сита (75 и 25 мкм) и перемещали в колбы объемом 250 мл. Масса просеянной почвы может быть различна в зависимости от типа почвы. Рекомендуется каждые 10...15 г навески помещать в отдельную колбу. Таким образом, при навеске массой 50 г необходимо 4...5 колб. Предварительно в колбах растворяли 1 г каолина в 30 мл воды. Далее навеску почвы, смешанную с суспензией каолина, помещали на шейкер на 15 мин., после перемещали в центрифужные пробирки с завинчивающимися крышками. Остатки почвы вымывали из колбы водой, которую также сливали в пробирки, которые центрифугировали при 3000 об/мин. 5 мин. Супернатант удаляли и пробирки заполняли насыщенным раствором хлорида кальция (удельный вес 1,4). Пробирки тщательно встряхивали вручную, после этого центрифугировали при 3000 об/мин. 5 мин. Супернатант сливали в стеклянные стаканы и оставляли отстаиваться на ночь. Просматривали по 2 мл супернатанта, что составило примерно 14 стекол.

В качестве контрольного метода использовали метод выделения зооспорангиев *S. endobioticum*

с использованием четыреххлористого углерода, применяемого в настоящее время лабораториями для выявления зооспорангиев рака картофеля.

Образцы воздушно-сухой почвы массой 100 г измельчали в фарфоровой ступке и просеивали через сито с отверстиями 75 мкм, тщательно перемешивали и отбирали навеску почвы 5 г, помещали в пробирки и заливали тремя объемами четыреххлористого углерода. Повторность — трехкратная. Далее пробирки закрывали резиновыми пробками, тщательно встряхивали вручную. Взвесь отстаивали 10...20 мин., всплывшую органику осторожно сливали на часовые стекла и оставляли до полного испарения четыреххлористого углерода. Все работы выполняли в вытяжном шкафу. Полученный осадок переносили на предметные стекла и просматривали в капле воды или смеси глицерина с водой под микроскопом при увеличении $\times 100...400$.

Для отработки метода биопроверки посадки клубней проводили 18 февраля и 19 марта. В первый срок посадки тестировали супесчаную почву с очага рака картофеля, во второй — супесчаную почву с этого же очага и зараженную *S. endobioticum* торфянистую почву из лизиметра карантинного участка ФГБУ ВНИИКР. Сажали клубни сорта *Лорх* в пластиковые ящики — по 8 шт. в каждый для тестирования почвы. Повторность — трехкратная.

На дно ящиков насыпали слой чистого песка — 3...4 см, на него помещали клубни картофеля с пророщенными в темноте глазками, размер ростков — не более 3 мм. Затем клубни засыпали тестируемой почвой. Таким же образом высаживали клубни в ящики с положительным и отрицательным контролем. Толщина слоя почвы над клубнями — не менее 5 см. В ящики, предназначенные для положительного контроля, насыпали чистый увлажненный песок, сверху супесчаную незараженную почву, в которую погружали клубни таким образом, чтобы верхушка оставалась над поверхностью почвы на 1...2 см. На верхушку каждого клубня с пророщенными глазками помещали инфекционный компост. Его готовили следующим образом — измельченные свежесобранные раковые наросты смешивали с речным песком (1:3) и хранили несколько месяцев в увлажненном состоянии, затем в сухом.

Инфекционная нагрузка — 15 г зараженного компоста на один клубень. Перед использованием компост увлажняли. Клубни засыпали почвой, стараясь не перемещать компост с верхушек клубней, толщина слоя почвы над клубнями — не менее 5 см.

Клубни отбирали небольшого размера (4...5 см) без признаков проявления заболеваний, с несколькими проклюнувшимися ростками.

С момента посадки и до уборки почву регулярно опрыскивали в первые три недели, затем поливали, направляя воду вдоль стенок ящиков, не допуская переувлажнения. В помещении фиксировали температуру и влажность. Для получения достоверных результатов биопроверки следили, чтобы температура воздуха в первые 30 дн. не превышала 16...19°C, далее до уборки — 20...22°C. Во время вегетации рас-

тений стебли несколько раз подрезали на высоту 25...30 см от поверхности почвы.

При уборке подсчитывали количество зараженных растений и степень поражения в баллах в зависимости от величины сформированных наростов: 1 — величина наростов до 1 см, 2 — 1...3, 3 — более 3 см. С помощью лупы исследовали обнаруженные подозрительные изменения на поверхности клубней, стеблях или столонах. Для выявления патогена такие участки растений изучали под микроскопом на наличие сорусов с летними и/или зимними спорами гриба.

Учет первого срока посадки проведен через 100 дн., второго — через 70 дн.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные, полученные методом прямого тестирования почвы для выявления *S. endobioticum* с помощью промывания образцов через два сита и использования каолина и 40%-го р-ра хлорида кальция представлены в таблице 1.

Проведенные эксперименты показали низкую эффективность методов прямого тестирования почвы. Наибольшее количество зооспорангиев выделено в контрольном методе с использованием четыреххлористого углерода. Однако и в этом методе количество выделенных зооспорангиев составило: 4,2 % (вариант 3), 9,9 (2) и 36,2 % (вариант 1). Возможно, это связано с большими потерями спор на разных стадиях: частицы образца остаются на поверхности сит, пробирок, пробок. При работе с торфянистыми почвами данный метод практически неприменим, так как на часовом стекле оказывается много субстратных частиц почвы, что при просмотре сильно затрудняет поиск зооспорангиев, а также значительно увеличивает временные затраты на просмотр препаратов.

Для лабораторной практики необходим альтернативный метод, в котором не используют токсичные вещества. Кроме того, для работы с четыреххлористым углеродом требуется отдельное помещение, специальные условия хранения и утилизации.

В методе тестирования с применением каолина и раствора хлорида кальция целевой организм выявлен во всех зараженных почвенных образцах, включая торфянистую почву, но в значительно

Таблица 1.
Сравнительное испытание методов тестирования почвенных образцов на присутствие зооспорангиев *S. endobioticum*

Образец	Количество выделенных спор <i>S. endobioticum</i> из 100 г почвы	
	четырёххлористый углерод	каолин и хлорид кальция
Вариант 1 (500 спор/100 г)	180,87±44,9*	9,03 ±2,40**
Вариант 2 (5000 спор/100 г)	492,64±53,66	2,1 ±0,82
Вариант 3 (20 000 спор/100 г)	849,45±54,52	9,43 ±2,52
Торфянистая почва с очага	Не проводилось	2,7 ±1,15
Супесчаная почва с очага	230,2±44,7	3,16 ±0,85
Отрицательный контроль	0	0

Примечание. Среднее значение находили путем просмотра: * часового стекла в каждой повторности; ** 10 предметных стекол-каждой повторности.

меньшем количестве, чем в контроле. Учитывая преимущества данного метода (отсутствие токсичных веществ, доступность реактивов), нами проанализированы возможные потери спор гриба в процессе их выделения и проведены эксперименты по совершенствованию метода. В частности, промывание образца было заменено на сухое просеивание. Поиск зооспорангиев проводили не только в каплях, отобранных с поверхности солевого раствора (согласно диагностическому протоколу ЕОКЗР), но и из толщи раствора и со дна. Это связано с тем, что единичные зооспорангии имеют меньший удельный вес, чем раствор, и всплывают на поверхность. Однако в пробе имеются кусочки растительной ткани с сорусами, обладающие большим удельным весом, поэтому они могут находиться в толще раствора или оседают на дно. Результаты эксперимента с применением усовершенствованного метода (промывание образца заменено на сухое просеивание) показаны в таблице 2.

При применении усовершенствованного метода во всех протестированных почвенных образцах выделено значительное количество спор целевого организма.

Сравнительный эксперимент показал, что контрольный метод с четыреххлористым углеродом более чувствительный при тестировании песчаных почв, метод с применением каолина позволяет обнаруживать целевой объект во всех типах почв, а при тестировании торфянистой почвы превосходит контрольный.

Учитывая, что методы прямого тестирования почвы могут не всегда давать точные результаты по ее

зараженности *S. endobioticum* и определять жизнеспособность спор, для снятия карантина с очагов рака картофеля в осенне-зимний период проводится биологическая проверка отобранных почвенных образцов.

В экспериментах обрабатывали различные элементы метода биопроверки, позволяющие получить достоверные результаты, как описано в методической части — подбор и подготовка клубней к посадке, особенности посадки и инфицирования клубней в положительном контроле, полив растений и уход за ними в процессе вегетации, температурный режим, сроки посадки, длительность опыта, особенности и учет результатов.

При наблюдении за опытными растениями во время их вегетации и при уборке отмечено типичное проявление заболевания — формирование наростов над поверхностью почвы — зеленого цвета, под землей — белого (см. рисунок, 2-я стр. обл.).

Результаты биологической проверки считаются достоверными при поражении не менее 50 % клубней картофеля в положительном контроле. При посадке 19 марта и уборке через 70 дн. был получен высокий результат заражения контрольных растений — 86 %, а 18 февраля и уборке через 100 дн. — 64 % (табл. 3).

В соответствии с полученными результатами, использованные в опыте детализированные элементы проведения биопроверки позволили получить достоверные результаты зараженности почвы жизнеспособными зооспорангиями *S. endobioticum* и могут быть рекомендованы для практического применения. Учет биопроверки через 70 дн. следует считать минимальным сроком учета, необходимым для формирования хорошо заметных наростов, а срок учета 100 дн. — максимальным. Превышение данного срока может привести к началу гниения наростов и клубней.

Таблица 2.

Выявление зооспорангиев рака картофеля усовершенствованным методом флотации с каолином и хлоридом кальция

Образец	Количество выделенных зооспорангиев, шт.*			
	поверхность	средняя часть	дно	всего
Песчаная почва с очага	123	27	36	186
Торфянистая почва с очага	161	79	63	303
Компост	251	53	162	466

Примечание. * Результаты анализа 10 микропрепаратов.

Таблица 3.

Результаты биологического тестирования почвы в лабораторных условиях

Образец	Учет через, дн.			
	70		100	
	Количество, %			
	пораженных растений	растений с наростами 2 и 3 балла	пораженных растений	растений с наростами 2 и 3 балла
Супесчаная почва	61	29	61	57
Торфянистая почва	43	67	Не тестировали	—
Положительный контроль	86	58	64	56
Отрицательный контроль	0	0	0	0

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Çakir, E. A new pathotype of *Synchytrium endobioticum* in Turkey: pathotype 2/ E. Çakir, F. Demirci // Bitki Koruma Bülteni. — 2017. — № 57(4). — P. 415–422.
2. Dimitrova, L. Occurrence of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in Bulgaria: identification of pathotype(s) present/ L. Dimitrova, M. Laginova, A. Becheva, van Leeuwen GCM // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2011. — № 41(2). — P. 195–202.
3. EPPO Global Database. *Synchytrium endobioticum* [Electronic source]. URL.: <https://gd.eppo.int/taxon/SYN-CEN/distribution>.
4. EPPO Standard PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin. — 2017. — № 47. — P. 420–440. [Electronic source] URL.: <https://gd.eppo.int/standards/PM7>.
5. Ghogoberidze, S. Occurrence of the pathotype 38 of *Synchytrium endobioticum* in Khulo municipality of Georgia/ S. Ghogoberidze, Z. Sikharulidze, T. Tsetskhladze et al. // Bulletin of the Georgian national academy of sciences. — 2020. — № 14(1). — P. 114–119.
6. Laginova, M. Initial studies of potato varieties resistance to *Synchytrium endobioticum* in Bulgaria/ M. Laginova, L. Dimitrova // Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. — 2009. — № 39(1). — P. 72.
7. Vloutoglou, I. First report of potato wart disease caused by *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in Greece: de-

tection, impacts and pathotype identification/ I. Vloutoglou, van Leeuwen GCM, H. Eleftheriadis et al. // Abstract of a paper presented at the 16th Hellenic Phytopathological Congress (Thessaloniki, GR, 2012-10-16/18). Hellenic Plant Protection Journal. – 2015. – P. 9.

LIST OF SOURCES

1. Çakir, E. A new pathotype of *Synchytrium endobioticum* in Turkey: pathotype 2/ E. Çakir, F. Demirci // *Bitki Koruma Bülteni*. – 2017. – № 57(4). – P. 415–422.
2. Dimitrova, L. Occurrence of potato wart disease (*Synchytrium endobioticum*) in Bulgaria: identification of pathotype(s) present/ L. Dimitrova, M. Laginova, A. Becheva, van Leeuwen GCM // *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. – 2011. – № 41(2). – P. 195–202.
3. EPPO Global Database. *Synchytrium endobioticum* [Electronic source]. URL.: <https://gd.eppo.int/taxon/SYN-CEN/distribution>.
4. EPPO Standard PM 7/28 (2) *Synchytrium endobioticum*. EPPO Bulletin. – 2017. – № 47. – P. 420–440. [Electronic source] URL.: <https://gd.eppo.int/standards/PM7>.
5. Ghoghoberidze, S. Occurrence of the pathotype 38 of *Synchytrium endobioticum* in Khulo municipality of Georgia/ S. Ghoghoberidze, Z. Sikharulidze, T. Tsetskhladze et al. // *Bulletin of the Georgian national academy of sciences*. – 2020. – № 14(1). – P. 114–119.
6. Laginova, M. Initial studies of potato varieties resistant to *Synchytrium endobioticum* in Bulgaria/ M. Laginova, L. Dimitrova // *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*. – 2009. – № 39(1). – P. 72.
7. Vloutoglou, I. First report of potato wart disease caused by *Synchytrium endobioticum* (Schilb.) Perc. in Greece: detection, impacts and pathotype identification/ I. Vloutoglou, van Leeuwen GCM, H. Eleftheriadis et al. // Abstract of a paper presented at the 16th Hellenic Phytopathological Congress (Thessaloniki, GR, 2012-10-16/18). Hellenic Plant Protection Journal. – 2015. – P. 9.