
БИОТЕХНОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.2

ВЫЯВЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ БИОТИПОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ АНТРАКНОЗА ЛЮПИНА В ХОДЕ МОРФОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

© М. С. Кобозева, Р. Б. Ахмедов, В. В. Заякин
M. S. Kobozeva, R. B. Akhmedov, V. V. Zayakin

The identification of various biotypes of the pathogen of anthracnose of lupine
in the course of morphological and molecular-genetic analysis

ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет им. акад. И. Г. Петровского», кафедра химии
241036, Россия, г. Брянск, ул. Бежицкая, 14. Тел.: +7 (919) 298-13-46, e-mail: bobunovamarina@mail.ru

Аннотация. В ходе микробиологических и молекулярно-генетических исследований были получены и охарактеризованы культуры трёх природных биотипов *Colletotrichum acutatum* и отработана методика его молекулярно-генетической диагностики. Это позволяет перевести биотипы в статус референтных и использовать в различных исследованиях в области персистенции патогена, его резистентности к фунгицидам, а также устойчивости люпина к развитию антракноза.

Ключевые слова: антракноз люпина, молекулярно-генетический анализ, ITS-область, ISSR-PCR, *Colletotrichum acutatum*.

Abstract. In molecular-genetic and microbiological studies, cultures of three natural biotypes of *Colletotrichum acutatum* were obtained and characterized, and methods of molecular-genetic diagnosis worked out. It allows to transfer biotypes to the status of referent and use them in various kinds of research in the field of persistence of the pathogen, its resistance to fungicides, and resistance of lupin to the development of anthracnose.

Keywords: anthracnose of lupine, molecular-genetic analysis, ITS-region, ISSR-PCR, *Colletotrichum acutatum*.

DOI: 10.22281/2307-4353-2017-4-59-62

Введение

Антракноз – заболевание растений, вызываемое несовершенными грибами из разных родов. Основным возбудителем антракноза люпина является *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds. Данный патоген паразитирует на всех видах люпина, при этом имеются данные, что существует несколько фенотипически различных рас (биотипов) возбудителя, возможно, различной видовой локализации, патогенности и резистентности к фунгицидам (Такунов, 1996).

Целью нашей работы являлась диагностика возбудителя антракноза, а также выявление и характеристика существующих в нашем регионе биотипов фитопатогена. Для этого был проведён ряд микробиологических и молекулярно-генетических исследований.

Материалы и методы

Для работы использовали полевой растительный материал трёх видов люпина с полей ФГБУН ВНИИ Люпина (Брянская область) с видимыми признаками развития антракноза. Данный материал использовался для получения чистых моноспоровых грибных культур. Для этого проводили посев грибных спор с имеющихся на растениях язв на агаризованную среду Чапека. Первый посев проводили методом штриха. После пары дней культивирования, выросшие небольшие колонии пересаживали на новую чашку Петри (по: Гаджиева, Гутковская, 2013).

ДНК-анализ проводили методом полимеразной цепной реакции. Сначала были получены образцы геномной ДНК выделенных грибных культур. Затем на основе полученной ДНК-матрицы синтезировали участок ITS-области гена рибосомальной РНК (Ахмедов, Се-

лезнёва, 2016). Выявление различных биотипов возбудителя проводили методом полимеразной цепной реакции, в ходе которой синтезировались межмикросателлитные участки ДНК патогена (Archak, 2003; Ахмедов, 2014).

Результаты и их обсуждение

С растительного материала белого и жёлтого люпина были получены по две моноспоровые культуры близкой морфологии (рис. 1). С растительного материала узколистного люпина – четыре моноспоровые культуры различной морфологии (рис. 2). Для установления таксономической принадлежности полученных штаммов проводили молекулярно-генетический анализ.

При этом было установлено, что даже небольшие изменения условий культивирования при сохранении состава питательной среды неизменным способствуют морфологической изменчивости.

Так, летняя культура кремового цвета имеет явно выраженные тёмные (вероятно меланизированные) кольца дневного нарастания, которые не наблюдаются на зимней кремовой культуре того же штамма. При культивировании данного штамма в условиях термостата при 28°C растёт безконтрастный мицелий серого цвета (рис. 3).

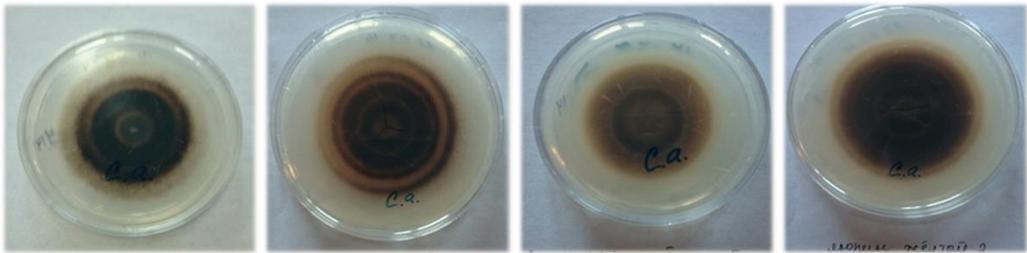


Рис. 1. Моноспоровые грибные культуры с белого и жёлтого люпина. Культуры кремового цвета с тёмными (почти чёрными) концентрическими кольцами.

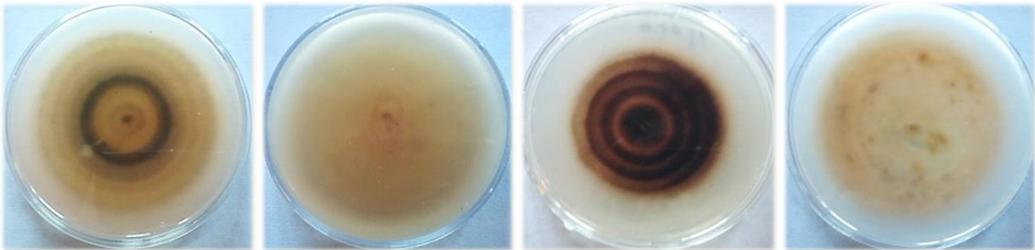


Рис. 2. Моноспоровые грибные культуры с узколистного люпина.

Первая культура розово-кремового цвета с тёмно-зелёными кольцами нарастания. Вторая – розового (при старении кремового) цвета без концентрических колец. Третья аналогична культурам с белого и жёлтого люпина. Четвёртая – розового цвета без колец нарастания с мало выраженными уплотнениями гиф.



Рис. 3. Морфологическая изменчивость фитопатогена при различных условиях культивирования.

Исходя из этого, становится очевидным, что точная диагностика возбудителя, а также различных его биотипов возможна только современными молекулярно-генетическими методами.

В ходе диагностического ПЦР-анализа из восьми моноспоровых культур положительную реакцию дали четыре. Это третья и четвертая культуры с узколистного люпина и все – с белого и жёлтого люпина. В качестве положительного контроля использовали моноспоровую культуру *S. acutatum*, полученную из Республики Беларусь (рис. 4).

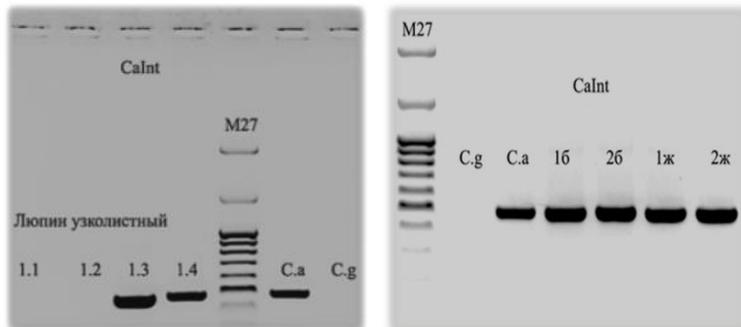


Рис. 4. Электрофореграммы продуктов ПЦР.

Далее был проведён молекулярно-генетический анализ моноспоровых культур *S. acutatum* с целью выделения генетически различных грибных биотипов. В результате анализа были получены электрофореграммы, даже при первичном анализе которых установлено наличие существенных различий в генетике отдельных грибных культур (рис. 5).

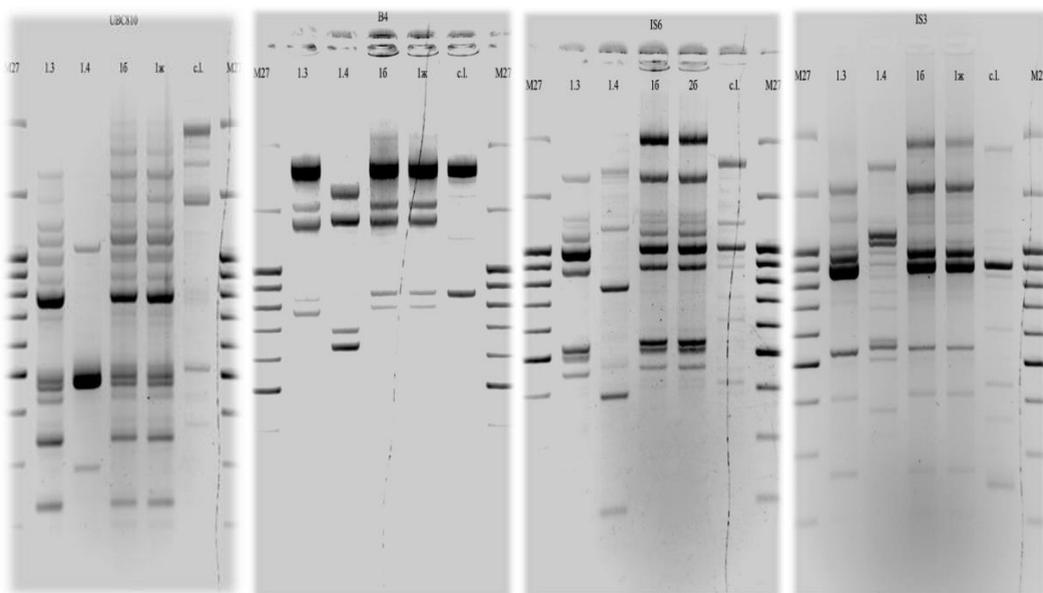


Рис. 5. Электрофореграммы продуктов ISSR-PCR.

Затем на основе полученных электрофоретических профилей были составлены генетические формулы моноспоровых культур *S. acutatum*. Для выявления их филогенетической близости рассчитаны значения коэффициентов сходства Сьёренсена-Чекановского (Лукашов, 2009).

Было установлено, что третий образец с узколистного люпина и все образцы с белого и жёлтого люпина являются одним биотипом, поскольку они либо генетически идентичны, либо отличаются незначительно (значение коэффициента сходства – от 0,92 до 1,00).

Четвёртый образец с узколистного люпина по своей генетике сильно отличается от первого биотипа (значение коэффициента сходства с первым биотипом – от 0,14 до 0,17). Он определён как второй биотип *S. acutatum*.

Контрольный образец из Беларуси определен как третий биотип, поскольку он генетически сильно отличается как от первого, так и второго биотипов (значение коэффициента сходства с первым биотипом – 0,24, со вторым биотипом – 0,23).

Заключение

В результате проведённого исследования получены моноспоровые культуры основного возбудителя антракноза люпина – *S. acutatum* и отработана методика молекулярно-генетической его диагностики. Морфологический, микроскопический и молекулярно-генетический анализ отдельных грибных культур *S. acutatum* позволил выделить и охарактеризовать три грибных биотипа. Это позволяет перевести их в статус референтных и использовать в различных исследованиях в области персистенции патогена, его резистентности к фунгицидам, а также устойчивости люпина к развитию антракноза.

Список литературы

Ахмедов Р. Б., Нам И. Я., Заякин В. В. 2014. Молекулярно-генетический анализ сортов *Alopecurus pratensis* L. (Poaceae) // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 18-я Международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 2014 г.). Сб. тезисов. Пушино. С. 9. [Akhmedov R. B., Nam I. Ya., Zayakin V. V. 2014. Molekulyarnogeneticheskii analiz sortov *Alopecurus pratensis* L. (Poaceae) // BIOLOGIYA – NAUKA KhKhI VEKA: 18-ya Mezhdunarodnaya Pushchinskaya shkola-konferentsiya molodykh uchenykh (Pushchino, 2014 g.). Sb. tezisov. Pushchino. P. 9.]

Ахмедов Р. Б., Селезнёва М. С. 2016. Подтверждение видовой принадлежности возбудителя антракноза узколистного люпина с помощью ПЦР ITS-области кластера рибосомальных генов // Уч. зап. Брянского гос. ун-та. Физико-математические науки / Биологические науки / Ветеринарные науки. № 1. С. 64–70. [Akhmedov R. B., Selezneva M. S. 2016. Podtverzhdenie vidovoi prinadlezhnosti vozбудitelya antraknoza uzkolistnogo lyupina s pomoshch'yu PТsR ITS-oblasti klastera ribosomal'nykh genov // Uch. zap. Bryanskogo gos. un-ta. Fiziko-matematicheskie nauki / Biologicheskie nauki / Veterinarnye nauki. № 1. P. 64–70.]

Гаджиева Г. И., Гутковская Н. С. 2013. Методические указания по определению заражённости семян люпина антракнозом. Минск. 20 с. [Gadzhieva G. I., Gutkovskaya N. S. 2013. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu zarazhennosti semyan lyupina antraknozom. Minsk. 20 p.]

Лукашов В. В. 2009. Молекулярная эволюция и филогенетический анализ: уч. пособие. М.: БИНОМ. 256 с. [Lukashov V. V. 2009. Molekulyarnaya evolyutsiya i filogeneticheskii analiz: uch. posobie. M.: BINOM. 256 p.]

Такунов И. П. 1996. Люпин в земледелии России: монография. Брянск: Придесенье. 372 с. [Takovov I. P. 1996. Lyupin v zemledelii Rossii: monografiya. Bryansk: Pridesen'e. 372 p.]

Archak S. 2003. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analyses of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India / S. Archak [et al.] // Genome. V. 46. P. 362–369.

Сведения об авторах

Кобозева Марина Сергеевна
аспирант кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
им. акад. И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: bobunovamarina@mail.ru

Ахмедов Роман Бахтиярович
аспирант кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
им. акад. И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: roma.akhmedov.91@mail.ru

Заякин Владимир Васильевич
д. б. н., профессор кафедры химии
ФГБОУ ВО «Брянский государственный университет
им. акад. И. Г. Петровского», Брянск
E-mail: iyanam1@yandex.ru

Kobozeva Marina Sergeevna
Postgraduate of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: bobunovamarina@mail.ru

Akhmedov Roman Bakhtiyarovich
Postgraduate of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: roma.akhmedov.91@mail.ru

Zayakin Vladimir Vasil'evich
Sc. D. in Biology, Professor of the Dpt. of Chemistry
Bryansk State University
named after Acad. I. G. Petrovsky, Bryansk
E-mail: iyanam1@yandex.ru