

Первая находка *Phomopsis phaseoli* на томате

Т.А. Шкункова¹, Е.М. Чудинова¹, Л. Ю. Кокаева², А.В. Александрова², С.Н. Еланский^{1,2}

1 - Российский Университет Дружбы Народов

2 - Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова

Поражение растений фитопатогенными микроорганизмами вызывает высокие потери урожая, снижение качества продукции, увеличение потерь при хранении. Фитопатогенные грибы рода *Diaporthe* (телеоморфа), для которых в настоящий момент принято название анаморфной стадии *Phomopsis*, поражают широкий круг растений как диких, так и культивируемых (Udayanga et al., 2011; Gomes et al., 2013). Некоторые являются особо опасными фитопатогенами, например, возбудитель фомопсиса сои *Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc. В Украине возбудитель фомопсиса сои входит в перечень карантинных объектов. В то же время ничего не известно о вирулентности *P. phaseoli* в отношении других культурных растений.

Материалы и методы

Плоды томата (гибрид F10) с симптомами грибного поражения были собраны с коммерческого поля в Славянском районе Краснодарского края в августе 2017 г.

После доставки в лабораторию ломтики плодов с участком пораженной ткани помещали во влажную камеру. На вторые-третьи сутки с помощью стерильной препаровальной иглы отдельные темные склероции переносили в чашку Петри с агаризованной средой (сусло 10%, агар 1,5%, пенициллин 1000 ед/мл). Размер колонии на агаризованной среде измеряли на третьи и седьмые сутки.

Исследование препаратов проводили с использованием светового микроскопа Leica DM2500 с цифровой камерой ICC50 HD и бинокулярного микроскопа Leica M80 с цифровой камерой IC80HD (Leica Microsystems, Германия).

Для выделения ДНК гриб выращивали в жидкой гороховой среде. Мицелий гриба замораживали в жидком азоте, гомогенизировали, инкубировали в СТАВ буфере, очищали хлороформом, два раза промывали 70% спиртом (Kutuzova et al., 2017).

Для определения видовой принадлежности выделенных штаммов проводили ПЦР с праймерами, позволяющими амплифицировать видоспецифичные участки ДНК ITS1-5,8S-ITS2 (праймеры ITS5/ITS4, White et al., 1990), генов бета-тубулина (праймеры Bt2a/Bt2b) и фактора элонгации трансляции 1a (праймеры EF1-728F/EF1-986R) (Udayanga et al., 2015). Ампликоны нужной длины экстрагировали из геля с помощью набора CleanUp компании «Евроген».

Аmplицированные участки 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. Филогенетический анализ проводили с помощью программы MEGA 6.

Для определения патогенности в центр ломтика исследуемого плода или клубня помещали агаровый блок размером 5x5 мм с гифами гриба из чистой культуры после пяти дней выращивания на сусло-агаре или 20 мкл суспензии конидиоспор в концентрации 10^3 спор/мл. На контрольные образцы наносили 20 мкл дистиллированной воды.

Результаты и обсуждение

В результате работы из пораженного плода томата был выделен в чистую культуру штамм *Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc. (= *Diaporthe phaseolorum* (Cooke & Ellis) Sacc.). Для культуры был характерен быстрый рост: на третьи сутки колония гриба достигала диаметра $4,5 \pm 0,2$ см, на седьмые сутки достигала края чашки (10 см). Мицелий белый хлопьевидный (рис. 1).

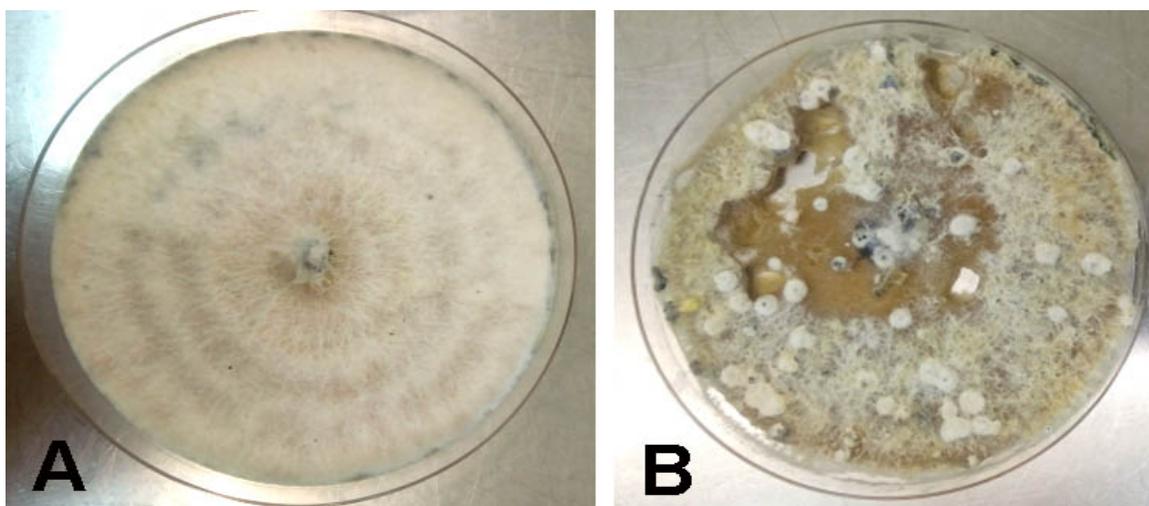


Рис. 1. Чистая культура изучаемого штамма *P. phaseoli* на агаризованной среде после 14 дней (А) и 28 дней (В) культивирования при температуре 25°C.

В культуре изолят формировал темноокрашенные перитеции с длинной шейкой, характерные для рода *Phomopsis*. Сумки восьмиспоровые булавовидные $30-45 \times 5-8$ мкм, аскоспоры бесцветные, двуклеточные, эллиптической или слегка веретеновидной формы $10-14 \times 3-5$ мкм (рис. 2).

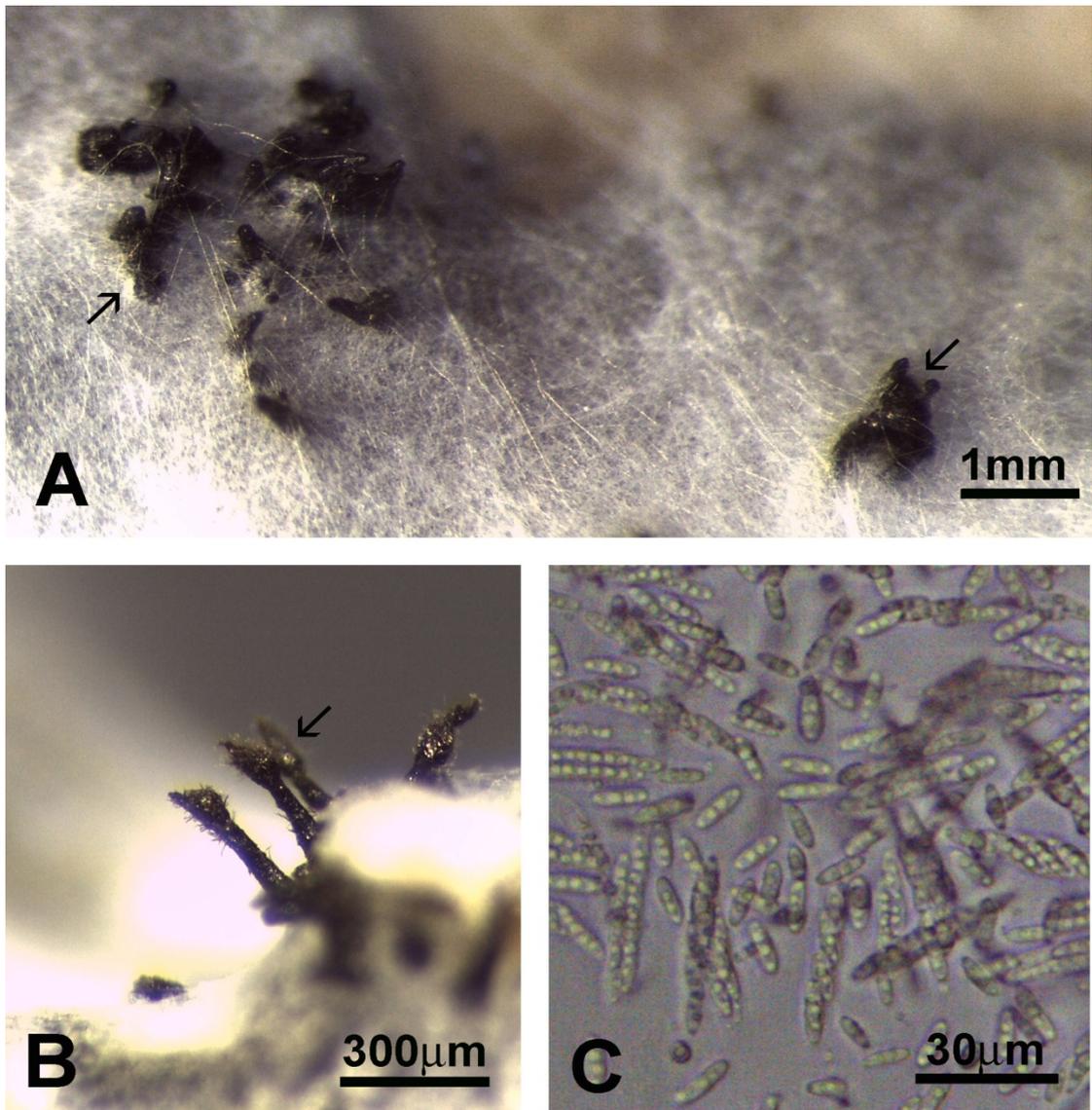


Рис. 2. Микроскопия перитециев (А, В) и аскоспор (С) изучаемого штамма *P. phaseoli*.

Размеры спор, размер и форма перитециев соответствовали описанию для вида *P. phaseoli* (Udayanga et al., 2011).

Для подтверждения видового диагноза проводили изучение структуры видоспецифичных локусов ДНК ITS1-5,8S-ITS2, генов бета-тубулина и фактора элонгации трансляции 1a (рис. 3,4,5).

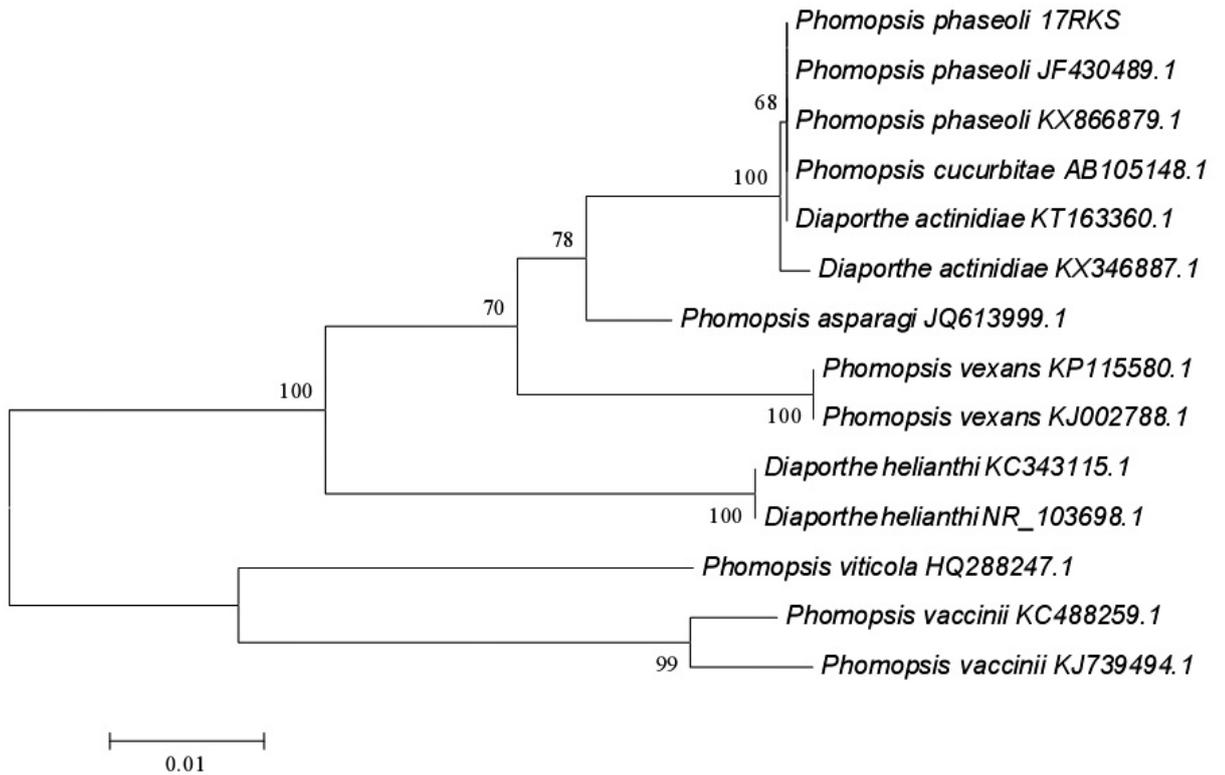


Рис. 3. Филогенетический анализ *P. phaseoli* и близких видов по участкам ДНК ITS1-5,8S-ITS2(праймеры ITS5/ITS4). 17RKS – изучаемый изолят.

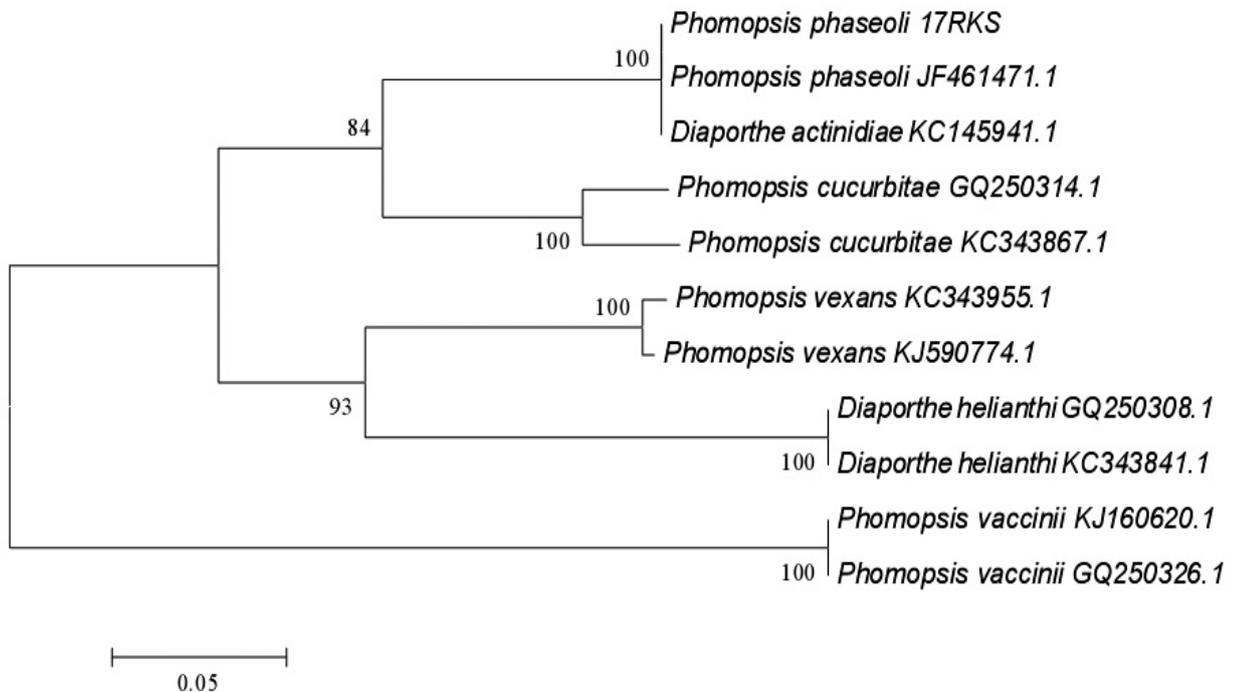


Рис. 4. Филогенетический анализ *P. phaseoli* и близких видов по фактору элонгации трансляции 1α (праймеры EF1-728F/ EF1-986R)

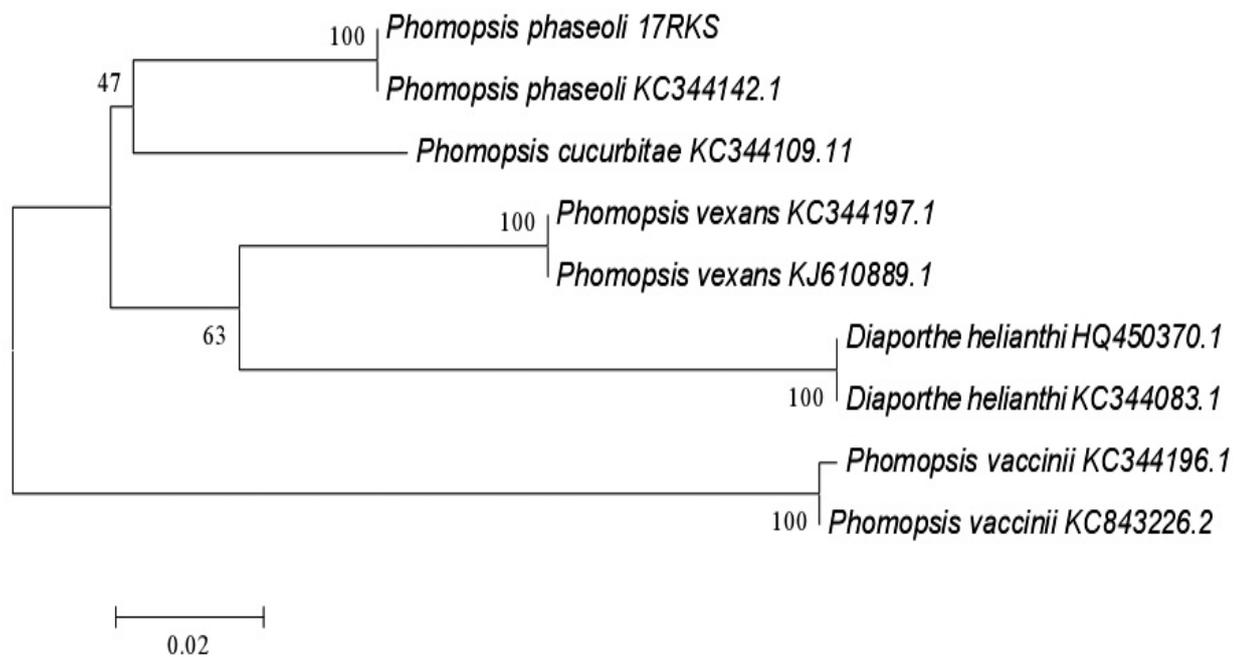


Рис.5. Филогенетический анализ *P. phaseoli* и близких видов по гену бета-тубулина (праймеры Bt2a/Bt2b)

Последовательность нуклеотидов участка ITS1-5,8S-ITS2 соответствовала *P. phaseolorum* (= *P. phaseoli*), выделенной из плодов киви в Китае (GenBank Accession No KX866879.1) и из бобов сои в Сербии (GenBank Accession No JF430489.1), с идентичностью 100%. Полученные ПЦР-продукты гена бета-тубулина и фрагмента гена фактора элонгации трансляции 1a также были на 100% идентичны *P. phaseolorum* (GenBank Accession No KC344142.1, JF461471.1 соответственно).

Культурой гриба заражали растения семейства Пасленовые. Было показано успешное заражение ломтика клубня картофеля, томата (рис. 6), перца и баклажана.



Рис. 6. Искусственно зараженный *P. phaseoli* (штамм 17RKS) ломтик плода томата.

В том случае, когда в качестве заражающего агента использовали кусочек агара с мицелием, на третий день наблюдали поражение тканей вокруг агара с мицелием. Размер поражения на третьи сутки инкубации на картофеле достигал 1,5 см, на томате – 1,7 см, на перце – 1,5 см, на баклажане – 5 см. Заражение спорами наблюдали только на баклажане: на седьмой день размер поражения составил 2,9 см (рис. 7).



Рис. 7. Рост *P. phaseoli* (штамм 17RKS) на клубне картофеля (А), баклажане (В), перце (С).

Из зараженного ломтика картофеля и из баклажана брали слизистый экссудат, выделяемый из пикнид, и переносили на агаризованную среду с добавлением пенициллина. На среде вырос изолят гриба, по культурально-морфологическим признакам неотличимый от исходного штамма.

На поверхности зараженных кусочков баклажана формировались темноокрашенные пикниды (рис. 8), содержащие светлоокрашенные одноклеточные альфа-конидии эллиптической формы 6–11 × 2,5–4 мкм. Бета-конидии не наблюдали.

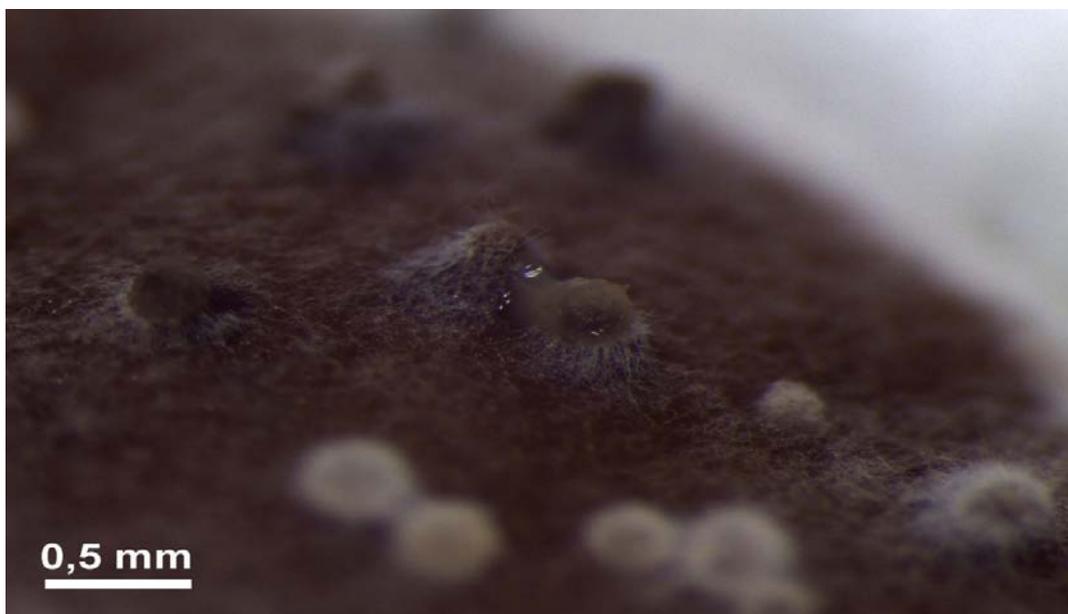


Рис. 8. Пикниды *P. phaseoli* (штамм 17RKS), образовавшиеся на ломтике баклажана

Таким образом, с помощью культурально-морфологических и молекулярно-генетических методов показана принадлежность выделенного из пораженного плода томата гриба виду *Phomopsis phaseoli* (Desm.) Sacc. По нашим сведениям, это первая находка *P. phaseoli* на томате.

P. phaseoli известен как патоген сои (*Glycine max* (L.) Merr.), вызывающий поражения стеблей, стручков, ростков (Kulik, 1988). В Краснодарском крае широко распространены посадки сои, часто они граничат с полями томата. Возможно, этим объясняется появление данного патогена на томате. Высокая патогенность в отношении растений семейства Пасленовые показывает возможность циркулирования *P. phaseoli* в посадках томата, баклажана, картофеля и перца, посадки которых также широко распространены на юге России и в Краснодарском крае. Исследование выполнено при поддержке Российского Научного Фонда (проект N 14-50-00029).

Цитированная литература

Gomes R.R., Glienke C., Videira S.I.R., Lombard L., Groenewald J.Z., Crous P.W. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi // *Persoonia*. – 2013. – 31. – P. 1–41.

Kutuzova I.A., Kokaeva L.Y., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Scolotneva 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(3). – P.635–642. DOI: 10.4454/jpp.v99i3.3950.

Mahadevakumar S. and Janardhana G.R. *Phomopsis vexans* (Sacc. & Syd.) Harter: Current Research and Future Perspectives (1914–2015) // RRJBSI Plant Biotechnology and its Applications. – 2016. – S3. – P. 1–9.

Udayanga D., Liu X., McKenzie E.H.C., Chukeatirote E., Bahkali A.H.A., Hyde K.D. The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens // Fungal Diversity. –2011. – 50. – P.189–225.

Udayanga D., Castlebury L.A., Rossman A.Y., Chukeatirote E., Hyde K.D. The *Diaporthe sojae* species complex: Phylogenetic reassessment of pathogens associated with soybean, cucurbits and other field crops // Fungal Biol. – 2015 . – 119(5). – P.383-407. DOI: 10.1016/j.funbio.2014.10.009.

White T, 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*. – 1990. – 18(1). –P. 315–322.