

БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 532.532.2

ВЫЯВЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СКРЫТОЙ ИНФЕКЦИИ КАРТОФЕЛЯ

Р.А. Габитов, Р.Т. Мухаметишина, Э.А. Кабрера Фуентес, Т.В. Багаева

Аннотация

Несмотря на активное осуществление мер по защите сельскохозяйственных растений от фитопатогенов, актуальной, в том числе в сфере картофелеводства, остается проблема скрытого поражения посевного материала. Нами установлено, что в качестве инфекционного агента латентной инфекции клубней картофеля сортов Розара, Ред Скарлетт, Невский и Фелокс наиболее часто выступают микромицеты рода *Fusarium*. Методом ПЦР-анализа было обнаружено, что наиболее распространенным видом выступает *Fusarium oxysporum*. Фитотоксичность изолятов данного вида подтверждена действием культуральной жидкости микромицета на прорастание семян зерновых и овощных культур.

Ключевые слова: микромицеты, *Fusarium*, ПЦР, всхожесть.

Введение

В современных условиях увеличения урожайности сельскохозяйственных культур можно достичь на основе высокой культуры земледелия, предполагающей в числе прочего использование высококачественного посевного материала. Получение такого материала связано с проведением целого комплекса мероприятий, в частности с работами по выявлению скрытых инфекций, вызываемых различными микроорганизмами, в том числе микроскопическими грибами, и нахождению методов, позволяющих точно определить видовую принадлежность инфекционного агента.

Среди наиболее распространенных заболеваний многих сельскохозяйственных культур выделяют группу заболеваний, связанных с развитием фитопатогенных микромицетов рода *Fusarium*. Американским фитопатологическим обществом [1] установлено, что более чем 80 из 101 вида экономически важных растений сопутствует заболевание, вызываемое грибами рода *Fusarium*. Чаще всего в качестве возбудителей инфекции встречаются виды *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae*, *F. tricinctum* и некоторые другие [2–4]. Они поражают как вегетативные, так и репродуктивные органы растений и вызывают их увядание, повреждение и гибель, а у зерновых – повреждение колоса и впоследствии зерна. Из данных литературы известно, что микромицеты рода *Fusarium* обнаруживаются не только в почве, на растительных остатках, но и в самих растениях, в частности в клубнях картофеля, сохраняясь там в виде латентной

инфекции [5]. Для человека и животных представляет опасность образование грибами вторичных метаболитов – микотоксинов, вызывающих тяжелые формы микотоксикозов [6–8].

Настоящая работа посвящена выявлению скрытой инфекции в образцах клубней наиболее распространенных в Республике Татарстан сортов картофеля и идентификации возбудителей заболевания методом ПЦР-диагностики.

1. Материалы и методы

В работе использовали клубни картофеля посадочного материала сортов Розара, Ред Скарлетт, Невский и Фелокс.

Микромицеты с клубней картофеля выделяли общепринятыми микробиологическими методами на соответствующих питательных средах [5, 9]. Первичную видовую идентификацию изолятов проводили с помощью морфологических признаков (цвет, характер роста мицелия, наличие и форма микро- и макроконидий, наличие склероциев, образование пигмента на среде из риса). Морфолого-культуральные свойства исследовали на натуральной среде КГА (картофеле-глюкозный агар) [10, 11].

Для определения действия выделенных микромицетов на растения использовали культуральную жидкость, полученную в процессе культивирования изолятов *Fusarium* на жидкой питательной среде (КГА). Культивирование проводили в течение 5 сут с целью возможного синтеза токсических продуктов метаболизма. Именно в этот период (стационарная фаза роста), по данным литературы [12, 13], наблюдается их накопление в культуральной жидкости.

Молекулярно-генетический анализ ДНК микромицетов проводили по методу Дружининой с соавторами [14].

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью электронных таблиц Microsoft Excel. Для представления данных использовали структурные выборочные характеристики (медиана, 2.5 перцентиль, 97.5 перцентиль). При сравнении выборок в качестве критерия значимости использовали интервальные оценки ($p \leq 0.05$).

2. Результаты и их обсуждение

С целью выявления скрытой инфекции, вызываемой микромицетами, образцы глазков картофеля с подлежащей тканью помещали на питательную среду Чапека, где наблюдали развитие микроорганизмов.

Идентификацию грибов начинали с видового осмотра колоний микромицетов. Преимущественное наличие воздушного, паутинного мицелия, окрашенного в белый, розоватый, желтовато-белый цвет, свидетельствовало о возможной принадлежности данных микромицетов к роду *Fusarium*.

С помощью микробиологических методов в образцах чистых изолятов микромицетов было установлено наличие макро- и микроконидий, определены их размер, форма, количество перегородок. Отмечено образование хламидоспор, присутствие склероциев и пионот. На среде с экстрактом риса было исследовано образование пигмента.

Табл. 1

Основные виды микромицетов рода *Fusarium*, выделенные из посевных клубней разных сортов картофеля

Источник выделения (сорт картофеля)	Вид микромицета
Розара	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. equiseti</i>
Ред Скарлетт	<i>F. sporotrichoides</i> , <i>F. oxysporum</i>
Невский	<i>F. redolens</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. oxysporum</i>
Фелокс	<i>F. oxysporum</i> , <i>F. culmorum</i>

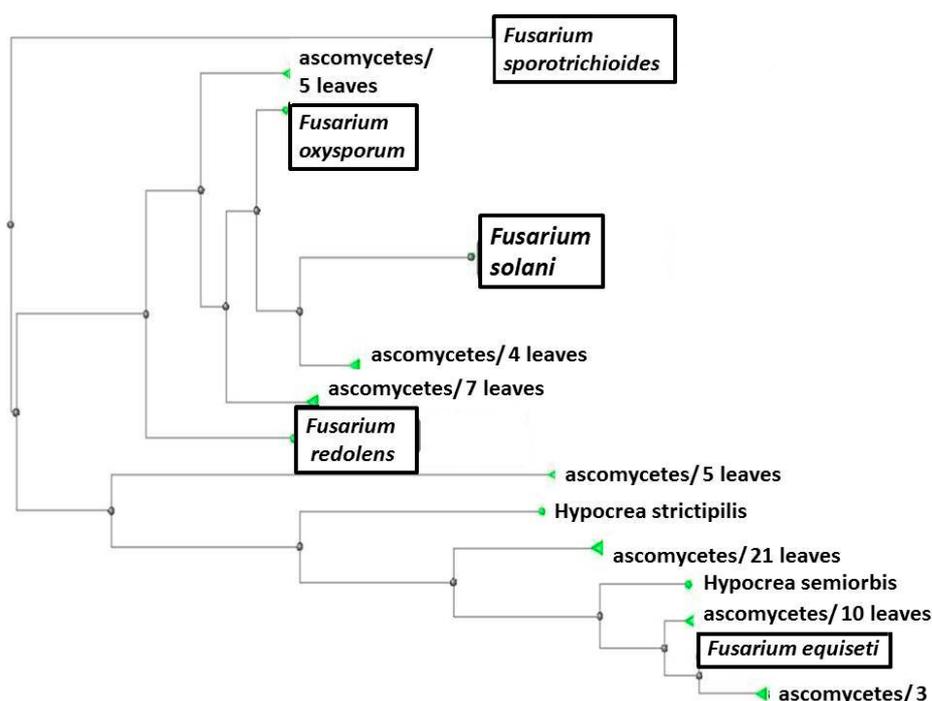


Рис. 1. Филогенетическое древо грибов рода *Fusarium*

В результате проведенных исследований было выделено 62 изолята микромицетов рода *Fusarium*, которые по морфологическим показателям были объединены в 6 групп, соответствующих отдельным видам.

Согласно данным, приведенным в табл. 1, наиболее распространенным видом оказался микромицет вида *F. oxysporum*, который выявлялся на клубнях всех сортов картофеля.

Современные исследования по идентификации микроорганизмов невозможны без экспериментов, основанных на молекулярно-генетическом анализе образцов. Поэтому дальнейшую идентификацию выделенных изолятов проводили с помощью наиболее чувствительного и специфического метода молекулярной биологии – ПЦП, с использованием высококонсервативного фрагмента рибосомальной ДНК ITS1-5.8SrDNA-ITS2. Определение положения микромицетов на филогенетическом древе осуществляли с помощью программы MrBayes 3.0B4 с использованием алгоритма Bayesian.

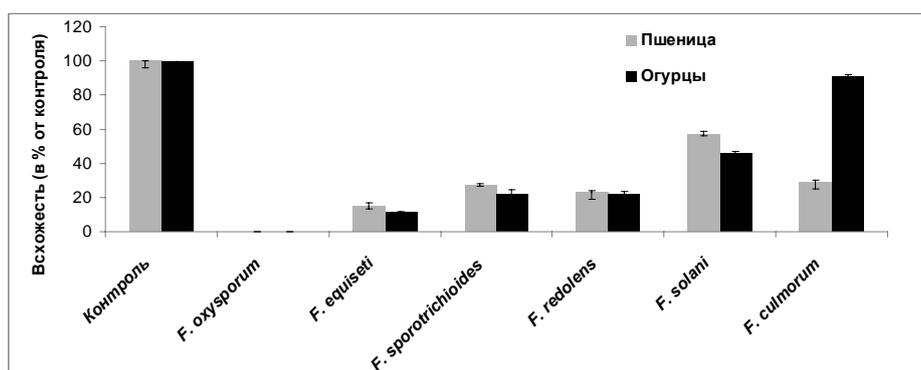


Рис. 2. Фитотоксическое действие *Fusarium* на прорастание семян пшеницы сорта Мироновская-65 и огурцов сорта Родничок

На основе полученных результатов выделения ДНК, ПЦР-реакции, амплификации и электрофореза нами было построено филогенетическое древо, где выделенные микромицеты заняли соответствующее место, которое подтвердило их видовую принадлежность (рис. 1).

Известно, что среди микромицетов рода *Fusarium* встречаются как фитопатогены, так и сапрофитные формы, поэтому выделенные изоляты микромицетов были исследованы на фитотоксичность. С этой целью использовали семена пшеницы сорта Мироновская-65 и огурца сорта Родничок (однодольные и двудольные растения). Выбор семян этих растений для данного теста обусловлен их универсальностью и высокой чувствительностью. Результаты исследований представлены на рис. 2.

Известно, что токсичными микроорганизмами считаются культуры, вызывающие снижение всхожести семян более чем на 25% по отношению к контролю [15]. Согласно данным, представленным на диаграмме, наиболее сильным фитотоксическим действием обладал изолят *F. oxysporum*. Прорастание семян в этом случае отсутствовало. Другие изоляты микромицетов обладали различной степенью фитотоксичности, и только изолят *F. culmorum* не вызывал значительных изменений в прорастании семян (менее 25%), поэтому был отнесен к сапрофитным штаммам.

Заключение

По данным литературы известно, что наибольшие потери урожая картофеля связаны с низким качеством семенного материала. Порядка 70–75% клубней семенного фонда поражены болезнями вирусной, бактериальной и грибной природы и показывают низкую урожайность. Среди грибковых болезней картофеля наиболее распространены фитофтороз, фузариоз, альтернариоз, серебристая парша, которые приводят к значительным потерям картофеля во время вегетации и хранения. Нами установлено, что в качестве инфекционного агента латентной инфекции клубней картофеля сортов Розара, Ред Скарлетт, Невский и Фелокс могут выступать микромицеты рода *Fusarium*. К данному роду относятся как патогенные, так и сапрофитные виды.

ПЦР-диагностика выделенных фитопатогенных грибов показала, что наиболее распространенным возбудителем скрытой инфекции изучаемых сортов картофеля является вид *Fusarium oxysporium*. Фитотоксичность изолятов данного вида не вызывает сомнений, поскольку культуральная жидкость микромицета полностью ингибировала прорастание контрольных семян (пшеницы сорта Мироновская-65 и огурца сорта Родничок).

Summary

R.A. Gabitov, R.T. Mukhametshina, H.A. Cabrera Fuentes, T.V. Bagaeva. Detection and Identification of Latent Infections of Potato Tubers.

In spite of active measures being taken for the protection of agricultural plants from phytopathogens, the problem of latent infection of seeds remains urgent, particularly in the sphere of potato growing. It has been found that latent infection of potato seed tubers (Rosara, Red Scarlett, Nevsky, and Feloks varieties) is mostly caused by *Fusarium* micromycetes. Diagnosis of isolated pathogenic fungi using PCR method shows that the most common agent of latent infection of potato varieties is *Fusarium oxysporium*. Phytotoxicity of the isolates of this species is confirmed by the effect of the culture fluid of the micromycete on the germination of grain and vegetable seeds.

Key words: micromycetes, *Fusarium*, PCR, germination.

Литература

1. The American Phytopathological Society: APSnet. – URL: www.apsnet.org/online/common/search.asp, свободный.
2. Parry D.W., Jenkinson R., Mcleod L. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals – a review // Plant Pathol. – 1995. – V. 44, No 2. – P. 207–238.
3. Hýsek J., Váňová M., Hajšlová J., Radová Z., Koutecká J., Tvarůžek L. Fusarioses of barley with emphasis on the content of trichothecenes // Plant Prot. Sci. – 1999. – V. 35, No 2. – P. 96–102.
4. Tvamzek L. The results of two years survey of toxigenic and non toxigenic *Fusarium* spp. Incidence in the foot rot diseases of winter cereals // Second (COST 835) Workshop on Mycotoxins in Plant Diseases. – Roma, Italy, 1999. – V. 10. – P. 7–9.
5. Рудаков О.Л., Рудаков В.О. Хронические болезни картофеля и меры борьбы // Агро XXI. – 2006. – № 7–9. – С. 107–119.
6. Salas B., Steffenson B.J., Casper H.H., Tacke B., Prom L.K., Fetch T.G. Jr., Schwarz P.B. *Fusarium* species pathogenic to barley and their associated mycotoxins // Plant Disease. – 1999. – V. 83, No 7. – P. 667–674.
7. Boonpasart S., Kasetsuwan N., Puangsricharern V., Pariyakanok L., Jitpoonkusol T. Infectious keratitis at King Chulalongkorn Memorial Hospital: a 12-year retrospective study of 391 cases // Med. Assoc. Thai. – 2002. – V. 85, Suppl. 1. – P. S217–S230.
8. Vismar H.F., Marasas W.F., Rheeder J.P., Joubert J.J. *Fusarium dimerum* as a cause of human eye infections // Med. Mycol. – 2002. – V. 40, No 4. – P. 399–406.
9. Семенов С.М. Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 230 с.
10. Билай В.И. Фузариин. – Киев: Наукова Думка, 1971. – 167 с.
11. Новое в систематике и номенклатуре грибов / Под ред. Ю.Т. Дьякова, Ю.В. Сергеева. – М.: Нац. акад. микологии – Медицина для всех, 2003. – 496 с.

12. Горленко М.В. Сельскохозяйственная фитопатология. – М.: Высш. шк., 1968. – 434 с.
13. Пересыпкин В.Ф. Сельскохозяйственная фитопатология. – М.: Колос, 1974. – 560 с.
14. Druzhinina I.A., Cubicek C.P. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea* from aggregate species to species cluster // J. Zhejiang Univ. Sci. B. – 2005. – V. 5, No 2. – P. 98–105.
15. Сираева З.Ю., Захарова Н.Г., Егоров С.Ю. Совместное применение бацизулина с пестицидами // Вестн. Рос. акад. с.-х. наук. – 2006. – № 4. – С. 43–45.

Поступила в редакцию
14.03.12

Габитов Рустем Амирович – аспирант кафедры биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Мухаметшина Регина Талгатовна – аспирант кафедры биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Кабрера Фуентес Эктор Алехандро – аспирант кафедры микробиологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

Багаева Татьяна Вадимовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии Казанского (Приволжского) федерального университета.
E-mail: Tatiana.Bagaeva@ksu.ru