УДК :632.4:635.64

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.03>

ГРИБКОВЫЕ ПАТОГЕНЫ В ЛИСТЬЯХ НИЖНЕГО ЯРУСА СОРТОВ ТОМАТА *MARY GRATEFULLY* И *TOMİŞ*

Белуsoва Галина, Михня Надежда

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинэу, Республика Молдова

e-mail: galina.belousova@igfpp.md

Abstract

Pathogenic fungi are the cause of various diseases of crops. Phytopathogens infect seeds as well as the host-plants in the course of the whole duration of their ontogenesis. Plants are infected when grown in greenhouses or in open fields by a single causal agent or several pathogenic fungi. In current study, a nested PCR protocol was applied for identification of tomatoes' infection. An infestation with *Alternaria spp.* and *Myrothecium roridum* in the lowest leaves on the stem was stated using molecular diagnostics. The 'Tomis' and 'Mary Gratefully' tomato cultivars were used in current study. *Alternaria spp.* was identified in each of the samples. The pathogen's species was defined. *Myrothecium roridum* infested 10 samples of the 'Tomis' genotype and 11 samples of the 'Mary Gratefully' genotype of the 12 samples.

Key words: nested PCR, *Alternaria spp.*, *Myrothecium roridum*.

Введение

Внедрение и разработка новых и эффективных методов диагностики для борьбы с грибковыми заболеваниями растений является актуальной задачей. Распознавание грибковых патогенов в открытом грунте на ранних этапах способствует предотвращению распространения патогена и является залогом получения здорового урожая. Тестирование по внешним морфологическим признакам не всегда бывает точным. Под внешними симптомами патогена могут скрываться одновременно несколько возбудителей с похожими картинами проявления. Широко используемые традиционные методы диагностики включают изоляцию, культивирование, повторное культивирование, микроскопические методы, биохимические тесты и свидетельствуют о том, что исполнитель должен обладать необходимыми знаниями и опытом в области патологии и систематики грибковых заболеваний. Современные молекулярные подходы облегчают распознавание и количественную оценку патогенов. В сегодняшних разработках используются стандартная полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени, nested PCR — «вложенная» ПЦР, петлевая изотермическая амплификация (LAMP), амплификации по кругу (RCA), амплификации на основе последовательностей нуклеиновых кислот (NASBA) [1].

Томат является традиционной культурой Молдовы. Анализ инфицированности листьев томата нижнего яруса патогенами рода *Alternaria spp.* и *Myrothecium roridum* является насущной задачей для исследователей. Грибковые патогены рода *Alternaria spp.* вызывают альтернариоз или бурую пятнистость пасленовых культур, которая заключается в снижении урожая из-за преждевременного отмирания листьев и гниения плодов. Фитопатоген *Myrothecium roridum* вызывает схожую картину поражения, пятнистость листьев. Грибы рода Миротеций неоднократно регистрировались микологами Молдовы [2].

Материалы и методы

Работа по выявлению патогенов рода *Alternaria spp.* и *Myrothecium roridum* была проведена на двух сортах томата *Tomis* и *Mary Gratefully* полевого опыта Института генетики, физиологии и защиты растений Молдовы. Массовое проявление заболевания на вегетативных органах наблюдается в начале плодообразования. В работе были использованы листья нижнего яруса. Из собранных листьев полевого опыта выделена ДНК, с использованием SDS буфера, которая была проанализирована молекулярными методами на инфицированность патогенами *Alternaria spp.* и *Myrothecium roridum*. Образцы ДНК были протестированы в nested PCR с применением специфичных праймеров для родов и видов грибковых патогенов. Nested PCR способствовал специфичности и точности нашего исследования. Условия выделения ДНК и проведения nested PCR описаны в работе [3]. Дизайн праймеров и количество циклов представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидная последовательность ДНК праймеров фитопатогенов и количество циклов nested PCR

Название Фитопатогена	Номер праймера	Раунд Праймер	Нуклеотидная последовательность ДНК праймеров	Кол-во циклов
<i>Alternaria spp.</i>	1	1/ ac 1/ ac	fr.GTCGGTAGTGACGCTTCTCC rev.AAGATGAGGTGGTTGCGGTT	27
<i>Alternaria spp.</i>	2	2/ ac 2/ ac	fr.GTGTCTGGGTTGGTGTCCAT rev.ACGGCCAGCATCTGTGAAG	28
<i>A. alternata</i>	3	1/ Aa 1/ Aa	fr.GGCCATCCAAGTTGCCGAAAAC rev.ACACCCATAACGAACATGGGG	28
<i>A. alternata</i>	4	2/ Aa 2/ Aa	fr.TCTGTGGTTCGCAGAATGCAG rev.GGCGTCAGCAGAGGGGAG	32
<i>Myrothecium roridum</i>	5	1/ Myr.ror 1/ Myr.ror	fr.ACTCCCAAACCCCTTTGTGAACC rev.TGGGGTGTTTTACGGCATGG	28
<i>Myrothecium roridum</i>	6	2/ Myr.ror 2/ Myr.ror	fr.TGTCTTTAGTGTTTCTCCTCTGA rev.GAGACCGCCACTGAATTTCG	32

Результаты и обсуждение

Из листьев нижнего яруса, отобранных растений, на 28 день после посадки, до всех полевых работ, была выделена ДНК и проанализирована на инфицированность фитопатогенами *Alternaria spp.* и *Myrothecium roridum*. В работе анализировались образцы ДНК, выделенные из 12 разных растений для двух сортов. Во всех образцах ДНК томата сорта Mary Gratefully был выявлен патоген *Alternaria spp.* Для выявления патогена в nested PCR для 1-го раунда были использованы праймеры 1 и для 2-го раунда пара праймеров 2 (Таблица 1). Результаты реакции представлены на электрофореграмме (Рис. 1)

Рис. 1. Электрофореграмма продуктов nested PCR на ДНК листьев томата сорта Mary Gratefully с использованием специфических праймеров к патогену *Alternaria spp.* – дорожки: 1-12, К – контроль (H_2O), М – маркер 1kb DNA Ladder.

Во всех исследованных образцах выявлена полоса в 146 п. о., характерная для применённых праймеров к *Alternaria spp.* Эти образцы были протестированы на видовую принадлежность патогена. Для 2-х раундов были использованы праймеры 3 и 4 к патогену *A. alternata* представленные в Таблице 1. Во всех образцах был установлен этот фитопатоген. Результаты представлены на Рис. 2.

Рис. 2. Электрофореграмма продуктов nested PCR на ДНК листьев томата сорта Mary Gratefully с использованием специфических праймеров к патогену *A. alternata* – дорожки: 1-12, К – контроль (H_2O), М – маркер 1kb DNA Ladder.

На электрофореграмме во всех образцах наблюдаем полосу в 288 п. о., характерную для данной пары праймеров к фитопатогену *A. alternata*. Эти же образцы ДНК были протестированы на фитопатоген *Myrothecium roridum*. Праймеры для 2-х раундов 5 и 6 и количество циклов nested PCR указаны в Таблице 1. Результаты показали наличие фитопатогена в 10 из 12 исследованных образцов томата сорта Mary Gratefully (Рис. 3).

Рис. 3. Электрофореграмма продуктов nested PCR на ДНК листьев томата сорта Mary Gratefully с использованием специфических праймеров к патогену *Myrothecium roridum* – дорожки: 1-12, К – контроль (H_2O), М – маркер 1kb DNA Ladder.

На электрофореграмме выявлена полоса в 306 п. о., характерная для данной пары праймеров фитопатогена *Myrothecium oridum*. Образцы ДНК 3 и 11 были без инфицирования.

ДНК из листьев нижнего яруса томата сорта *Tomîș* была протестирована на наличие *Alternaria* spp. с использованием в nested PCR праймеров 1 и 2 к данному патогену (Таблица 1). Все образцы показали наличие заданного патогена. Применив в nested PCR праймеры 3 и 4 (Таблица 1) к *A. alternata* к образцам ДНК с альтернативой было выявлено во всех образцах заражение патогеном *A. alternata*. Эти же образцы были протестированы на наличие патогена *Myrothecium oridum*. Условия nested PCR и праймеры 5 и 6 представлены в Таблице 1. На электрофореграмме выявлена полоса в 306 п. о. для 11 образцов ДНК из нижнего яруса листьев томата сорта *Tomîș* (Рис. 4).

Рис. 4. Электрофореграмма продуктов nested PCR на ДНК листьев томата сорта *Tomîș* с использованием специфических праймеров к патогену *Myrothecium oridum* – дорожки: 1-12, К – контроль (H_2O), М – маркер 1kb DNA Ladder.

На электрофореграмме один из 12 исследованных образцов не был заражен патогеном *Myrothecium oridum* – образец 14.

Alternaria spp. и *A. alternata* выявлены во всех исследованных образцах ДНК из листьев томата двух сортов. Фитопатогенами *A. alternata* и *Myrothecium oridum* совместно были заражены 10 из 12 исследованных образцов томата сорта *Mary Gratefully* и 11 образцов ДНК томата сорта *Tomîș*.

Выводы

1. Было установлено 100% наличие фитопатогенов *Alternaria* spp. в ДНК, выделенной из листовой пластинки на уровне первой кисти томата сортов *Mary Gratefully* и *Tomîș* растений полевого опыта (2019 год).
2. В nested PCR был установлен вид патогена *A. alternata*.
3. Определено одновременное присутствие двух патогенов в исследованных ДНК сортов *Mary Gratefully* и *Tomîș*. Совместно *Alternaria* spp. и *Myrothecium oridum* заражали одни и те же диагностируемые образцы.
4. Применение молекулярных методов, nested PCR позволило точно указать наличие рода и вида патогена при одинаковой картине внешнего проявления.

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.5107.11 «Длительное сохранение генетических ресурсов растений в геномном банке с использованием методов молекулярной биологии в тестировании состояния здоровья растительной зародышевой плазмы», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию, Республики Молдовы.

Литература

1. GANESHAMOORTHY, H., KANDEEPAROOPAN, P., FRONT. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. In: *Cell. Infect. Microbiol.*, 11 January 2021, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234>.
2. НИКОЛАЕВА, С.И., НИКОЛАЕВ, А.Н., Миротециум в составе возбудителей пятнистостей томата в Молдавии. В: *Защита и карантин растений*, 9, 2018, 28-32.
3. БЕЛОУСОВА, Г.Г., ШУБИНА, В.Э., Молекулярно-генетическое определение патогенного заражения семян томата сорта *Tomîș*. В: *Биологический метод защиты растений: достижения и перспективы* Международная научно-практическая конференция, 1–5 октября 2018 г., г. Одесса, 49-55.