

Видовой состав грибов, ассоциированных с листьями картофеля

Л.Ю. Кокаева, Т.И. Хуснетдинова, Ю.И. Березов, П.Н. Балабко, С.Н. Еланский

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова. Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12.

Аннотация

Исследована микобиота, ассоциированная с листьями картофеля сортов Сирень и Жуковский ранний. Для анализа были взяты листочки с растений каждого сорта без видимых симптомов поражения. Растения выращивали на территории Ботанического сада МГУ имени М.В. Ломоносова на Воробьевых горах. Сразу после сбора листья замораживали в жидком азоте и хранили при -75°C до выделения ДНК. Видовую принадлежность определяли с помощью клонирования в *E. coli* и последующего секвенирования видоспецифичных фрагментов ДНК. В результате исследования выявлены 11 видов грибов: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Cryptococcus wieringae* Á. Fonseca, Scorzetti & Fell, *Hymenoscyphus scutula* (Pers.) W. Phillips, *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton, *Phaeohelotium epiphyllum* (Pers.) Hengstm., *Phaeosphaeria culmorum* (Auersw.) Leuchtm., *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams, *Zalerion arboricola* Buczacki. В исследованных образцах листьев одновременно присутствовали от 5 до 9 видов грибов. Состав микобиоты в листьях разных сортов картофеля существенно различался, несмотря на то, что растения находились в одинаковых условиях окружающей среды на расстоянии менее 1 м друг от друга.

Ключевые слова: микобиота листьев, филлосфера, фитопатогенные грибы, *Solanum tuberosum*, картофель, Ботанический сад МГУ

Для ссылки: Кокаева Л.Ю., Хуснетдинова Т.И., Березов Ю.И., Балабко П.Н., Еланский С.Н. Видовой состав грибов, ассоциированных с листьями картофеля // Защита картофеля. – 2017. – №2. – С. 8-11.

Лист растения — это важная с экологической точки зрения ниша, где могут временно находиться или же обитать постоянно самые разные организмы — от бактерий до высших растений. Лист создает нишу для обитания грибов филлопланы, составляющих микобиоту поверхности листьев. В листьях встречаются также эндофитные грибы, которые живут внутри растения, но не вызывают заболеваний. Микроорганизмы филлопланы и эндофиты защищают растение от внедрения фитопатогенных организмов. Кроме того, даже на листьях, не имеющих симптомов поражения, могут быть фитопатогенные виды в качестве латентной инфекции. Нельзя исключить и присутствие на поверхности листьев непроросших спор, попавшие из атмосферы.

В настоящее время используется несколько методических подходов для выявления грибов, ассоциированных с листьями. Во-первых, это цитологические методы, которые позволяют при наблюдении в световом (СМ) или электронном микроскопе устанавливать присутствие грибных структур на поверхности или внутри ткани растения. Во-вторых, применяется метод выделения чистых культур грибов на питательные среды. В-третьих, проводится диагностика эпифитных грибов с

помощью методов молекулярной биологии, которые позволяют выявлять виды, культивирование которых на среде невозможно (Chiang et al., 2001; O'Callaghan et al., 2006).

Исследования, проводимые методом смыва и выделения чистых культур, выявили присутствие на листьях картофеля видов *Alternaria tenuis* Nees, *Aspergillus* sp., *Aureobasidium pullulans*, *Botrytis cinerea* Pers., *Cladosporium herbarum*, *Epicoccum* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Phoma* sp., *Pythium* sp., *Stemphylium* sp., *Verticillium* sp. (Hollomon, 1967).

Целью нашей работы было определение максимально полного спектра видов грибов, ассоциированных со здоровым (без видимых симптомов заболеваний) листом картофеля. Исследование проводили молекулярно-биологическими методами без выделения чистых культур.

Материалы и методы

Для посадки были взяты оздоровленные семенные клубни картофеля сортов Сирень и Жуковский ранний категории суперсуперэлита производства ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха. На делянке, расположенной на территории ботанического сада Московского Университета имени М.В. Ломоносова на Воробьевых горах, было высажено по 25 клубней каждого сорта. Ботанический сад расположен на возвышенности недалеко от центра Москвы. Ближайшие посадки картофеля

и томата на частных огородах находятся на расстоянии не менее 9 км от места сбора образцов, коммерческие посадки – в 17 км. Таким образом, влияние принесенного с посадок картофеля и томата инокулюма было минимальным.

Для анализа в июле 2016 года были отобраны образцы простых листьев (по одному с растений сортов Сирень и Жуковский ранний) со среднего яруса растений и сразу заморожены при -75°C . Листья не мыли. Из каждого пораженного листа была выделена тотальная ДНК с использованием стандартного СТАВ протокола экстракции (Kutuzova et al., 2017). Для амплификации рДНК, включающей фрагмент гена 18S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS1, ген 5.8S, внутренний транскрибируемый спейсер ITS2 и фрагмент гена 28S, были использованы универсальные праймеры ITS1f (CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA) (Gardes, Bruns, 1993) и ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White et al., 1990). Данные праймеры позволяют избирательно амплифицировать ДНК грибов.

ПЦР проводили на готовых наборах “PCR core” компании «Изоген». Режим амплификации: 96°C – 3 мин.; 30 циклов (94°C – 30 с., 55°C – 30 с., 72°C – 30 с.); 72°C – 3 мин.; хранение при $+4^{\circ}\text{C}$. Разделение фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации, проводили стандартным электрофорезом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в концентрации $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$. В качестве буферной системы использовали $0,5\times$ Tris-борат-ЭДТА-буфер (ТБЕ). После электрофореза гели анализировали в УФ свете. Ампликоны нужной длины экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp компании «Евроген». Полученные амплифицированные фрагменты использовали для вставки в вектор pAL-TA (Евроген, Россия), трансформировали в клетки *E. coli* (штамм Dh5 α) по методу Inoue (Inoue et al., 1990). Библиотеку клонов исследовали с помощью рестрикционного анализа амплифицированной ДНК вставки с использованием эндонуклеазы рестрикции MspI (рис. 1). По результатам анализа отбирали вставки с различным рестрикционным профилем. Из отобранных образцов проводили выделение плазмидной ДНК по технологии S. Lee (Lee, Rasheed, 1990) и определяли последовательности нуклеотидов во вставках. Секвенирование последовательностей проведено компанией «Евроген». Плазмидную ДНК секвенировали с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, CA, USA.) на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 xl (Applied Biosystems, CA, USA). Полученные последовательности нуклеотидов использовали для поиска соответствия в GenBank для видового определения с помощью программы BLASTn.

Результаты и обсуждение

С использованием технологии клонирования было получено 97 клонов. С помощью рестрикционного анализа были отобраны четко различающиеся клоны (пример электрофореграммы результатов рестрикционного анализа приведен на рис. 1), определение нуклеотидных последовательностей которых позволило выявить 11 различных таксонов грибов: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Cladosporium herbarum*

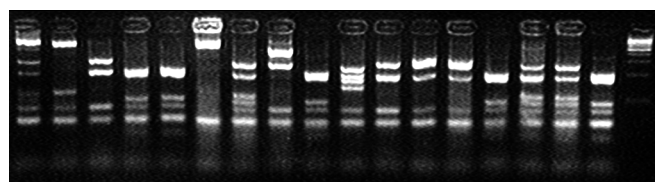


Рис. 1. Фрагмент электрофореграммы рестрикционного анализа клонов из образца листа картофеля сорта Жуковский ранний. 1 - *Mycocentrospora acerina*, 2 - *Hymenoscyphus scutula*, 3,11,12,13 - *Cladosporium cladosporioides*, 4,5,9,14,17 - *Cladosporium herbarum*, 6 - *Cryptococcus wieringae*, 7,15,16 - *Plectosphaerella cucumerina* 8 - *Phaeohelotium epiphyllum*, 10 - *Phaeosphaeria culmorum*, M- маркер длин фрагментов ДНК (100 – 1000 bp).

(Pers.) Link, *Cryptococcus wieringae* A. Fonseca, Scorzetti & Fell, *Hymenoscyphus scutula* (Pers.) W. Phillips, *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton, *Phaeohelotium epiphyllum* (Pers.) Hengstm., *Phaeosphaeria culmorum* (Auersw.) Leuchtm., *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams, *Zalerion arboricola* Buc-zacki. В каждом исследуемом образце листа с очагом заболевания присутствовало несколько видов грибов и/или грибоподобных организмов (табл. 1).

Выявленные в результате работы виды грибов можно разделить на несколько групп:

Aureobasidium pullulans, *Cryptococcus wieringae* – дрожжеподобные организмы, которые достаточно часто выделяются из листьев. Выявленный нами дрожжеподобный гриб *Aureobasidium pullulans* был описан в качестве патогена томата в Бразилии и США (Mendes et al., 1998), а также выделен в Ленинградской области из листьев картофеля с симптомами пятнистостей (Ганнибал, 2007). В ряде работ *A. pullulans* описывается как антагонист широкого спектра патогенных микроорганизмов, включая некоторые виды *Alternaria* (Rai, Singh, 1980; Brame, Flood, 1983). Однако в нашей работе данный вид был обнаружен в образце, в котором также присутствовала рДНК *Alternaria alternata*.

Cladosporium herbarum, *C. cladosporioides*, *Alternaria alternata* – являются одними из доминирующих грибов по количеству спор в воздухе в умеренной зоне и часто выделяются с поверхности листьев. Также они могут быть патогенами картофеля и сапротрофно расти на его мертвых остатках. *Plectosphaerella cucumerina* – повсеместно распространенный вид, который встречается в воздухе и выделяется из пораженных листьев картофеля и томата; он описан как возбудитель увядания (вилта) картофеля и томата в Китае (Xu et al., 2014; Gao et al., 2016). Другими выявленными сапротрофами широкого спектра были *Hymenoscyphus scutula*, *Phaeohelotium epiphyllum*, *Zalerion arboricola*. Ранее на листьях картофеля эти виды не отмечались.

Mycocentrospora acerina – фитопатогенный гриб, поражающие растения других семейств, например, морковь; нами не было найдено свидетельств о его находках на растениях семейства пасленовые. *Phaeosphaeria culmorum* – сапротрофный вид, возможно,

Таблица 1

Исследованные образцы листьев и выявленные виды

Сорт Сирень	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Mycocentrospora acerina</i>
Сорт Жуковский ранний	<i>Cladosporium cladosporioides</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Cryptococcus wieringae</i>
	<i>Hymenoscyphus scutula</i>
	<i>Mycocentrospora acerina</i>
	<i>Phaeohelotium epiphyllum</i>
	<i>Phaeosphaeria culmorum</i>
	<i>Plectosphaerella cucumerina</i>
	<i>Zalerion arboricola</i>

факультативный паразит, споры которого часто встречаются в воздухе. Присутствие этих видов на листе картофеля может объясняться заносом спор с произрастающих вокруг растений Ботанического сада.

В работе были установлены различия в микобиоте исследованных листьев сортов Сирень и Жуковский ранний. Только три вида были встречены на обоих сортах картофеля: *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Mycocentrospora acerina*. Большая часть видов различалась, несмотря на то, что растения находились в одинаковых условиях окружающей среды на расстоянии менее 1 м друг от друга. Эти данные о различной микобиоте листьев разных сортов картофеля могут быть достаточно важной информацией, поскольку филлоплана защищает растение от проникновения фитопатогенных видов и ее различия могут определять восприимчивость сортов к фитопатогенным организмам.

Помимо фитопатогенных грибов и ассоциированной с растениями микобиоты в состав изучаемых видов грибов могли попасть споры грибов, осевшие на листья из приземного слоя воздуха. Микобиота приземных слоев воздуха может включать propagules почвенных грибов, видов, развивающихся на поверхности водоемов, на других растениях, на разнообразных строительных и технических конструкциях. Флора Ботанического сада включает самые разнообразные виды растений, что также могло оказать влияние на состав выявленной микобиоты. Так, на листьях картофеля впервые были определены сапротрофные виды *Hymenoscyphus scutula*, *Phaeohelotium epiphyllum*, *Zalerion arboricola*.

Ранее в нашей лаборатории проводились аналогичные исследования микобиоты пораженных (с видимыми симптомами заболевания) листьев паслена сладко-горького (*Solanum dulcamara* L.), также растущего на территории ботанического сада МГУ (Кокаева, Еланский, не опубликовано). С помощью клонирования в *E. coli* и последующего

секвенирования, а также выделения чистых культур были выявлены следующие виды грибов и грибоподобных организмов: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Boeremia exigua* (Desm.) (= *Phoma destructiva*), *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Coniothyrium fuckelii* Sacc., *Botrytis cinerea* Pers., *Fusarium oxysporum* Schltdl., *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Cladosporium tenuissimum* Cooke, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., *Cryptococcus* sp., *Mycosphaerella* sp., *Phialophora* sp., *Phoma herbarum* Westend., *Phoma* sp., *Thielavia basicola* Zopf. Как и в настоящей работе, на всех исследованных листьях (были исследованы 4 простых листа) одновременно присутствовало несколько видов грибов. Некоторые виды грибов присутствовали одновременно и на здоровых листьях картофеля, и на пораженном паслене сладко-горьком: *Alternaria alternata*, *Aureobasidium pullulans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium herbarum*, *Cryptococcus* sp.

Среди обнаруженных и на картофеле, и на паслене сладко-горьком видов отмечены *Cladosporium* и *Alternaria*, споры которых являются аллергенами. Увеличение их концентрации в атмосфере вызывает заболевания у сенсibilизированных лиц (Zukiewicz-Sobczak, 2013).

Таким образом, на листьях картофеля, растущего в удалении от посадок культурных пасленовых, было обнаружено 11 таксонов различных грибов, часть которых являются патогенными для сем. Solanaceae. В то же время некоторые выявленные виды не были известны как патогены пасленовых растений в России, однако отмечались как патогенные для них в других странах. По-видимому, на составе микобиоты сказалось влияние мегаполиса и окружающей растительности.

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

Список цитированной литературы

Ганнибал Ф.Б. Видовой состав, таксономия и номенклатура возбудителей заболевания альтернариоза листьев картофеля // Лаборатория микологии и фитопатологии им. А. А. Ячевского ВИЗР. История и современность / Под ред. А.П. Дмитриева. СПб.: ВИЗР, 2007. – С. 142-148

Brame C., Flood J. Antagonism of *Aureobasidium pullulans* towards *Alternaria solani* // Transactions of the British Mycological Society. – 1983. – Vol. 81. – № 3. – P. 621-624.

Chiang Y.-C., Chou C.-H., Lee P.-R., Chiang T.-Y. Detection of leaf-associated fungi based on PCR and nucleotide sequence of the ribosomal internal transcribed spacer (ITS) in *Miscanthus* // Botanical Bulletin of Academia Sinica. 2001. – Vol. 42. – P. 39–44.

Gardes M., Bruns T.D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes: application to the identification of mycorrhizae and rusts // Molecular ecology. 1993. – Vol. 2. – № 2. – P. 113-118.

Gao J., Zhang Y.Y., Zhao X.J., Wang K., Zhao J. First report of potato wilt caused by *Plectosphaerella cucumerina* in Inner Mongolia // Plant Disease. – 2016. Vol. 100. – № 12. – P. 2523-2524.

Hollomon D.W. Observations on the phylloplane flora of potatoes // European Potato Journal. – 1967. – Vol. 10. – № 1. – P. 53–61.

Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids // Gene. – 1990. – V. 96. – № 1. – P. 23–28.

Kutuzova I.A., Kokaeva L.Yu., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Yu.A., Skolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment. // Journal of Plant Pathology. – 2017. – V. 99. – P. 635-642. DOI: <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v99i3.3950>.

Lee S.Y., Rasheed S. A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA // Biotechniques. – 1990. – V. 9. – №6. – P. 676-679.

Mendes M.A.S., da Silva V.L., Dianese J.C. Fungos em plantas no Brasil. Brasília, Brasil: Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen, 1998. – 555 p.

O'Callaghan M., Lorenz N., Gerard E.M. Characterization of phylloplane and rhizosphere microbial popula-

tions using PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) // Molecular approaches to soil, rhizosphere and plant microorganism analysis / Eds. J.E. Cooper, J.R. Rao. CABI, 2006. – P. 99 – 115.

Rai B., Singh D.B. Antagonistic activity of some leaf surface microfungi against *Alternaria brassicae* and *Drechslera graminea* // Transactions of the British Mycological Society. – 1980. – V. 75. – № 3. – P. 363-369.

White T.J., Bruns T., Lee S.J.W.T., Taylor J.W. 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.

Xu J., Xu X.-d., Cao Y.-Y., Zhang W.-M. First Report of Greenhouse Tomato Wilt Caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China // Plant Disease. – 2014. – V. 98. – № 11. – P. 1646-1646.

Zukiewicz-Sobczak W.A. The role of fungi in allergic diseases // Postępy Dermatologii i Alergologii. – 2013. – V. 30. – № 1. – P. 42–45.

Поступила в редакцию 5.07.2017

Опубликовано 15.11.2017

Fungi associated with potato leaves

L.Y. Kokaeva, T.I. Husnetdinova, Y.I. Berezov, P.N. Balabko, S.N. Elansky

Lomonosov Moscow State University. Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

Abstract

Mycobiota associated with the leaves of potato (*Siren'* and *Zhukovskiy ranniy* varieties) has been studied. Leaflets without any infection symptoms were collected from the plants of these two varieties grown in the Botanical Garden of the Lomonosov Moscow State University (Moscow city, Vorobyovy Gory). Immediately after collection, the leaves were frozen and stored at –75°C until DNA extraction. DNA was extracted from the whole leaf, and 18S rDNA (including ITS1 and ITS2 regions) gene banks were constructed in *Escherichia coli* by cloning PCR products. The subsequent sequencing revealed 11 fungal species: *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl, *Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries, *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link, *Cryptococcus wieringae* Á. Fonseca, *Scorzetti & Fell*, *Hymenoscyphus scutula* (Pers.) W. Phillips, *Mycocentrospora acerina* (R. Hartig) Deighton, *Phaeohelotium epiphyllum* (Pers.) Hengstm., *Phaeosphaeria culmorum* (Auersw.) Leuchtm., *Plectosphaerella cucumerina* (Lindf.) W. Gams, *Zalerion arboricola* Buczacki. Each tested sample contained 5-9 different fungal species. Micobiota of leaves collected from different varieties significantly differed from each other, though the plants grew in close proximity and under the same environmental conditions.

Keywords: leaf associated mycobiota, *Solanum tuberosum*, the Botanical Garden of Lomonosov Moscow State University