

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Биологический факультет

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ И ООМИЦЕТОВ В ПОРАЖЕННЫХ ЛИСТЬЯХ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА

Выпускная квалификационная работа

Студента 4 курса

Белосохова А. Ф.

Научные руководители:

д.б.н., ст. н.с. С.Н. Еланский

Л.Ю. Кокаева

- В годы эпифитотий урожайность картофеля может снижаться на 15-50%. Потери томата из-за поражения плодов могут достигать 98%.
- Ежегодные потери от фитофтороза картофеля в России в среднем составляют около 4 млн т., что по средней закупочной цене за 2014 год оценивается более, чем в 40 млрд. рублей.
- Затраты на борьбу с грибными патогенами картофеля и томата во всем мире составляют более 5 миллиардов евро ежегодно (по данным Schepers, 2009)

Цели и задачи

Цель: выявление с помощью ПЦР наиболее опасных фитопатогенных грибов в фиксированных образцах листьев картофеля и томата без выделения изолятов в чистую культуру.

Задачи:

- Верификация ПЦР-праймеров, предназначенных для идентификации исследуемых патогенов
- Идентификация *Colletotrichum coccodes*, *Phytophthora infestans*, *Alternaria solani* и *A. alternata* в образцах листьев картофеля и томата с помощью ПЦР

Места сбора образцов Томат

Место сбора	Растение-хозяин	Количество зафиксированных образцов (листьев), шт
Ростовская обл., около Ростова	<i>Solanum lycopersicum</i> , сорт Линда	13
Ростовская обл., около Армавира	<i>S. lycopersicum</i> , крупноплодный	13
Ростовская обл., около Армавира	<i>S. lycopersicum</i> , сорт Рио Браво	15
Краснодарский край, Анапский район, ст. Благовещенская	<i>S. lycopersicum</i>	12
Ставропольский край, пос. Стрелка, Темрюкский р-н	<i>S. lycopersicum</i>	16
Ставропольский край, г. Кисловодск	<i>S. lycopersicum</i>	17
Ставропольский край, Славянск-на-Кубани	<i>S. lycopersicum</i>	19

Места сбора образцов Картофель

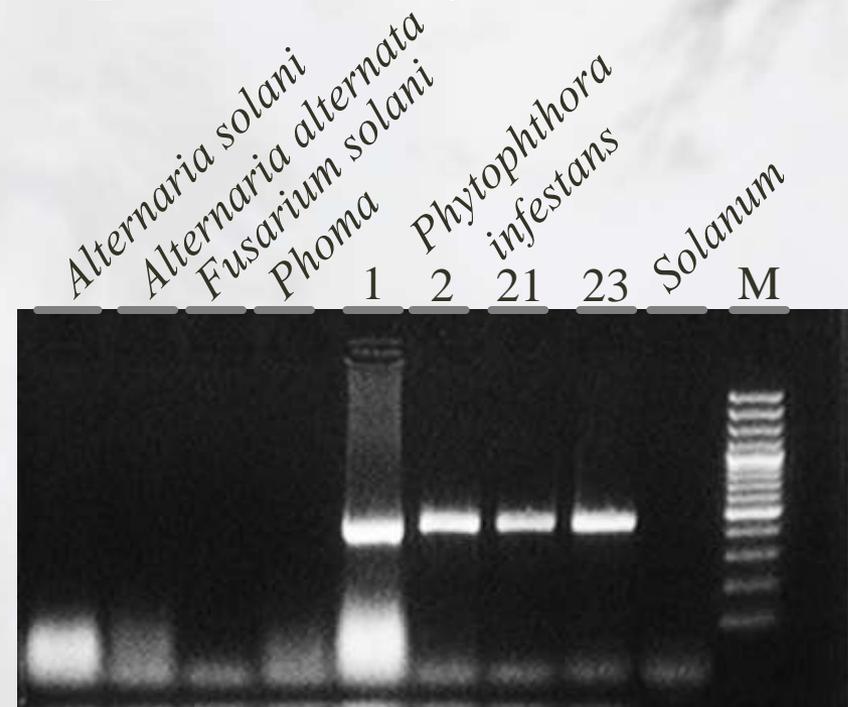
Место сбора	Растение-хозяин	Количество зафиксированных образцов (листьев), шт
Ставропольский край, КВНС, плато Шаджатмаз	<i>S. tuberosum</i>	23
Воронежская обл., с. Сергеевка, Панинский р-н	<i>S. tuberosum</i>	27
респ. Северная Осетия- Алания, с. Михайловское	<i>S. tuberosum</i>	19

Праймеры, использованные для идентификации

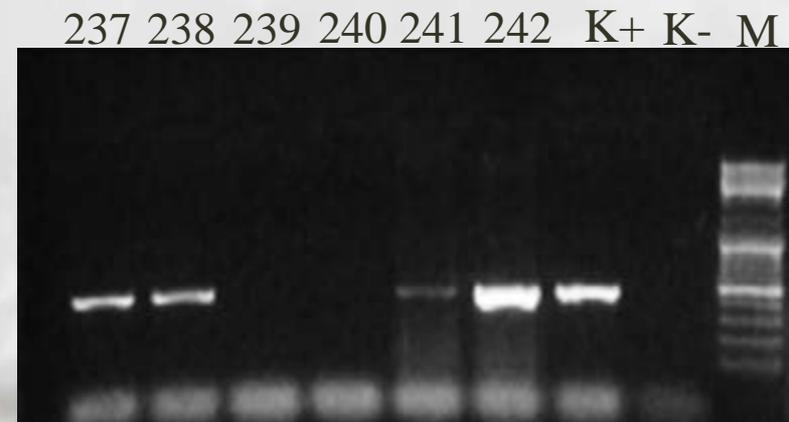
Название	Последовательность ДНК	Ссылка	Температура отжига °С
Праймеры для избирательной амплификации <i>Alternaria</i> sp			
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'	White et al., 1990	58
MR	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG GACCTTTGCTGATAGAGAGTG-3'	Elansky, Kokaeva et al., 2012	50
SR	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG CTTGGGGCTGGAAGAGAGCGC-3'	Еланский, 2012	56
Праймеры для избирательной амплификации <i>Phytophthora</i> sp			
Yph 1F	5'-CGACCATKGGTGTGGACTTT-3'	Schena et al, 2008	58
Yph 2R	5'-ACGTTCTCMCAGGCGTATCT-3'		
Праймеры для избирательной амплификации <i>C. coccodes</i>			
Cc1NF1	5'-TGCCGCCTGCGGACCCCCCT-3'	Cullen et al, 2002	66
Cc2NR1	5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA-3'		

Идентификация *Phytophthora infestans*

Электрофореграмма
контрольных амплификаций
с праймерами Yph 2R/Yph 1F



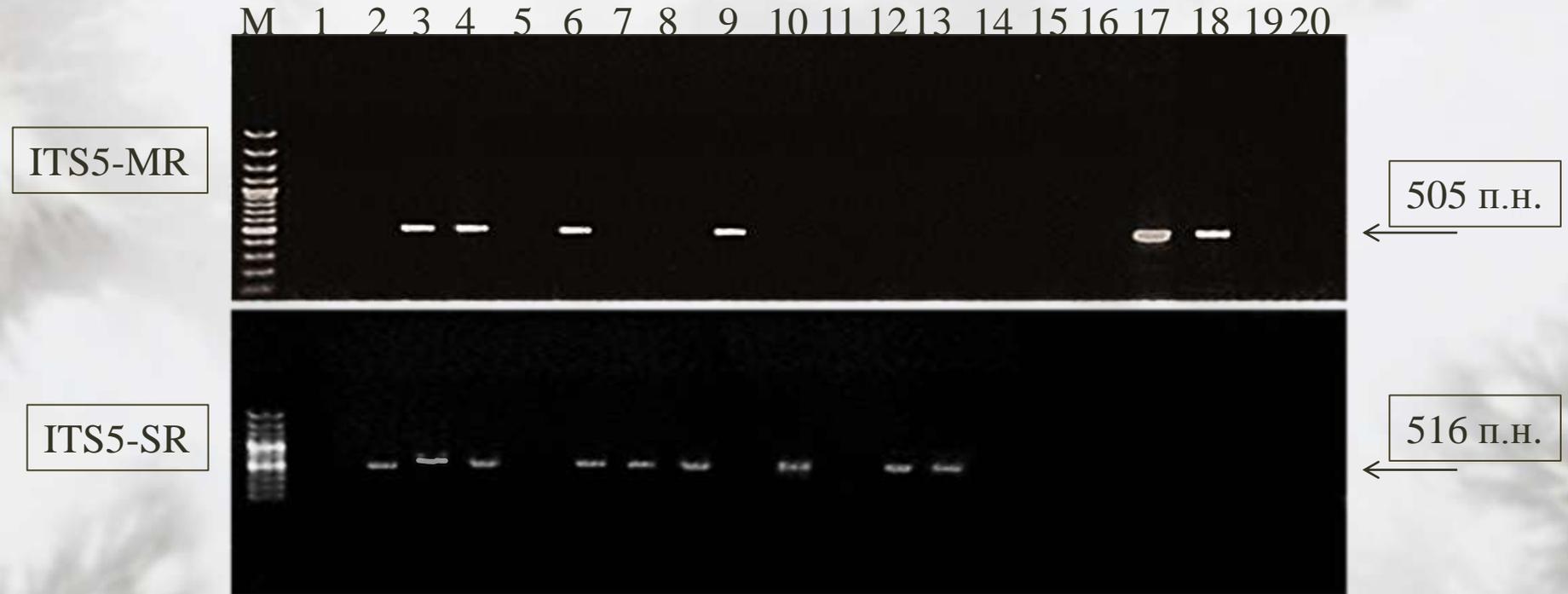
Электрофореграмма
амплифицированных
фрагментов ДНК *Phytophthora*
в образцах из респ. Северная
Осетия-Алания, картофель,
разные сорта.



Встречаемость *Phytophthora sp.* в образцах пораженных листьев

Регион России, место сбора	Растение-хозяин	Число исследованных образцов	Число образцов, в которых присутствовала <i>Phytophthora</i>
Ставропольский кр., КВНС, плато Шаджатмаз	картофель	13	9
респ. Северная Осетия- Алания, с. Михайловское	картофель	11	4
Всего картофель		24	13
Ставропольский кр, г. Кисловодск	томат	17	0
Краснодарский край, Анапский район, ст. Благовещенская	томат	12	10
Всего томат		29	10

Идентификация возбудителей альтернариоза



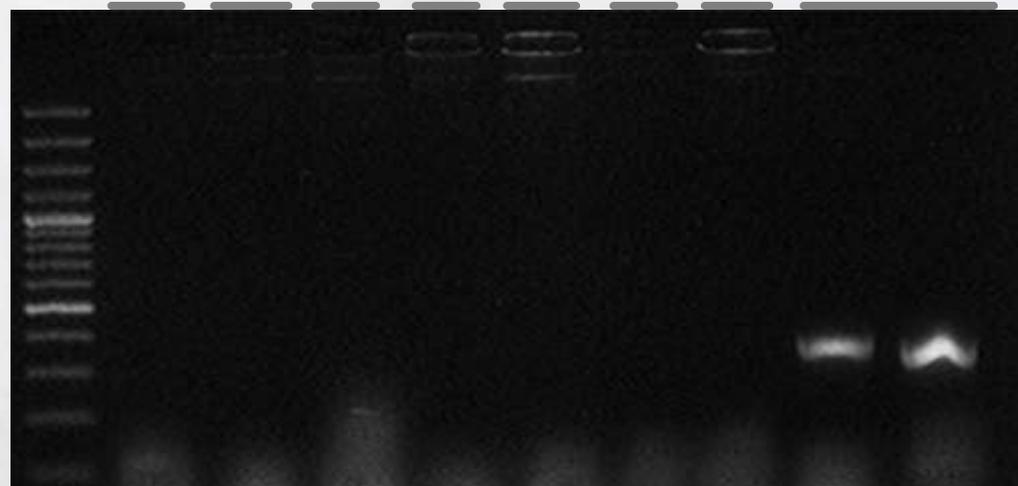
Идентификации видов *Alternaria* с помощью праймеров ITS5/MR к *Alternaria alternata* и ITS5/SR к *A. solani*. (Elansky, Kokaeva et al., 2012; Еланский, 2012)

Встречаемость возбудителей альтернариоза в образцах пораженных листьев

Регион России, место сбора	Растение- хозяин	Число исследованных образцов	Образцы с <i>A. solani</i>	Образцы с <i>A.alternata</i>	С совместным присутствием <i>A. solani</i> и <i>A.alternata</i>
Ростовская обл., Около Ростова	томат	13	0	7	0
Ростовская обл, Армавирский район	томат	13	13	6	6
Ставропольский кр, г. Кисловодск	томат	17	2	0	0
Всего томат		43	15	13	6
Ставропольский кр, КВНС, плато Шаджатмаз	картофель	23	13	14	8
Воронежская обл., Панинский р-н, Сергеевка	картофель	27	11	16	4
респ. Северная Осетия-Алания, с. Михайловское	картофель	10	5	5	5
Всего картофель		60	29	35	17

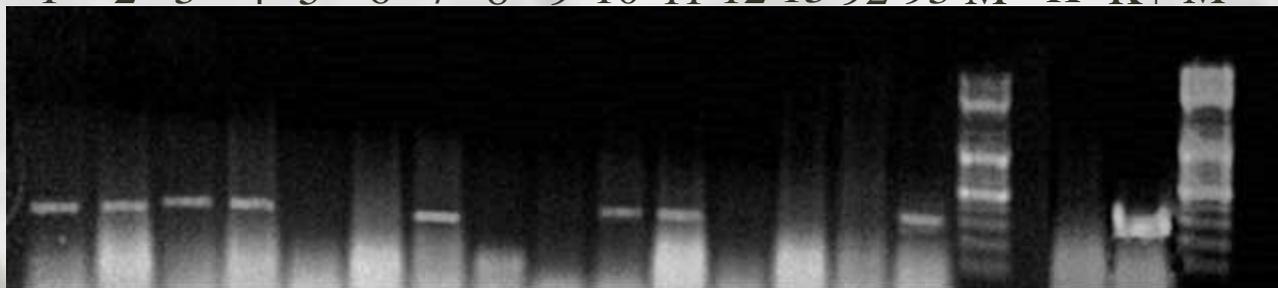
Идентификация *Colletotrichum coccodes*

M Solanum Alternaria alternata A. solani Phytophthora infestans Phoma sp. Fusarium solani Rhizocotia solani Colletotrichum coccodes



Электрофореграмма
контрольных
амплификаций с
праймерами
Cc1NF1/Cc2NR1

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 92 93 M K- K+ M



C. coccodes в
образцах листьев
томата из
Ростовской
области.

Встречаемость *Colletotrichum coccodes* в пораженных листьях

Регион России, место сбора	Растение-хозяин	Число исследованных образцов	Число образцов, в которых присутствовал <i>C. coccodes</i>
Ростовская обл, около Ростова	томат	13	7
Ростовская обл., Армаvirский р-н	томат ¹	13	1
Ростовская обл., Армаvirский р-н	томат ²	13	0
Ставропольский край, Славянск-на-Кубани	томат	19	5
Ставропольский край, пос. Стрелка, Темрюкский р-н	томат	16	0
Всего томат		74	13
респ. Северная Осетия-Алания, с. Михайловское	картофель	11	2
Всего		85	15

¹ – сливовидный томат, сорт «Рио Браво».

² – крупноплодный томат.

Выводы

1. Анализ использованных в работе праймеров на чистых культурах фитопатогенных грибов и оомицетов, выделенных с картофеля и томата, показал, что праймеры специфичны к целевому объекту, достаточно чувствительны и пригодны для идентификации возбудителей в фиксированных образцах листьев картофеля и томата.
2. С помощью ПЦР-диагностики образцов фиксированных пораженных листьев из разных регионов было показано:
 - Наличие оомицетов рода *Phytophthora* в образцах листьев картофеля и томата из Ставропольского и Краснодарского краев, а также из Северной Осетии.
 - *Alternaria solani* и *A. alternata* были найдены в образцах из Ставропольского края, Ростовской и Воронежской областей, Северной Осетии.
 - *Coletotrichum coccodes* обнаружен в образцах пораженных листьев из Ростовской области, Ставропольского края и Северной Осетии, при этом в части образцов из этих регионов он встречался совместно с *A. alternata*.
 - Образцов с совместным присутствием *Phytophthora* и видов рода *Alternaria*, а также *Phytophthora* и *C. coccodes* не было обнаружено.

Спасибо за внимание!