

УДК 632.93

DOI 10.35244/11-04

ПЦР-ДИАГНОСТИКА *COLLETOTRICHUM COCCODES* В ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ

Г.Л. Белов, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защиты растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха».

А.Ф. Белосохов, аспирант МГУ имени М.В. Ломоносова.

И.А. Кутузова, лаборант кафедры общего земледелия и агроэкологии МГУ имени М.В. Ломоносова.

Л.Ю. Кокаева, кандидат биологических наук, научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова.

С.Н. Еланский, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник МГУ имени М.В. Ломоносова.

В.Н. Зейрук, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник - заведующий лабораторией защиты растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха».

М.К. Деревягина, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории защиты растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха».

С.В. Васильева, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории защиты растений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха».

Аннотация: В статье с помощью ПЦР с видоспецифичными праймерами исследовано распространение гриба *Colletotrichum coccodes* на листьях картофеля с симптомами, 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. *C. coccodes* был найден в пяти образцах: 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.

Введение

Несовершенный гриб *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes является одним из вредоносных фитопатогенов. *C. coccodes* способен поражать не менее 35 растений-хозяев из 13 семейств, в том числе из тыквенных, бобовых и пасленовых [3]. Он вызывает заболевания картофеля, известные под названиями «антракноз» или «черная пятнистость» клубней картофеля. Болезнь встречается почти во всех регионах, где сажают картофель. Развивается преимущественно в годы с сухим и жарким летом на раннеспелых сортах.

C. coccodes может поражает все подземные части (дочерние клубни, столоны и корни), базальные стебли [1] и листву [6-8] растения картофеля.

Симптомы черной пятнистости на клубне похожи на серебристую паршу (*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, отслоение эпидермиса, появление темных пятен и сухих язв, покрытых черными точками [5]. Черная пятнистость распространена в большинстве картофелепроизводящих регионов мира; потери урожая от этого заболевания на чувствительных сортах могут достигать 30% [6, 7].

Основным источником распространения антракноза являются пораженные семенные клубни. Несмотря на высокую значимость развития возбудителя черной пятнистости на листьях, исследований, посвященных изучению листовой формы *C. coccodes*, в мире практически не проводили. Поэтому высокую значимость приобретают способы экспресс-диагностики патогена. Лучше всего для этого подходят методы, основанные на идентификации специфичных участков последовательностей генома с помощью Полимеразной Цепной Реакции (ПЦР).

Материалы и методы

В работе использована тест-система, разработанная шотландскими исследователями [2], для идентификации гриба *C. coccodes*. Работа тест-системы проверена с помощью компьютерного моделирования на имеющихся в базе Genbank сиквенсах, на чистых культурах коллекционных изолятов из разных регионов России и Европы. Все изоляты из имеющейся коллекции были протестированы с этими праймерами. Во всех случаях был получен специфичный для вида *C. coccodes* ПЦР-продукт. При амплификации ДНК других видов рода *Colletotrichum* и других грибов, встречающихся на картофеле, ПЦР-продукта не образовывалось. Амплификация прошла успешно с ДНК из пораженных антракнозом клубней и наблюдалось отсутствие продукта амплификации с ДНК здоровых клубней. В целом,

эта тест-система отличалась высокой чувствительностью и специфичностью.

По результатам проведенных экспериментов было принято решение о целесообразности ее использования в дальнейшей работе для подтверждения видовой специфичности изолятов в чистых культурах и для идентификации *S. coccodes* в пораженных органах растений при анализе в период вегетации картофеля.

Образцы листьев картофеля с четкими темными некрозами, похожими на поражение альтернариозом, отбирали в Московской, Новгородской, Вологодской, Костромской областях, республиках Марий Эл, Северная Осетия, Карелия (таблица 2). Сорванные листья немедленно после сбора фиксировали в 70% этиловом спирте, чтобы препятствовать развитию вторичной микобио-

ты на мертвой ткани. Всего было зафиксировано 154 образца пораженных листьев картофеля.

После доставки в лабораторию листья полностью растирали в жидком азоте, после чего лизировали в СТАВ буфере. Полученные растворы сильно отличались по концентрации и по чистоте ДНК, в связи с чем в каждой пробе измеряли концентрацию выделенной ДНК на спектрофотометре «NanoDrop 2000». После определения концентрации рабочий раствор ДНК доводили до 50 нг/мкл.

Выделенную ДНК использовали для амплификации с праймерами ITS 1F и ITS4, которые избирательно амплифицируют ДНК большинства аско- и базидиомицетов. Для дальнейшей работы оставляли только те пробы, в которых прошла реакция с этими прайме-

Таблица 1 – 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'-TGCCGCCTGCGGACCCCCCT	66	Cullen et al, 2002
Cc2NR1	5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA		

рами (96 проб, таблица 1). 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, 2,5 ед Taq-полимеразы (Евроген, Россия) в буфере, предоставленном произ-

Таблица 2 – Встречаемость *C. coccodes* в листьях картофеля из разных регионов России

Район сбора образцов	Количество проанализированных образцов ^a	Количество образцов, содержащих ДНК <i>C. coccodes</i> ^b
Северная Осетия, с. Михайловское	10	1
Республика Марий Эл, г. Йошкар-Ола	12	3
Московская область, Люберецкий район	24	0
Московская область, Дмитровский район, с. Рогачево	3	0
Костромская область, д. Стрельниково	12	1
Костромская область, Сусанинский район	3	0
Вологодская область, Грязовецкий район, с. Ростилово	12	0
Новгородская область, берег оз. Ильмень	9	0
Карелия, пос. Ляскела	11	0
Всего	96	5

^a Количество образцов с положительными результатами по праймерам ITS 1F и ITS4

^b Количество образцов с положительными результатами по праймерам CcINF1 и Cc2NRI

водителем Taq-полимеразы. 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× Trisborate EDTA (TBE) при 100В и постоянной мощности в течение приблизительно 1 часа. Визуализировали и фотографировали результаты электрофоретического разделения с использованием UVP ImageStore 7500 UV Transilluminator (UVP Inc., Upland, CA).

Результаты

Проведенные исследования показали присутствие *C. coccodes* в листьях картофеля с сухими некротическими пятнами, похожими на симптомы поражения альтернариозом. *C. coccodes* был выявлен в образцах картофеля из Костромской области, Респ. Северная Осетия-Алания и Марий Эл (таблица 2).

Обсуждение

Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о необходимости комплексного исследования некрозов из-за возможного одновременного развития на них нескольких видов фи-

топатогенных микроорганизмов, не выявляемых при визуальном и микроскопическом исследовании. Полученные данные показывают, что реальный спектр фитопатогенов, ассоциированных с листьями исследуемых растений, гораздо шире. Следовательно, при разработке мер защиты растений, при тестировании устойчивости сортов и сортообразцов к грибным болезням, при подборе фунгицидных препаратов следует учитывать возможность проявления эпифитотий, вызванных теми видами грибов, которые редко проявляются и им традиционно не уделяется серьезного внимания.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 15-29-02512).

Список источников

1. Andrivon D., Ramage K., Guerin G., Lukas J.M., Jouan B. 1997. Distribution and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* in French potato-producing areas. *Plant Pathology*. 46: 722-728.
2. Cullen D.W., Lees A.K., Toth I.K., Duncan J.M. 2002. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology*. 51: 281-292.
3. Dillard H.R. 1992. *Colletotrichum coccodes*: the pathogen and its hosts. / In: Bailey J.A., Jeger M.J. (eds.) Colle-

totrichum: Biology, Pathology and Control. Wallingford, UK: CAB International. P. 225-236.

4. Gardes M, Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes – application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol.* 2(2): 113–118

5. Ingram J., Johnson D.A. 2010. Colonization of potato roots and stolons by *Colletotrichum coccodes* from tuberborne inoculum. *Am. J. Pot Res.* 87: 382-389.

6. Johnson D.A., and Miliczky, E.R. 1993. Effects of wounding and wetting duration on infection of potato foliage by *Colletotrichum coccodes*. *Plant Dis.* 77: 13-17.

7. Johnson D.A. 1994. Effect of foliar infection caused by *Colletotrichum coccodes* on yield of Russet Burbank potato. *Plant Dis.* 78: 1075-1078.

8. Mohan S.K., Davis J.R., Sorensen L.H., Schneider A.T. 1992. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and yield. *Am. Potato J.* 69: 547-559.

9. White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. // In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds) *PCR-protocols and applications – a laboratory manual*. Academic Press, San Diego. P. 315–322.

PCR DIAGNOSTICS OF COLLETOTRICHUM COCCODES IN POTATO LEAVES

Abstract: *Colletotrichum coccodes* is a plant pathogenic fungus affecting different organs of potato, tomato, and some other plants. The leaf infection with *C. coccodes* may result in a rapid development of infection nidus and high losses caused by the infection of potato tubers during harvesting. Our study showed the presence of *C. coccodes* on potato leaves with dry necrotic lesions. The presence of a DNA region specific for *C. coccodes* was detected in DNA isolated from five potato leaf samples: one from the Northern Ossetia, one from the Kostroma region, and three from the Mari El Republic.

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

Контактный адрес: Белов Гигорий Леонидович,
Московская область, Люберецкий район, пос. Красково, ул. Лорха, д. 23, литер В.
E-mail: belov.grischa2015@yandex.ru