

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГРИБОВ – ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЛИСТОВЫХ ПЯТНИСТОСТЕЙ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА

Кокаева Л.Ю., Еланский С.Н., Берёзов Ю.И.

Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Проведен молекулярно-генетический анализ грибов-возбудителей листовых пятнистостей картофеля и томата. Потери урожая картофеля от этих заболеваний за счет преждевременного отмирания ботвы составляют около 10%, но в эпифитотийные годы могут возрастать до 40% и более [1]. Потери томата в случае эпифитотийного развития и массового поражения созревающих плодов могут достигать 100%. Борьба с возбудителями листовых пятнистостей осложняется очень высокой изменчивостью возбудителей этих болезней.

Методы морфологического анализа не позволяют объективно оценивать биоразнообразие грибов и структуру их популяций, что делает практически невозможным определение видовой принадлежности схожих видов. Получение полного спектра видов, вызывающих поражение, важно с практической точки зрения, т.к. позволяет подобрать фунгициды, эффективные против всех присутствующих в пораженном органе видов грибов [2].

Современные исследования в области защиты картофеля и томата от возбудителей листовых пятнистостей направлены, в основном, на изучение возбудителя фитофтороза *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary и возбудителей альтернариозов (виды *Alternaria*). Эти исследования не дают представления о разнообразии грибных патогенов, вызывающих листовые пятнистости. Во многих случаях в некрозе, вызванном фитофторой или альтернарией, присутствуют и другие виды грибов. Однако даже при микроскопировании пораженных образцов, помещенных во влажные камеры, не все грибы проявляют себя. Поэтому для изучения видового состава грибов – возбудителей пятнистостей листьев необходимо применение других методов, позволяющих определять видовой состав в пораженном образце без выделения чистых культур или получения видоспецифичных структур (например спороношения). В данном случае может помочь применение молекулярно-генетических методов, в частности, полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ампликонов.

Для исследования видового разнообразия фитопатогенных грибов из пораженных листьев картофеля и томата проводили изучение нуклеотидного состава участков ядерных рибосомных генов (ITS). ДНК выделяли из отдельных некрозов и целых листовых пластинок с использованием общепринятых методов: замороженный материал растирали в жидком азоте, после чего лизировали в СТАВ-буфере и очищали с использованием хлороформа. ПЦР-ам-

плификация проводилась с праймерами, являющимися специфичными для грибной ДНК: ITS86f-ITS4, ITS1f-ITS4, ITS5-ITS4, ITS1-ITS4 [3, 4]. Полученные после амплификации ПЦР-продукты подвергали электрофоретическому разделению в агарозном геле. Полученный фрагмент выделяли из геля, при этом часть продукта была отсекарована непосредственно, вторая клонирована в *E. coli* с последующим секвенированием вставки из отдельных клонов бактерии. При клонировании ампликоны лигировали в вектор pAL2-T (Евроген). Лигированную смесь трансформировали в компетентные клетки *E. coli*, которые впоследствии высевали на селективную среду LB с ампицилином. Отбор клонов проводился с помощью бело-голубой селекции, что позволило отобрать по 10-20 белых колоний для каждого образца. Анализ клонов для выявления нужной вставки проводился методом ПЦР. Выделенная плазмидная ДНК была секвенирована.

В результате в некрозах листьев при прямом секвенировании амплифицированных ITS-регионов (без клонирования) были идентифицированы только последовательности ДНК растения-хозяина или *A. alternata*. В тех же образцах после клонирования в *E. coli*, были определены последовательности, характерные для других видов грибов: *A. solani*, *Phytophthora infestans*, *Cladosporium* sp. и др.

Таким образом, показано, что молекулярно-генетический анализ пораженных листьев с использованием клонирования позволяет более полно определять существующий в них комплекс фитопатогенных грибов по сравнению с прямым секвенированием, которое выявляет только один вид. Количество таксонов грибов в образце пораженной растительной ткани листа не зависело от размера некроза.

Список литературы

1. Иванюк В.Г., Банадысев С.А., Журомский Г.К. Защита картофеля от болезней, вредителей и сорняков. Минск: Белпринт. 2005: 696 с.
2. Побединская М.А., Плуталов П.Н., Романова С.С. и др. Устойчивость возбудителей альтернариоза картофеля и томата к фунгицидам. Микол. фитопатол. 2012; 46(6): 401-8.
3. Vancov T, Keen B. Amplification of soil fungal community DNA using the ITS86F and ITS4 primers. FEMS Microbiol Lett. 2009. 296(1). P.91-96.
4. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Acad Press. 1990: 315-22.