

ПЦР-диагностика *Colletotrichum coccodes* в листьях картофеля и томата с некротическими пятнами на территории Европейской части России

Г.Л. Белов¹, Е.М. Чудинова², А.Ф. Белосохов³, М.А. Побединская³, В.Н. Зейрук¹, Л.Ю. Кокаева^{1,3},
И.А. Кутузова³, С.Н. Еланский^{2,3}

1 – ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха, 140051, Московская обл., Люберецкий район, п. Красково, ул. Лорха, д. 23;

2 – Российский университет дружбы народов, Москва, Россия;

3 – Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация

В работе с помощью ПЦР с видоспецифичными праймерами исследовано распространение фитопатогенного гриба *Colletotrichum coccodes* на листьях картофеля и томата с сухими некротическими пятнами, похожими на поражение альтернариозом. Образцы листьев были собраны в 2015-2017 годах в разных регионах Европейской части России. Всего было проанализировано 96 образцов листьев, содержащих грибную ДНК. Выявлено присутствие видоспецифичного для *C. coccodes* участка ДНК в 8 образцах ДНК пораженных листьев томата из Ростовской области, 5 образцах листьев томата из Краснодарского края, в одном образце из Ростовской области. В образцах листьев картофеля *C. coccodes* встречался реже, чем в листьях томата. Он был выявлен всего в 5 образцах листьев: в одном пораженном листе из Северной Осетии, одном листе из Костромской области и в трех образцах из Марий Эл.

Ключевые слова: *Colletotrichum coccodes*, картофель, антракноз, черная пятнистость клубней, ПЦР, тест-система

Для ссылки: Г.Л. Белов, Е.М. Чудинова, А.Ф. Белосохов, М.А. Побединская, В.Н. Зейрук, Л.Ю. Кокаева, И.А. Кутузова, С.Н. Еланский. ПЦР-диагностика *Colletotrichum coccodes* в листьях картофеля и томата с некротическими пятнами на территории Европейской части России // Защита картофеля. – 2019. – №1. – С. 3-8.

Colletotrichum coccodes (Wallr.) S. Hughes (синоним *C. atramentarium* (Berk. & Broome) Taubenh.) – фитопатогенный гриб, поражающий разные органы картофеля, томата и некоторых других растений. На пораженных клубнях гриб вызывает заболевание, известное под названием черная пятнистость (black dot). Заболевание вызывает расслоение кожуры, что сильно портит внешний вид клубня и приводит к потере воды при хранении. Симптомы черной пятнистости на клубне похожи на серебристую паршу, вызываемую несовершенным грибом *Helminthosporium solani* Dur. et Mont. Однако в отличие от серебристой парши на пораженных черной пятнистостью частях клубня хорошо заметны черные точки склероциев и конидиом (conidiomata) гриба. При поражении корней, столонов, подземной части стеблей также наблюдается расслоение верхнего слоя тканей, слущивание эпидермиса, появление темных пятен и сухих язв, покрытых черными точками (Ingram, Johnson, 2010). Черная пятнистость распространена в большинстве картофелепроизводящих регионов мира; потери от этого заболевания на чувствительных сортах могут достигать 30% урожая (Johnson, Miliczky, 1993; Johnson, 1994; Tsrer et al., 1999).

Поражение листьев и надземной части стеблей картофеля наблюдалось в экспериментах при искусственном повреждении кутикулы с помощью пескоструйного аппарата и последующем периоде высокой влажности, причем поражение надземных органов приводило к высоким потерям урожая (Nitzan et al., 2006; Johnson, 1994, Mohan et al., 1992). При заражении подобным образом живых зеленых листьев наблюдались некротические пятна, похожие на поражение альтернариозом, но без концентрических окружностей. По краям некротических пятен часто наблюдалось пожелтение, при дальнейшем развитии болезни листья увядали (Johnson, Miliczky, 1993). Агрессивные изоляты способны заражать и неповрежденные листья (Andrivon et al., 1998). Развитие заболевания на листьях и других надземных частях растений приводит к массовому развитию спор, которые распространяются на другие органы разбрызгиванием с каплями дождя или поливной воды. При уборке картофеля споры с листьев попадают на поврежденные клубни и заражают их.

Поражение листьев наблюдается и в том случае, если источником заболевания служит почва или зараженный семенной клубень. В этом случае гриб может долго существовать в растении в виде латентной инфекции; поражение листьев и надземной части стеблей наблюдается лишь в самом конце вегетации,

Автор для переписки: С.Н. Еланский
E-mail: snelansky@gmail.com

при начале естественного усыхания ботвы (Nitzan et al., 2006; Otazu et al., 1978).

На плодах томата *C. coccodes* (и некоторые другие виды рода *Colletotrichum*) вызывает опасное заболевание, известное под названием антракноз. Заражается зеленый плод, но поражение развивается на зрелых плодах томата. На зрелом плоде проявляются

хорошо заметные концентрические размягченные очаги с черными точками склероциев и конидиом в центре. Источником инокулюма при заражении могут быть пораженные листья (Dillard, 1987), с которых споры каплями дождя разбрызгиваются на другие листья и плоды.

Таким образом, и на картофеле, и на томате развитие

Таблица 1. Места сбора пораженных образцов

Место сбора	Дата сбора, сорт	Описание места сбора
Томат крупноплодный		
Краснодарский край, Темрюкский р-н	10.08.14 Неизвестен	Коммерческие посадки. Ботва в целом зеленая, поражение слабое. Орошение капельное.
Краснодарский край, Славянск-на Кубани	10.08.14 Разные сорта	Коммерческие посадки. Сильное поражение большинства кустов и плодов на них. Верхнее орошение.
Ростовская обл., Ростовский р-н	29.07.14 Линда	Коммерческие посадки. Сильное поражение отдельных кустов. Много созревших плодов с гнилью. Листья зеленые с засушенными некрозами. Верхнее орошение.
Ростовская обл., Армавирский р-н, поле 1	31.07.14 Рио Браво	Коммерческие посадки. Поражение растений слабое. Плоды созревшие без гнили. Отобраны для анализа листья зеленые с засушенными некрозами. Верхнее орошение.
Ростовская обл., Армавирский р-н, поле 2	31.07.14 Неизвестен	Коммерческие посадки. Сильное поражение отдельных кустов. Много созревших плодов с гнилью. Листья зеленые с засушенными некрозами. Верхнее орошение.
Тамбовская обл., Мичуринский р-н,	01.08.15 Разные сорта	Частный огород. Поражение слабое. Листья зеленые, на некоторых симптомы альтернариоза. Плоды зеленые разного размера.
Костромская обл., Сусанинский р-н	20.08.15 Неизвестен	Частный огород. Теплица. Зеленые листья, поражение отдельных листьев (некрозы).
Картофель		
Респ. Северная Осетия, с. Михайловское	10.08.15 Гибриды	Селекционный участок. Ботва в целом зеленая. Конец вегетации. Листья с некрозами.
Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	15.09.15 Неизвестен	Частный огород. Ботва увядающая, поражение сильное, много засохших листьев.
Московская обл, Люберецкий р-н	25.08.15 Санте	Коммерческие посадки. Ботва в целом зеленая, начало увядания. Листья с некрозами.
Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рогачево	22.08.15 Неизвестен	Коммерческие посадки. Ботва зеленая, поражение слабое и среднее. Для анализа отобраны зеленые листья с симптомами альтернариоза.
Костромская обл., Костромской р-н, с. Стрельниково	18.08.15 Неизвестен	Коммерческие посадки. Ботва зеленая, сильное поражение большинства кустов (симптомы фитофтороза и альтернариоза). Для анализа отобраны зеленые листья с симптомами альтернариоза.
Костромская обл., Сусанинский р-н	18.08.15 Альвара	Коммерческие посадки. Ботва зеленая, поражение слабое. Отдельные листья с симптомами альтернариоза.
Вологодская обл., Грязовецкий р-н	17.08.15 Неизвестен	Частный огород. Ботва зеленая, поражение слабое. Листья с некрозами, похожими на альтернариоз.
Новгородская обл, оз. Ильмень	5.08.15 Неизвестен	Частный огород. Ботва в целом зеленая, поражение слабое. Листья с некрозами.
Карелия, пос. Ляскела	15.08.15 Неизвестен	Частный огород. Ботва в целом зеленая, поражение слабое. Для анализа отобраны листья с симптомами альтернариоза.

C. coccodes на листьях может привести к развитию очагов заболевания и снизить урожай. Дождливая погода или верхний полив ускоряют распространение спор на здоровые листья и плоды. Несмотря на высокую значимость развития возбудителя черной пятнистости на листьях, исследований, посвященных изучению листовой формы *C. coccodes*, в мире практически не проводили.

Настоящая работа посвящена изучению распространенности *C. coccodes* на листьях картофеля и томата в России с помощью ПЦР-диагностики без выделения чистых культур.

Материалы и методы

Сбор образцов

Пораженные образцы листьев картофеля собирали с коммерческих полей и приусадебных посадок в Московской, Новгородской, Вологодской, Костромской областях, республиках Марий Эл, Северная Осетия, Карелия. Листья томата собирали в Тамбовской,

в СТАВ буфере. ДНК очищали с использованием хлороформа и хранили в деионизованной воде при -20°C . Полученные растворы сильно отличались по концентрации и по чистоте ДНК, в связи с чем в каждой пробе измеряли концентрацию выделенной ДНК. Измерение концентрации и чистоты выделенной ДНК проводили на спектрофотометре «NanoDrop 2000» (“Thermo scientific”, США) при длине волны 260 нм. После определения концентрации рабочий раствор ДНК доводили до 50 нг/мкл.

ПЦР амплификация

Амплификацию ДНК проводили в 25 мкл раствора, содержащего около 50 нг ДНК, по 200 мкМ каждого дезоксирибонуклеотидтрифосфата (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), по 0,2 мкМ каждого праймера (табл. 1), 2,5 ед Taq-полимеразы (Евроген, Россия) в буфере, предоставленном производителем Taq-полимеразы. Для проверки контаминации реакционной смеси и эффективности ПЦР в каждый эксперимент

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Название	Последовательность нуклеотидов праймера	Температура отжига	Ссылка
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC	54	White et al., 1990
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA		Gardes, Bruns, 1993
Cc1NF1	5'-TGCCGCCTGCGGACCCCT	66	Cullen et al, 2002
Cc2NR1	5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA		

Костромской, Ростовской областях и в Краснодарском крае (табл. 1). При сборе образцов брали не более 1 листа с куста. Кусты выбирали находящиеся друг от друга не ближе 5 м. В каждом месте сбора отбирали для анализа по 20-25 образцов зеленых, не увядших листьев с четкими темными некрозами, похожими на поражение альтернариозом. Сорванные листья немедленно помещали в 70% этиловый спирт, чтобы препятствовать развитию вторичной микробиоты на мертвой ткани. Сбор проводили в августе - сентябре, когда сформировавшиеся клубни картофеля и плоды томата достигли товарного размера, однако ботва еще оставалась зеленой.

Выделение ДНК

После доставки в лабораторию листья целиком растирали в жидком азоте, после чего лизировали

включали отрицательный (вода, свободная от ДНК и РНК) и положительный контроли (ДНК чистой культуры *C. coccodes* и ДНК листа, в котором были предварительно выявлены склероции *C. coccodes* с помощью микроскопирования). Амплификацию проводили на термоциклере Biometra T1. Программа ПЦР включала денатурацию ДНК в течение 3 мин при 94°C , далее 30 циклов: 94°C в течение 30 с, температура отжига согласно таблице 1 (30 с), 72°C (45 с); после прохождения всех циклов 72°C в течение 5 мин. После амплификации ПЦР-продукт разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле с добавленным в него бромистым этидием (0,5 мкг/мл) в $0,5\times$ Trisborate EDTA (ТБЕ) при 100В и постоянной мощности в течение приблизительно 1 часа. Визуализировали и фотографировали результаты

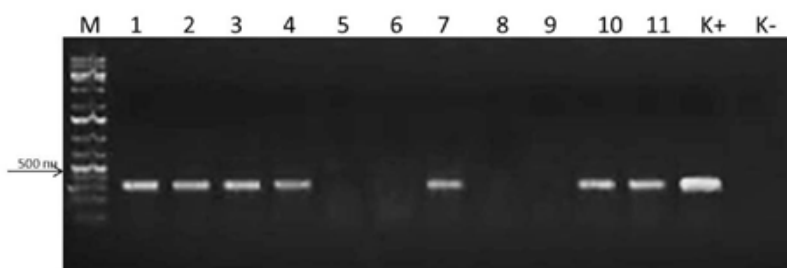


Рис. 1. Электрофореграмма амплифицированных фрагментов ДНК образцов из Ростовской области с праймерами Cc1NF1 и Cc2NR1. 1-10 – образцы фиксированных в этаноле листьев, 11 – ДНК из листа, содержащего мицелий и склероции *C. coccodes*; K+ – ДНК чистой культуры *C. coccodes*; K- – отрицательный контроль (вместо ДНК – деионизованная вода).

электрофоретического разделения с использованием UVP ImageStore 7500 UV Transilluminator (UVP Inc., Upland, CA).

Результаты

У 20-25 образцов листьев из каждого места сбора была выделена тотальная ДНК. При анализе ДНК, выделенной из образцов фиксированных листьев, сначала проводили амплификацию с праймерами ITS1F и ITS4, которые избирательно амплифицируют ДНК большинства аско- и базидиомицетов. Для дальнейшей работы оставляли только те пробы, в которых прошла реакция с праймерами ITS1F и ITS4. Для избирательной амплификации видоспецифичного для *C. coccodes* участка ДНК в выделенной тотальной ДНК пораженного листа использовали

видоспецифичные праймеры Cc1NF1 и Cc2NR1, подобранные к ITS региону рДНК (табл. 2). Пример электрофоретического разделения продуктов реакции с праймерами Cc1NF1 и Cc2NR1 приведен на рис. 1.

Результаты проведенного исследования показали присутствие видоспецифичного для *C. coccodes* участка ДНК в 13 образцах листьев томата: в 7 образцах ДНК пораженных листьев томата из Ростовской области, 5 образцах листьев томата из Краснодарского края, а также в одном образце из Ростовской области.

В образцах листьев картофеля *C. coccodes* встречался реже, чем в листьях томата. Он был выявлен всего в 5 образцах листьев: в одном пораженном листе из Северной Осетии, одном листе из Костромской области и в трех образцах из Марий Эл.

Таблица 3. Анализ пораженных листьев картофеля и томата

Место сбора	Проанализированные образцы	
	Число проверенных образцов*	Число образцов с ДНК <i>C. coccodes</i> **
Томат крупноплодный		
Краснодарский край, Темрюкский р-н	15	0
Краснодарский край, Славянск-на Кубани	18	5
Ростовская обл., Ростовский р-н	13	7
Ростовская обл., Армавирский р-н, поле 1	13	0
Ростовская обл., Армавирский р-н, поле 2	12	1
Тамбовская обл., Мичуринский р-н,	17	0
Костромская обл., Сусанинский р-н	4	0
Всего томат	92	13
Картофель		
Респ. Северная Осетия, с. Михайловское	10	1
Респ. Марий Эл, г. Йошкар-Ола	12	3
Московская обл, Люберецкий р-н	24	0
Московская обл., Дмитровский р-н, пос. Рогачево	3	0
Костромская обл., Костромской р-н, с. Стрельниково	12	1
Костромская обл., Сусанинский р-н	3	0
Вологодская обл., Грязовецкий р-н, с. Ростилово	12	0
Новгородская обл, оз. Ильмень	9	0
Карелия, пос. Ляскела	11	0
Всего картофель	96	5

Прим. * – число образцов с положительной пробой с праймерами ITS 1F и ITS4;

** – число образцов с положительной пробой с праймерами Cc1NF1 и Cc2NR1

Обсуждение

Проведенные нами исследования показали присутствие *S. coccodes* в зеленых листьях картофеля и томата с сухими некротическими пятнами, похожими на симптомы поражения альтернариозом. Исследование проводили с использованием видоспецифичных праймеров Cc1NF1 и Cc2NR1 (Cullen et al, 2002). Эти праймеры использовали для детекции *S. coccodes* в плодах авокадо, манго, маракуйи и персика в Бразилии (Tozze et al., 2015), подтверждения морфологической идентификации чистой культуры штамма, выделенного из пораженных плодов перца в США (Lewis Ivey et al., 2004), идентификации *S. coccodes* в почве, используемой для посадок семенного картофеля (Brierley et al., 2009).

В данной работе высокая доля образцов с *S. coccodes* была обнаружена на полях с сильно пораженными растениями томата из Ростовской области (Ростовский район) и Краснодарского края (около г. Славянск-на-Кубани). На обоих полях применяли верхнее орошение, что могло стимулировать распространение *S. coccodes* среди растений. Также образец с *S. coccodes* был выявлен в Ростовской области (около г. Армавир) на поле с сильно пораженными растениями томата.

На картофеле пробы с присутствием *S. coccodes* были обнаружены в сборах из Северной Осетии, Марий Эл и Костромской области. На полях Северной Осетии и Костромской области растения во время сбора образцов были зеленые и активно вегетировали. В Северной Осетии поражение растений было слабым, на кустах были отдельные листья с симптомами альтернариоза. В Костромской области на поле отмечалось сильное поражение растений фитофторозом и альтернариозом. В Марий-Эл сбор образцов проводили в самом конце вегетации растений, за несколько дней до уборки. На поле наблюдалось сильное поражение растений возбудителями листовых пятнистостей и начало усыхания ботвы. На этом поле были выявлены листья, содержащие *S. coccodes*. В целом это согласуется с наблюдениями других авторов (Nitzan et al., 2006), которые также отмечали поражение листьев искусственно зараженных растений в самом конце вегетации.

Таким образом, проведенная работа показала присутствие *S. coccodes* в листьях картофеля и томата в разных регионах России. В южных регионах на отдельных полях томата отмечена высокая доля образцов пораженных листьев томата, содержащих *S. coccodes*. Эти поля орошались дождевальными установками; на пораженных кустах большинство плодов было поражено гнилями. На полях картофеля присутствие исследуемого гриба в пораженных листьях отмечали значительно реже; влияние поражения листьев на урожай клубней и их качества требует дальнейшего исследования.

Работа поддержана грантом Президента РФ № 075-15-2019-077.

Список цитированной литературы

- Andrison, D., Lucas, J. M., Guerin, C., and Jouan, B.. Colonization of roots, stolons, tubers, and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black-dot fungus *Colletotrichum coccodes*. // Plant Pathol. 1998. V.47. P. 440-445.
- Brierley J.L., Stewart J.A., Lees A.K. Quantifying potato pathogen DNA in soil // Applied Soil Ecology. 2009. V. 41(2). P. 234-238.
- Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR // Plant Pathology. 2002. V.51(3). P. 281-292.
- Dillard H.R. Tomato Anthracnose. Fact sheet. New York State Agricultural Experiment Station, Geneva. 1987. P. 735-70. http://vegetablemndonline.ppath.cornell.edu/factsheets/Tomato_Anth.htm
- Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts // Molecular ecology. 1993. V. 2(2). P. 113-118.
- Ingram J., Johnson D.A. Colonization of Potato Roots and Stolons by *Colletotrichum coccodes* from Tuberborne Inoculum // Am. J. Pot Res. 2010. V. 87. P.382-389.
- Johnson D. A., Miliczky E.R. Effects of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum coccodes* // Plant Dis. 1993. V. 77. P. 13-17.
- Johnson, D. A.. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. // Plant Dis. 1994. V.78. P. 1075-1078.
- Lewis Ivey M.L., Nava-Diaz C., Miller S.A. Identification and management of *Colletotrichum acutatum* on immature bell peppers // Plant disease. 2004. V. 88(11). P. 1198-1204.
- Mohan S. K., Davis J. R., Sorensen L. H., and Schneider A. T. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and yield // Am. Potato J. 1992. V.69. P. 547-559.
- Nitzan N., Evans M., and Johnson D.A. Colonization of potato plants after aerial infection by *Colletotrichum coccodes*, causal agent of potato black dot. // Plant Dis. 2006. V.90. P. 999-1003.
- Otazu, V.; Gudmestad, N. C.; Zink, R. T., The role of *Colletotrichum atramentarium* in the potato wilt complex in North Dakota // Plant Disease Reporter. 1978. V.62(10). P. 847-851.
- Tozze Júnior H.J., Firmino A.C., Fischer I.H., Furtado E.L., Massola Júnior N.S. Characterization of *Colletotrichum spp.* isolates associated with fruit trees in the state of São Paulo // Summa Phytopathologica. 2015. V. 41. №. 4. P. 270-280.
- Tsrer (Lakhim), L., Erlich, O., and Hazanovsky, M. Effect of *Colletotrichum coccodes* on potato yield, tuber quality and stem colonization during spring and autumn // Plant Dis. 1999. 83. P. 561-565.
- White, T.J., T. Bruns, S.J.W.T. Lee, J.W. Taylor. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. 1990. V.18(1). P. 315-322.

Поступила в редакцию: 05.07.2019

Опубликовано: 15.11.2019

PCR diagnostics of *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves with necrotic spots in the European part of Russia

G.L. Belov¹, E.M. Chudinova², A.F. Belosokhov³, M.A. Pobedinskaya³, V.N. Zeyruk¹, L.Yu. Kokaeva^{1,3},
I.A. Kutuzova³, S.N. Elansky^{2,3}

¹ All-Russian Lorh Research Institute of Potato Farming, 140051, Moscow Region, Lyubertsy District, Kraskovo, Lorh st., 23;

² - Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia;

³ - Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia.

Abstract

PCR with species-specific primers was used to study the distribution of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum coccodes* on potato and tomato leaves with dry necrotic spots. The presence of a DNA region specific for *C. coccodes* was detected in DNA samples isolated from infected tomato leaves collected in the Rostov region (8 samples) and the Krasnodar Territory (5 samples). In the case of potato leaf samples, the frequency of *C. coccodes* detection was lower than in tomato leaves. This fungus was revealed only in five potato leaf samples: one from the Northern Ossetia, one from the Kostroma region, and three from the Mariy El Republic.

Keywords: *Colletotrichum coccodes*, anthracnose, black dot, potato diseases, tomato diseases