

## ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К ФУНГИЦИДАМ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO* ИЗОЛЯТОВ ГРИБА *TILLETIA CARIES* TUL. ИЗ РАЗЛИЧНЫХ АГРОКЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН РЕСПУБЛИКИ БАШКОРТОСТАН

©2013 Л.Г. Яруллина<sup>1</sup>, О.Б. Сурина<sup>1</sup>, Б.Р. Кулуев<sup>1</sup>,  
И.А. Умаров<sup>2</sup>, Л.М. Яруллина<sup>2</sup>, Р.И. Ибрагимов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, г. Уфа

<sup>2</sup>Башкирский государственный университет, г. Уфа

Поступила 03.06.2013

Был проведен анализ морфо-физиологических и молекулярно-генетических параметров изолятов *T. caries*, собранных с полей различных агроклиматических зон Республики Башкортостан. Полученные результаты позволяют предположить, что неблагоприятные экологические условия, в том числе высокая пестицидная нагрузка, могут способствовать возникновению новых резистентных к фунгицидам форм патогена *T. caries*.

**Ключевые слова:** *Tilletia caries*, различные агроценозы, экологические факторы, байтан, устойчивость к фунгицидам.

Наиболее распространенными и вредоносными патогенами зерновых культур на территории Республики Башкортостан является головневые грибы, борьба с которыми в настоящее время является важной задачей [1]. Возбудитель твердой головни биотрофный патоген *Tilletia caries* (DC.) Tull проникает в растение главным образом через колеоптиле в течение нескольких суток после прорастания зерновки. До начала налива зерна болезнь развивается бессимптомно, а гифы патогена в тканях растения-хозяина встречаются крайне редко [2], что весьма затрудняет исследование механизмов устойчивости к патогену. Развитие возбудителя твердой головни на тканях пшеницы удобно изучать с использованием совместной культуры патогена и каллусов пшеницы, в которой грибок в течение нескольких месяцев развивается как экто-, так и эндофитно [3]. Используя внетканевую мицелий гриба, собранный с поверхности каллусов пшеницы, можно изучать генетическое разнообразие естественных популяций патогенных грибов [4].

Защита растений от возбудителей твердой и пыльной головни обеспечивается только химическими протравителями. Сравнительно недавно против головневых болезней растений широко применялся фунгицид Карбоксин – ингибитор дыхания грибов [5, 6]. Позднее в защите злаковых культур от головневой инфекции стали широко применяться фунгициды азолового ряда или их смеси (Дерозол Евро, Конкур КЭ), обладающие не только высокой фунгицидной активностью, но и четко выраженными свойствами регуляторов роста [7].

Установлено, что в наименьших биологически активных концентрациях они ингибируют деметилирование ланостерина в положении С-14, что является первым шагом в превращении ланостерина в эргостерин, который требуется для нормального роста большинства грибов [8,9]. Стали известны и другие механизмы действия фунгицидов азолового ряда на грибные патогены. Выяснилось, в частности, что под их влиянием у *Ustilago maydis* происходит трансформация генов β-тубулина [10,11].

Интенсивное применение химических средств защиты растений приводит к изменению морфологических и генетических параметров патогенов. Обнаружено, что скорость роста и количество образующихся спор у штаммов грибов р. *Bipolaris* и р. *Septoria*, культивируемых в условиях повышающихся концентраций фунгицидов, ниже, чем скорость роста диких типов, а развитие резистентности грибов к ингибиторам биосинтеза эргостерина обычно сопровождается снижением уровня их адаптации [12-14]. В то же время было показано, что штамм *Fusarium solani*, резистентный к фунгициду азолового ряда Байтану, быстро рос в условиях значительного изменения температуры и pH среды [15].

В ряде хозяйств нередко применяют фунгициды без учета видового состава возбудителей болезни, характерных для конкретного региона. Дело усугубляется и тем, что часто приобретаются более дешевые препараты, не соответствующие современным требованиям эффективности и экологической безопасности [16]. Все это приводит к длительной и неоправданно высокой пестицидной нагрузке, следствием которой является появление новых резистентных штаммов патогенов.

В связи со сказанным, значительный интерес представляет изучение морфо-физиологических и молекулярно-генетических параметров изолятов *T. caries*, собранных с растений мягкой пшеницы из различных агроценозов, а также культивируемых *in vitro* с добавлением фунгицидов.

Яруллина Любовь Георгиевна, д.б.н., ведущий научный сотрудник, e-mail: yarullina@bk.ru; Сурина Ольга Борисовна, к.б.н., научный сотрудник, e-mail: phyto@anrb.ru; Кулуев Булат Рязанович, к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: kuluev@bk.ru; Умаров Ильгиз Авазович, к.б.н., ассистент, e-mail: ilgiz.umarov@gmail.com; Яруллина Лилия Маратовна, аспирант, e-mail: Lilechek89\_89@mail.ru; Ибрагимов Ринат Исмаглович, д.б.н., зав. кафедрой, e-mail: ibragimov56@yandex.ru

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве эксплантов для получения каллусной ткани использовали незрелые зародыши мягкой пшеницы сорта Жница. Часть каллусов пересаживали на среду Мурасиге и Скуга (МС), в которую добавляли Байтан в концентрации 0.1 и 1.0 мг/л. Эти концентрации фунгицида применялись нами для исследования его влияния на рост *T. caries* на каллусах пшеницы. Инфекционным материалом служили телиоспоры из соросов, образованных на пораженных колосьях пшеницы, которые были собраны в агробиоценозах Республики Башкортостан с различной пестицидной нагрузкой: Южная лесостепь – высокая (изолят 1) и Северная лесостепь – низкая (изолят 2).

Телиоспоры (80-100 шт на каллус) наносили на каллусы спустя 3 сут от начала пассажа. Оценивали сроки прорастания спор, морфологию и интенсивность развития воздушного мицелия и мицелия, развивающегося внутри каллусов через 15 и 25 сут после их инфицирования. Цитологические исследования проведены на микроскопе Imager M1.

ДНК выделяли из воздушного мицелия, собранного с каллусов пшеницы при помощи набора ДНК-сорб (Интерлабсервис, Россия). Качество и количество выделенных препаратов определяли аналитическим электрофорезом в 1% агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (Bio-Rad, США).

Для амплификации участка гена 18S РНК *T. caries* использовали универсальные праймеры NS1

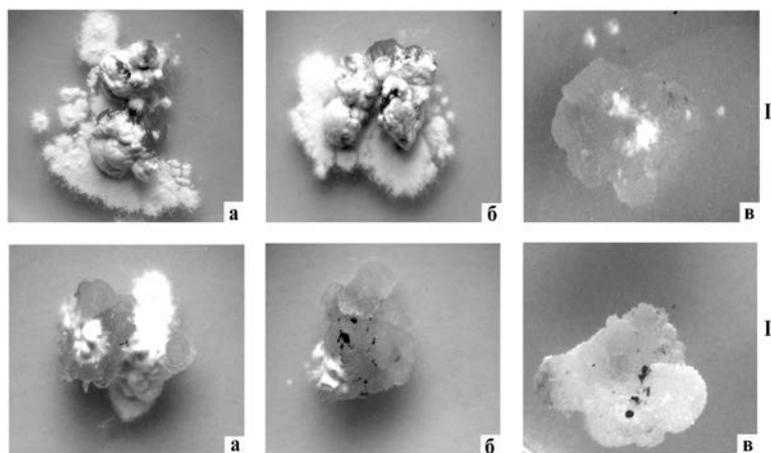
GTAGTCATATGCTTGTCTC, NS2  
GGCTGCTGGCACCAGACTTGC, NS3  
GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC и NS4  
CTTCCGTCAAATTCCTTTAAG (Gargas, Taylor, 1992). Для ПЦР использовали амплификаторы производства компании “ДНК-технология” (Россия). Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе “GenomeLab” (Beckman-Coulter, США). Поиск гомологичных генов и выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли при помощи программ MegAlign пакета Lasergene (DNASTAR, США) и MegaBlast, доступной через сайт <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием компьютерных программ StatSoft (Statistica 6.0).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдения за ростом и развитием гриба на каллусах показали, что споры изолята 1 начинали прорастать уже через 5 сут после инокуляции каллусов, а спустя 15 сут мицелий покрывал 80% их поверхности (рис. 1 I-a).

Прорастание спор изолята 2 происходило только через 10 сут после их нанесения, а спустя 15 сут мицелий покрывал до 40 % поверхности каллусов (рис. II-a). Мы заметили, что воздушный мицелий изолята 1 легко отделялся от каллусной ткани, тогда как мицелий изолята 2 был от нее почти неотделим.



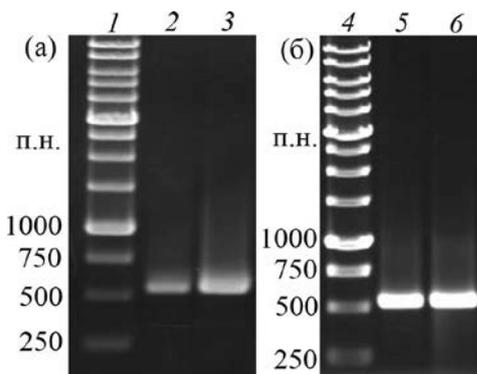
**Рис. 1.** Интенсивность развития изолятов 1 (I) и 2 (II) *Tilletia caries* в совместной культуре с каллусами пшеницы. 15 сут после инокуляции. а – среда МС, б – среда МС+0.1 мг/л Байтана, в – среда МС+1.0 мг/л Байтана

Прорастание спор изолята 2 происходило только через 10 сут после их нанесения, а спустя 15 сут мицелий покрывал до 40% поверхности каллусов (рис. II-a). Мы заметили, что воздушный мицелий изолята 1 легко отделялся от каллусной ткани, тогда как мицелий изолята 2 был от нее почти неотделим.

Морфо-физиологические различия природных изолятов *T. caries* могли быть обусловлены различиями их генотипов.

Для выявления генетического различия из воздушного мицелия, образованного на каллусах пшеницы, была выделена ДНК. Из образцов ДНК изолята 1 *T. caries* при помощи пар праймеров NS1/NS2 и NS3/NS4 были амплифицированы оба участка гена 18S РНК. Размеры ампликонов совпа-

ли с теоретически ожидаемыми и составили немногим более 500 п.н. (рис. 2а).



**Рис. 2.** Электрофореграмма результатов ПЦР участка гена 18S РНК изолятов 1 (а) и 2 (б) *T. caries*. 1 и 4 - маркер молекулярного веса (Сибэнзим, Россия). 2 – ампликон NS1/NS2 изолята 1 *T. caries*. 3 - ампликон NS3/NS4 изолята 1 *T. caries*. 4 - ампликон NS1/NS2 изолята 2 *T. caries*. 5 - ампликон NS3/NS4 изолята 2 *T. caries*

Таким же образом, были получены ампликоны NS1/NS2 и NS3/NS4 изолята 2 *T. caries* (рис. 2б). Затем 4 целевых ампликона были очищены при помощи набора фирмы Цитокин (Россия) и осуществлено определение их нуклеотидных последовательностей. Поиск сходных последовательностей нуклеотидов при помощи программы MegaBlast показал высокий уровень гомологии выделенных нами ампликонов с участком гена малой субъединицы 18S РНК *Tilletia caries* (U00972.1), *Tilletia goloskokovii* (DQ832247.1), *Tilletia controversa* (DQ832245.1) и *Tilletia iowensis* (DQ832252.1). Наиболее точные данные по последовательности нуклеотидов были получены для ампликонов NS1/NS2, поэтому было проведено сравнение именно этих ампликонов у изолятов 1 и 2 при помощи программы MegAlign. Сравнение нуклеотидных последовательностей двух изолятов показало высокий уровень гомологии между ними, но были обнаружены и большое количество нуклеотидных замен (рис. 3). Наиболее характерным было выщепление 5-ти нуклеотидов в 461 положении у изолята 2, по сравнению с изолятом 1.



**Рис. 3.** Сравнение нуклеотидных последовательностей участка гена 18S РНК изолятов 1 и 2 гриба *T. caries* из различных агроклиматических зон Республики Башкортостан. Совпадения нуклеотидов обозначены серым цветом, а различия – белым

Последовательности нуклеотидов участка гена 18S РНК двух изолятов *Tilletia caries* были отправлены в Генбанк и зарегистрированы под номерами: изолят 1 – JQ955604; изолят 2 – JQ955605. Таким образом, выявленные морфо-физиологические особенности изолятов из различных агроценозов были подтверждены их генетическими различиями.

Известно, что в природных условиях головным грибам свойственен половой процесс, являющийся основой формирования их новых форм и рас [2]. В то же время, не исключена возможность появления новых форм патогена под влиянием изменяющихся экологических условий, в том числе интенсивного применения фунгицидов в сельском хозяйстве [17]. В связи с этим значительный интерес представляло изучения их роста и развития на каллусах пшеницы в присутствии неблагоприятного фактора – фунгицида Байтана.

Результаты наших наблюдений выявили различную устойчивость изолятов *T. caries* к фунгициду Байтану. Так, введение в среду культивирования 0.1 мг/л Байтана задерживало прорастание спор

изолята 2 на 10 суток. Причем, скорость его распространения по каллусу также снижалась: через 15 сут после прорастания спор мицелий гриба покрывал лишь 20 % поверхности каллусов (рис. 1, П-б). Добавление Байтана в концентрации 1мг/л в среду МС приводило к полному подавлению прорастания спор изолята 2 гриба *T. caries* (рис. 1, П-в).

Изолят 1 проявил значительно более высокую устойчивость к фунгициду: введение в среду культивирования 0.1 мг/л Байтана не оказывало влияние на рост гриба (рис. 1, I-б). Значительное снижение скорости роста гриба наблюдалось только при добавлении в среду культивирования Байтана в концентрации 1.0 мг/л (рис. 1, I-в).

Таким образом, нами выявлены морфо-физиологические и молекулярно-генетические различия между изолятами *T. caries*, собранными с растений пшеницы различных агроклиматических зон Республики Башкортостан. Различия касались скорости роста и развития изолятов гриба на каллусах пшеницы, растущих на питательной среде

МС, а также при добавлении в среду культивирования фунгицида Байтана в концентрациях 0,1 и 1,0 мг/л. Полученные данные дают основание полагать, что воздействие экологически неблагоприятных факторов среды на популяцию *T. caries*, в том числе пестицидов, приводит к появлению более устойчивых к фунгицидам форм гриба.

Работа проведена при финансовой поддержке гранта РФФИ\_поволжье\_а № 11-04-97037 и ФЦП ГК № 01201353578.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаренко В.А. Проблема резистентности вредных организмов к пестицидам мировая проблема // Вестник защиты растений. 2001. № 1. С. 1-17.
2. Каратыгин И.В. Головные грибы (онтогенез и филогенез). Л.: Наука, 1981. 216 с.
3. Минаева Л.А., Андреева Е.И. О резистентности возбудителей болезней к фунгицидам – ингибиторам синтеза эргостеролов // Деп. № 1048-Х1188. Черкассы, 1988. 15 с.
4. Молчанов О.А., Андреева Е.И. Биологические аспекты изучения азолсодержащих фунгицидов // Химические средства защиты растений. М.: НИИТЭХИМ, 1989. 71 с.
5. Рухова Н.В. Экологические аспекты защиты озимой пшеницы от карликовой головни на выщелоченных черноземах Ставропольского края: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Ставрополь, 2005. 22 с.
6. Трошина Н.Б., Исаев Р.Ф., Яхин И.А., Яхин О.И. Влияние факторов среды на рост и развитие устойчивого к байтану штамма *Fusarium graminearum* и *Septoria nodorum* // Микология и фитопатология. 1998. Т. 32. Вып. 4. С. 58-62.
7. Трошина Н.Б., Глухенькова М.В., Максимов И.В., Сурина О.Б., Хайруллин Р.М. Морфологический анализ роста и развития *Tilletia caries* (DC.) Tul. на каллусах пшеницы // Микология и фитопатология. 2000. Т. 34. Вып. 3. С. 48-50.
8. Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Сурина О.Б., Максимов И.В. Индукторы устойчивости растений и активные формы кислорода. III. Влияние бисола 2 и байтана на морфогенез и защитный ответ клеток каллусов пшеницы, инфицированных возбудителем твердой головни // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 495-499.
9. Annamalai P., Lalithakumari D. Development of resistance of *Bipolaris oryzae* against edifenphos // Mycol. Research. 1992. V. 92. P. 454-460.
10. Fletcher R.A., Hofstra G. Triasoles as plant stress protectants // Highlights Agr. Res. 1987. V. 10. P. 12-14.
11. Gici U., Chet I., Gullino M.L. Recent Development in Management of Plant Diseases // Springer, 2009. 392 p.
12. Gold S.E., Bakkeren G., Davies J.E., Kronstad J.W. Three selectable markers for transformation of *Ustilago maydis* // Gene. 1994. V. 142. P. 225-230.
13. Keon J.P.R., White G.A., Hargreaves J.A. Isolation, characterization and sequence of a gene conferring resistance to the systemic fungicide carboxin from the maize smut pathogen *Ustilago maydis* // Curr. Genet. 1991. V. 19. P. 475-481.
14. Martinez-Espinoza A.D., Garsia-Pedrajas M.D., Gold S.E. The Ustilaginales as plant pests and model systems // Fungal Genetics and Biology. 2002. V. 35. P. 1-20.
15. Orth A.B., Rzhetskaya M., Pell E.J., Tien M. A serine protein kinase confers fungicide resistance in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis* // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. P. 2341-2345.
16. Weete J.D. Role of membranes in fungal growth suppression by sterol biosynthesis inhibitors // 5-th Int. Congr. Plant Pathol. Kyoto, 1988. P. 25.
17. Weber I., Abmann D., Thines E., Steinberg G. Polar localizing class V myosin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* // Plant Cell. 2006. V. 18. P. 225-242.

#### ASSESSMENT OF STABILITY TO FUNGICIDES IN CULTURE OF IN VITRO OF ISOLATES OF THE MUSHROOM OF TILLETIA CARIES TUL. FROM VARIOUS AGROCLIMATIC ZONES OF THE REPUBLIC OF BASHKORTOSTAN

©2013 L.G. Yarullina<sup>1</sup>, O.B. Surina<sup>1</sup>, B.R. Kuluev<sup>1</sup>,  
I.A. Umarov<sup>2</sup>, L.M. Yarullina<sup>2</sup>, R.I. Ibragimov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Sci. Center of RAS, Ufa

<sup>2</sup>The Bashkir State University, Ufa

It was conducted analysis of morpho-physiological and molecular-genetic parameters of isolates *T. caries* collected from the fields in different agroclimatic zones of the Republic of Bashkortostan. The results suggest that the adverse environmental conditions, including high pesticide load, may contribute to the emergence of new resistant to fungicides forms pathogen *T. caries*.

**Keywords:** *Tilletia caries*, various agrocenose, environmental factors, baytan, resistance to fungicides.

Liubov Yarullina, Doctor of Biology, leading researcher, e-mail: yarullina@bk.ru; Olga Surina, Candidate of Biology, researcher, e-mail: phyto@anrb.ru; Bulat Kuluev, Candidate of Biology, senior researcher, e-mail: kuluev@bk.ru; Ilgiz Umarov, Candidate of Biology, assistant, e-mail: ilgiz.umarov@gmail.com; Liliya Yarullina, postgraduate student, e-mail: Lilechek89\_89@mail.ru; Rinat Ibragimov, Doctor of Biology, professor, head of the department, e-mail: ibragimov56@yandex.ru