

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ОЦЕНКЕ СОРТОВ КАРТОФЕЛЯ НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КЛУБНЕВОЙ НЕМАТОДЕ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Шестеперов А. А. ¹,

доктор биологических наук, профессор,
главный научный сотрудник лаборатории фитопаразитологии,
aleks.6perov@yandex.ru

Грибоедова О. Г. ¹,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории фитопаразитологии

Бутенко К. О. ¹,

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник лаборатории фитопаразитологии

Аннотация

Клубневая нематода *Ditylenchus destructor* является возбудителем дитиленхоза, или сухой гнили картофеля, и наносит значительный ущерб урожаю как в период вегетации, так и при хранении. Разработаны методы оценки сортов картофеля на устойчивость к клубневой нематоде в лабораторных условиях для сокращения срока поиска источника или донора нематодоустойчивости. Представлены методы получения суспензии клубневой нематоды, методы инокуляции клубней, методика оценки сортов картофеля на восприимчивость и устойчивость к клубневой нематоде *Ditylenchus destructor*. Заражение клубней проводят путём внесения суспензии нематод в раны, нанесённые на клубни картофеля. Были испытаны 6 способов. Наилучшее заражение и размножение нематод происходило при внесении нематод на «решётки», «дырочки», «пирамидки». В зависимости от величины среднего балла поражения дитиленхозом и размножением клубневой нематодой сортообразцы распределяют на 5 групп: высокоустойчивые (средний балл 0), устойчивые (0,1–1), среднеустойчивые (1,1–3), восприимчивые (3,1–4), сильно восприимчивые (4,1–5).

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (117218, г. Москва, ул. Б. Черемушкинская, д. 28)

Ключевые слова: клубневая нематода *Ditylenchus destructor*, картофель, нематоустойчивый сорт.

METHODOLOGICAL INSTRUCTIONS FOR ASSESSING POTATO VARIETIES FOR RESISTANCE TO STRAWBERRY NEMATODE UNDER LABORATORY CONDITIONS

Shesteperv A. A.¹,

Doctor of Biological Sciences, Professor,
Chief Researcher of the Laboratory of Phytoparasitology,
aleks.6perov@yandex.ru

Griboyedova O. G.¹,

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Phytoparasitology

Butenko K. O.¹,

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Laboratory of Phytoparasitology

Abstract

The tuber nematode *Ditylenchus destructor* is the causative agent of ditylenchiasis, or dry rot of potatoes, and causes significant damage to the crop both during the growing season and during storage. Methods for evaluating potato varieties for resistance to tuberous nematode in laboratory conditions have been developed to reduce the search term for a source or donor of nematode resistance. Methods for obtaining a suspension of a tuber nematode, methods of inoculation of tubers, a method for assessing potato varieties for susceptibility and resistance to the tuberous nematode *Ditylenchus destructor* are presented. Infection of tubers is carried out by introducing a suspension of nematodes into the wounds inflicted on the potato tubers. 6 methods were tested. The best infection and reproduction of nematodes occurred when nematodes were introduced into the “lattice”, “holes”, “pyramids”. Depending on the value of the average score of the lesion by ditylenchiasis and reproduction by the tuber nematode, the varieties are divided into 5 groups: highly resistant (average score 0), resistant (0.1–1), moderately resistant (1.1–3), susceptible (3.1–4), highly susceptible (4.1–5).

¹ All-Russian Scientific Research Institute for Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plant – a branch of the Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia)

Keywords: tuber nematode *Ditylenchus destructor*, potato, nematode-resistant variety.

Введение. Клубневая нематода *Ditylenchus destructor* является возбудителем дитиленхоза, или сухой гнили картофеля, и наносит значительный ущерб урожаю как в период вегетации, так и при хранении [7].

Влияние фитопаразитической нематоды *D. destructor* на растения картофеля проявляется в задержке роста, снижении урожайности, уменьшении количества товарных клубней [1, 2]. Дитиленхи зимуют в клубнях картофеля в подвижной стадии [3]. Поэтому потери клубней в период хранения могут достигать 40% и более в зависимости от сорта, репродукции семян, температуры хранения, течения эпифитотического процесса при дитиленхозе [1, 3, 5].

Решающим звеном в системе комплексных мероприятий по борьбе с другими опасными фитогельминтозами (глободероз, мелойдогиноз) является применение нематодоустойчивых сортов картофеля [6, 8]. Использование нематодоустойчивых сортов является одним из мощных рычагов, с помощью которых возможно многолетние подавления численности фитогельминтов в почве и обеспечении эффективной защиты растений от них без массированного применения химических средств.

Устойчивых к клубневой нематодой сортов картофеля не обнаружено в России, Белоруссии, Украине и в других странах [2, 4, 5, 7, 8, 9, 10].

Поэтому необходима оценка существующих сортов картофеля на устойчивость к клубневой нематодой картофеля для последующей совместной работы селекционеров и фитопаразитологов по созданию устойчивых к дитиленхозу сортов.

Первым требованием программы на дитиленхоустойчивость должно быть обнаружение источника и донора устойчивости, которые могут быть вовлечены в селекцию. Источник – это образец (сорт, форма, вид) обладающий свойством устойчивости к фитогельминту. Однако не установлена причина устойчивости, может ли данное свойство передаваться потомству и какова генетическая природа устойчивости. Донор – это источник устойчивости, изученный в селекционно-генетическом отношении, и устойчивость которого достаточно легко передается другим сортам и гибридам [6].

В литературе описано несколько способов создания искусственного инвазионного фона: внесение в каждую лунку при посадке порезан-

ных заражённых клубней, оборачивание клубней смоченной суспензией нематод фильтровальной бумагой, внесение в лунки при посадке среды с живыми нематодами, заражение клубней суспензией нематод. Однако сложность создания искусственного инвазионного фона заключается в том, что эти методы сложны в использовании, а результаты противоречивы и неоднозначны [1, 3, 5, 10]. Кроме того, все они применяются при создании искусственного инвазионного фона в условиях полевого опыта, который можно проводить исключительно в вегетационный сезон. Для ускорения же оценки сортов необходимо проводить опыты и в условиях лаборатории круглогодично.

В связи с этим актуальным является разработка метода оценки сортов картофеля на устойчивость к клубневой нематоды в лабораторных условиях для сокращения срока поиска источника или донора нематодоустойчивости.

Целью работы была разработка методики лабораторной оценки сортов картофеля на устойчивость к клубневой нематоды *Ditylenchus destructor*.

Материалы и методы. Объектами исследований служили клубни картофеля отечественной и иностранной селекции и суспензия нематод *D. destructor*.

Создание инокулюма для инвазирования клубней разных сортов картофеля

Для создания инокулюма необходимо получить суспензию клубневой нематоды, которую получают при их культивировании на клубнях картофеля, дисках корнеплодов моркови и на мицелии гриба *Alternaria tenuis*.

Культивирование клубневой нематоды в клубнях картофеля

Наиболее целесообразным методом искусственного заражения клубней для получения инвазионного материала является метод их заражения суспензией дитиленхов. Предварительно нематод пипеткой отлавливают из чашки Петри с кусочками заражённого картофеля и переносят в энтомологические пробирки. Нематод трижды промывают стерильной водой, т. е. после того как нематоды опустились на дно пробирки, верхний слой воды отсасывают пипеткой и добавляют стерильной воды. Когда нематоды опускаются на дно пробирки, операцию повторяют. Суспензию нематод (50–100 экз. в 1–3 каплях) вносят в вырез внешне здорового клубня, предварительно промытого

водой и протёртого спиртом. Через два-три месяца при температуре +8 °С численность нематод возрастает до 300–500 особей.

Культивирование дитиленхов на кружочках моркови

Предназначенные для использования корнеплоды моркови тщательно промывают под струёй воды, погружают в 5%-ный раствор хлорамина на 45 минут, дважды промывают в стерильной воде, обрезают верхний слой, поврежденный хлорамином, нарезают кружочками и раскладывают по 8–10 кружочков в стерильные банки с пластмассовыми завинчивающимися крышками. Дитиленхов, предназначенных для инокуляции, 3–5 раз промывают стерильной водой. В стерильную банку объемом 250 мл с кружочками моркови вносят 80–120 особей нематод. После 30 дней культивирования в термостате при 27 °С нематоды размножаются в большом количестве (16 000–17 000 экз.) и скапливаются на стенках банок и внутри корнеплодов. Используемая методика позволяет получить суспензию нематод, свободную от крахмальных зерен, кусочков субстрата, от мицелия грибов и спор.

*Культивирование клубневой нематоды на грибе *Alternaria tenuis**

В качестве питательного субстрата для культивирования гриба используют картофельно-глюкозный агар (картофель очищенный – 200 г, агар – 20 г, глюкоза – 20 г на один литр воды). Для выращивания культуры гриба применяют биологические пробирки на 20 мл, и биологические матрасы на 2 литра с ватномарлевыми пробками. В пробирки наливают по 10 мл среды, в матрасы – по 200 мл. Пробирки и матрасы с горячей средой после автоклавирования при 1 атм. в течение 45 минут скашивают таким образом, чтобы субстрат полностью покрывал поверхность ёмкостей. Гриб, посеянный на питательный субстрат уколом или суспензией, выращивают 5–10 дней в термостате при 26–27 °С. Нематод в грибные культуры вносят после того, как разросшийся грибной мицелий покрывает всю поверхность питательного субстрата. В одну пробирку рекомендуются вносить 100 особей нематод. Пробирки хранят в термостате при 27 °С. Через 30–40 дней от 100 особей можно получить от 2 до 3 тысяч нематод. В биологические матрасы помещают по 300–5000 нематод. Через 30–40 дней число нематод возрастает в 80–100 раз. Для очистки суспензии нематод от культуральной среды используют вороночный метод с использованием молочных фильтров или слоя гигроскопической ваты (1–2 см).

Приготовление инокулюма нематод

Однородная популяция жизнеспособных нематод может быть получена как из заражённых клубней, так и размножением на дисках корнеплодов моркови или на мицелии гриба *Alternaria*. Сравнение патогенных свойств инвазионного материала из клубня и размноженного искусственно показало одинаковую их способность к заражению.

Суспензию клубневых нематод, полученную из инвазированных клубней или из пробирок с грибами, трижды промывают стерильной водой, т. е. после того как нематоды опустились на дно пробирки, верхний слой воды отсасывают пипеткой и добавляют стерильной воды. Когда нематоды опускаются на дно пробирки, операцию повторяют. При прополаскивании в обильном количестве стерильной воды можно получить суспензии нематод достаточно чистые от других организмов. Фитогельминтов можно стерилизовать в 1%-ном растворе сульфата стрептомицина или других антибиотиков. Основное условие инокуляции клубней нематодами — сохранение их жизнеспособности и инвазионности.

После взмучивания в пробирке осаждение личинок на дно происходит за 0,5 часа. Численность личинок определяется количеством нематод в 1 капле суспензии, исходя из среднего числа личинок в 3 отдельных каплях после взмучивания в пробирке и отбора пипеткой суспензии из середины пробирки. В дальнейшем путем изменения объёма воды доводим плотность суспензии личинок до требуемой, например, 50 или 100 экземпляров в 1–3 каплях.

Хранят суспензию личинок в открытых пробирках в холодильнике при $t +6 +80$ °С, каждые 4–5 дней из-за испарения в пробирке добавляют воду.

Инокуляция

Заражение клубней проводят путём внесения суспензии нематод в раны, нанесённые на клубни картофеля. Были испытаны следующие способы нанесения ран на эпидерму и перидерму клубней:

- «**решётка**» — иссечение поверхности клубня скальпелем в виде решётки;
- «**иголки**» — прокалывание поверхности клубня иглой Ø0,6 мм;
- «**дырочки**» — прокалывание поверхности клубня иглой Ø1,0 мм;
- «**срез**» — срезание перидермы клубня «крышечкой» с последующим «прикрыванием» раны срезанным участком;

- «**пирамидки**» — вырезание куска клубня в виде перевёрнутой пирамиды с последующим возвратом вырезанного кусочка на рану;
- «**трубочки**» — в клубень втыкали коктейльную трубочку Ø5 мм, в которую вносили суспензию нематод.

Поверхность ран составляла 100 мм² (за исключением «**трубочки**»), глубина 0,8–1 мм (за исключением «**пирамидки**» и «**трубочки**», глубина которых составляла 3–5 мм).

Наилучшее заражение и размножение нематод происходило при внесении нематод на «**решётки**», «**дырочки**», «**пирамидки**», что объясняется тем, что данные способы не позволяли каплям с суспензией нематод стекать с поверхности клубня, а глубина ранок была необходимой и достаточной для попадания нематод под перидерму клубня.

От каждого испытуемого сорта отбирают 6 крупных внешне здоровых клубня, предварительно промытых водой и протёртых спиртом. Их помещают в пластиковые с 6 углублениями плашки с этикетками с указанием сорта и датой инокуляции.

В двух местах клубня наносят ранки в виде «**решётки**», «**дырочки**» или «**пирамидки**» стерильным инструментом. После пипеткой вносят нематод. Плашки с клубнями помещают в полиэтиленовые мешки, которые не завязывают. Весной и летом их хранят в холодильнике при +5–8 °С в течение нескольких месяцев. Осенью и зимой их хранят в биксах в прохладном месте при 15–18 °С.

На каждые 10 сортообразцов включают в оценку на нематодоустойчивость сорта-стандарта: сильновосприимчивый (Удача, Голубезна, Ривьера) и относительно устойчивый к нематоду (Белорусский 3).

Оценка восприимчивости или устойчивости клубней разных сортов картофеля

Обычно оценку восприимчивости сортов начинают с клубней восприимчивого сорта-стандарта. На испытуемом клубне в зоне внесения инокулюма осматривают поверхность клубня, с целью оценить проявление дитиленхоза (слабое, среднее, сильное). При слабом поражении дитиленхозом, признаки поражения можно наблюдать, лишь сняв с клубня кожицу. В местах проникновения паразита можно обнаружить белые, желтые, светло-коричневые пятна рыхлой ткани, в которой под биноклем можно увидеть нематод и их яйца.

При среднем и сильном поражении на поверхности клубней наблюдается переход от светло-, темно-коричневых, коричневых участков

ткани с рыхлым содержанием до свинцово-серых пятен, которые постепенно, соединяясь, темнеют и приобретают тёмно-коричневую окраску, с характерным металлическим блеском.

После оценки поражения клубня дитиленхозом осторожно в зоне инокулюма срезают скальпелем кусочек ткани размером 1 кв. см и переносят его в воду чашки Петри. В чашке Петри этот кусочек измельчают и оставляют в воде на 3–5 часов. Подсчёт численности клубневых нематод в чашках Петри ведут под бинокуляром МБС-1 или МБС-2 при увеличении в 40–60 раз. Если пробы не успевают просмотреть в тот же день, то чашки Петри с нематодами помещают в холодильник и сохраняют при температуре +5–8 °С.

Результаты исследований. Испытание считается достоверным, если большинство клубней восприимчивого сорта (стандарт) поразится дитиленхозом в средней и сильной степени (табл. 1).

Таблица 1

Шкала оценки устойчивости клубней к клубневой нематоде

Балл	Реакция растений
0	заражение нематодами не выявлено
1	симптомов поражения дитиленхозом нет, заражение клубневой нематодой слабое (1–10 особей на один клубень)
3	симптомы слабого и среднего поражения дитиленхозом, слабое заражение нематодами (11–90 особей на один клубень)
5	интенсивное поражение дитиленхозом и заражение нематодами (более 100 особей на один клубень)

На основе оценки растений рассчитывают средний балл развития дитиленхоза по формуле:

$$P = \frac{\Sigma(B \times n)}{N},$$

где Σ – сумма произведений числа клубней (n) на соответствующий балл (B) оценки; N – общее число оцененных клубней данного сортаобразца.

В зависимости от величины среднего балла сортаобразцы распределяют на 5 групп: высокоустойчивые (средний балл 0), устойчивые (0,1–1), среднеустойчивые (1,1–3), восприимчивые (3,1–4), сильно восприимчивые (4,1–5).

Заключение. Разработаны методы оценки сортов картофеля на устойчивость к клубневой нематоде в лабораторных условиях для сокращения срока поиска источника или донора нематодоустойчивости. Представлены методы получения суспензии клубневой нематоды, методы инокуляции клубней, методика оценки сортов картофеля на восприимчивость и устойчивость к клубневой нематоде *Ditylenchus destructor*.

Литература

1. Бутенко К.О. Нематоды картофеля Центрального региона России: Фауна, эпифитотология, меры борьбы: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2004. 231 с.
2. Иванюк В.Г., Банадысов С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Мн.: РУП «Белорусский НИИ картофелеводства», 2003. 550 с.
3. Ильяшенко Д.Ф. Особенности проявления дитиленхоза картофеля и меры борьбы с ним в условиях Беларуси: автореф. дис. ... канд. с.-х. наук. Прилуки, 2006. 19 с.
4. Рябцева Н.А. Дитиленхоз картофеля в зависимости от разновидностей сорта // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. 2015. № 6(128). С. 31-35.
5. Федоренко С.В. Разработка лабораторного метода оценки устойчивости к дитиленхозу селекционного материала картофеля // В книге: Биотехнология: достижения и перспективы развития. Сборник материалов III международной научно-практической конференции. 2018. С. 44-46.
6. Шестенеров А.А. и др. Создание нематодоустойчивых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур: учеб. пособие // РГАЗУ. М., 2004. 97 с.
7. Шестенеров А.А. и др. Дитиленхозы сельскохозяйственных культур и декоративных растений и меры борьбы с ними: учебное пособие. Изд. ФГБОУ ВПО РГАЗУ. 2014. 178 с.
8. Шнаар Д. Защита растений в устойчивых системах земледелия (в 4-х книгах) / под общей редакцией доктора с.-х. наук, профессора, иностранного члена РАСХН Д. Шнаара. Книга 3. 2004. 337 с.
9. Kim Y., Yang J. Recent research on enhanced resistance to parasitic nematodes in sweetpotato // Plant Biotechnology Report. 08 August 2019. № 13. P. 559-566.
10. Mwaura P., Niere B., Vidal S. Resistance and tolerance of potato varieties to potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*) // Annals of Applied Biology. 2015. Vol.166, Issue 2. P. 257-270.

References

1. Butenko K.O. Potato nematodes of the Central region of Russia: Fauna, epiphytothiology, control measures: Dis. Cand. Biol. Sci. Moscow, 2004. 231 p. (In Russ.)
2. Ivanyuk V.G., Banadisov S.A., Zhuromsky G.K. Protection of potatoes from diseases, pests and weeds. Minsk, RUE “Belarusian Research Institute of Potato”, 2003. 550 p. (In Russ.)
3. Ilyashenko D.F. Features of manifestation of potato ditylenchosis and measures to control it in the conditions of Belarus. Thesis by Dis. Cand. Agr. Sci., 2006. 19 p. (In Russ.)
4. Ryabtseva N.A. Potato ditylenkhoz depending on the variety of cultivar. *Bulletin of the Altai State Agrarian University*. 2015; 6(128): 31-35. (In Russ.)
5. Fedorenko S.V. Development of a laboratory method for assessing the resistance of potato breeding material to ditylenchiasis. In the book: *Biotechnology: achievements and development prospects. Collection of materials of the III international scientific and practical conference*. 2018. P. 44-46. (In Russ.)
6. Shesteperv A.A. et al. Creation of nematode-resistant varieties and hybrids of agricultural crops. Textbook. RGAZU. Moscow, 2004. 97 p. (In Russ.)
7. Shesteperv A.A. et al. Ditylenkhoses of agricultural crops and ornamental plants, and measures to control them. Textbook. Moscow, 2014. 178 p. (In Russ.)
8. Shpaar D. Plant protection in sustainable farming systems (in 4 books). 2004. Book 3. 337 p. (In Russ.)
9. Kim Y., Yang J. Recent research on enhanced resistance to parasitic nematodes in sweetpotato. *Plant Biotechnology Report*. 08 August 2019; 13: 559-566.
10. Mwaura P., Niere B., Vidal S. Resistance and tolerance of potato varieties to potato rot nematode (*Ditylenchus destructor*) and stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*). *Annals of Applied Biology*. 2015; 166(2): 257-270.