

Быстрая диагностика фитопатогенных микроорганизмов и ее использование в защите растений

Еланский

Сергей Николаевич

каф. микологии и альгологии



В докладе использованы результаты:

Л.Ю. Кокаевой

М.А. Побединской

И.А. Кутузовой

А.Ф. Белосохова

Г.Л. Белова

Тест-системы

Взаимодействие антигена с антителом



**Иммуно-
ферментный
анализ (ИФА)**

**Иммуно-
хроматографический
анализ (ИХА)**

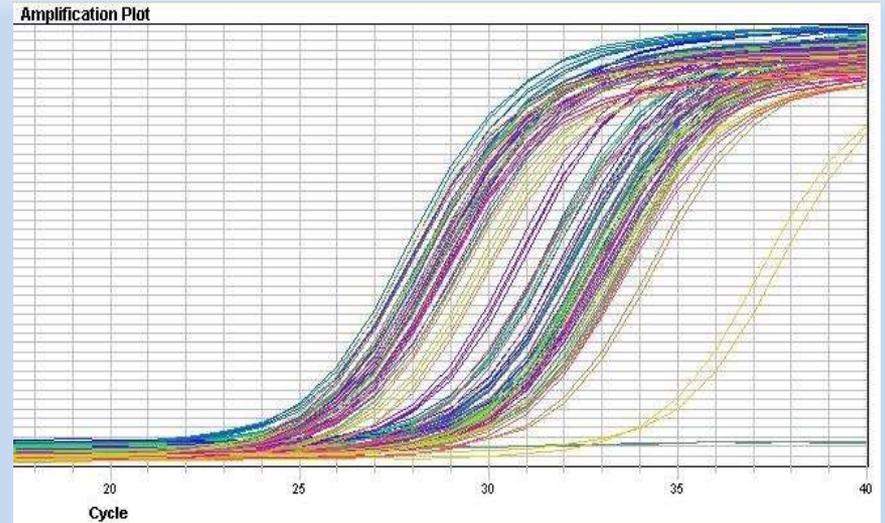


Диагностика по структуре участков генома

ПЦР и ПЦР в реальном времени



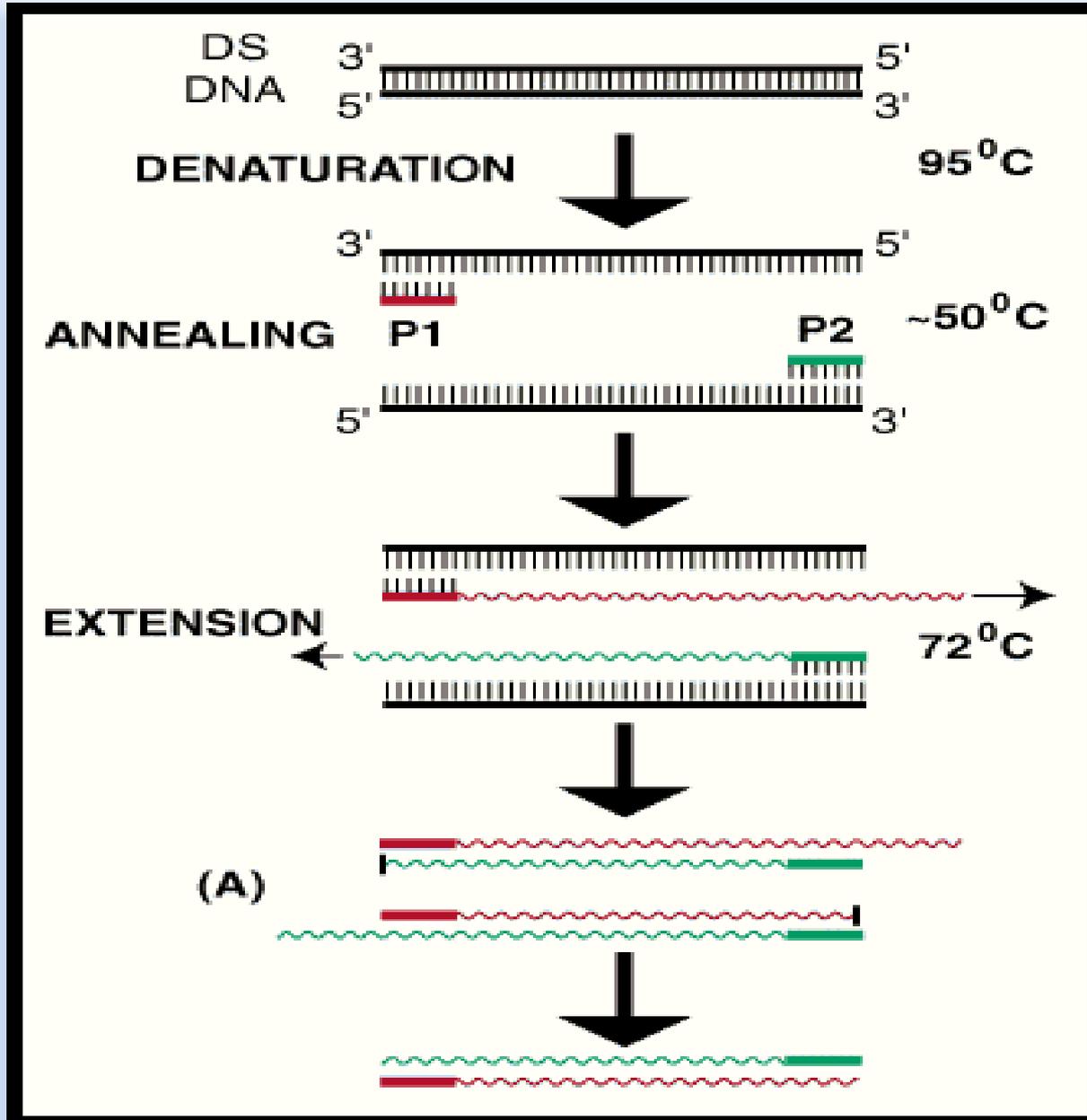
Визуализация результатов ПЦР в геле



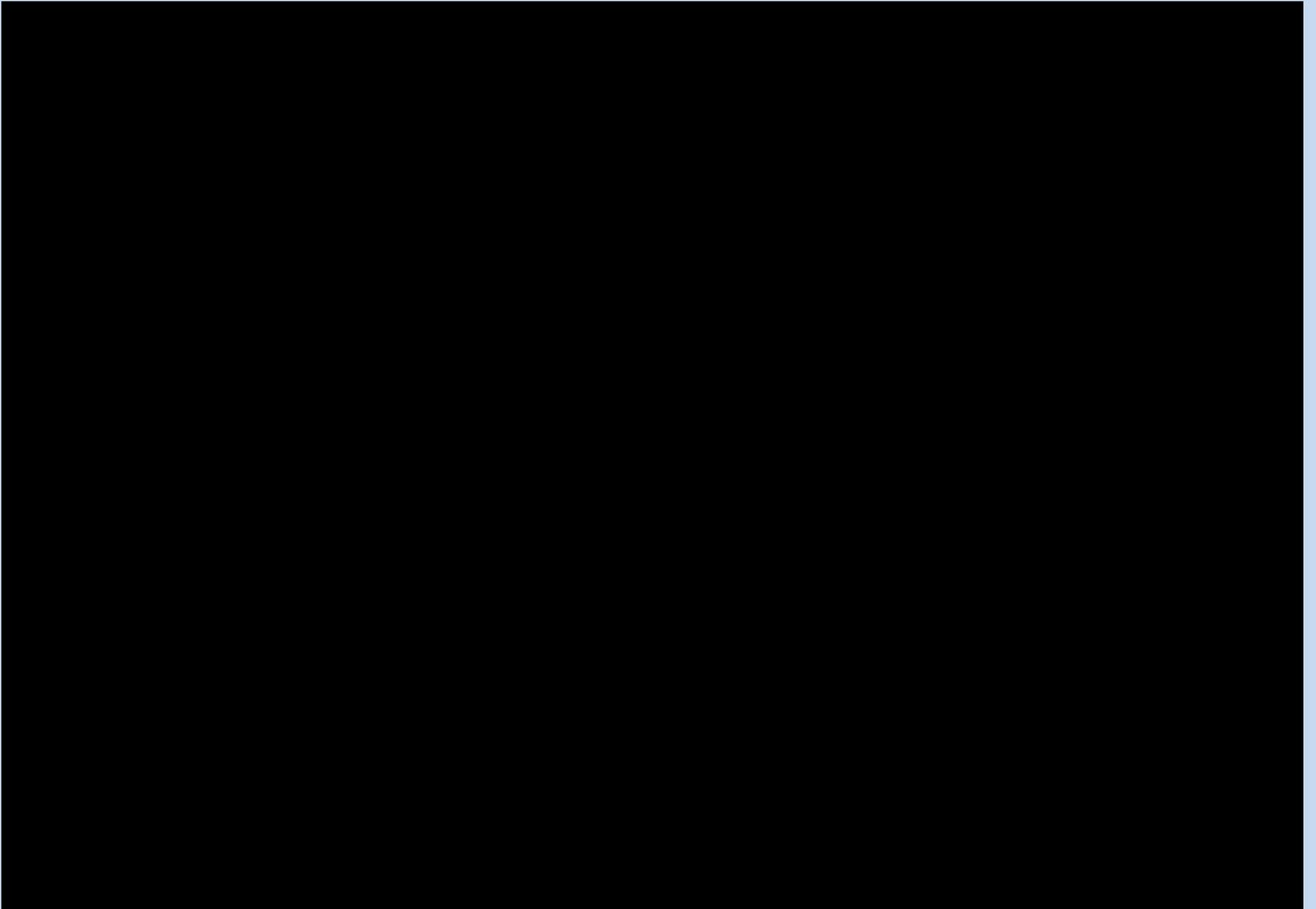
Детекция результатов ПЦР с помощью интеркалирующих красителей



Схема классической ПЦР



Метод ПЦР

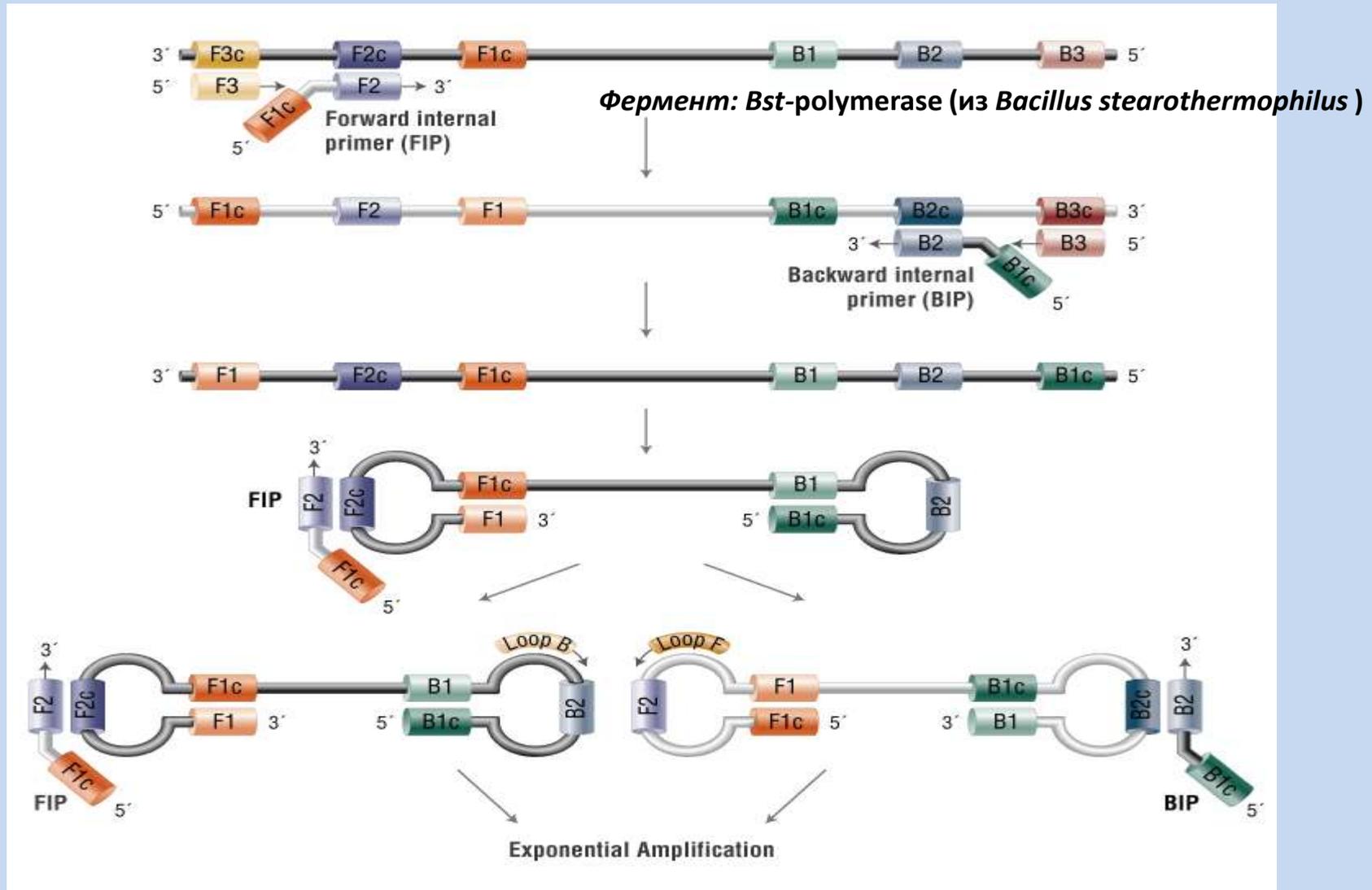


ПЦР и ПЦР в реальном времени

Удобство применения и разработки:

- Высокая чувствительность и избирательность, быстрота проведения реакции
- Возможность анализа пораженных образцов без выделения чистых культур
- Возможность длительного хранения пораженных образцов
- Разработка тест-систем возможна *in silico*, чистые культуры не требуются
- ПЦР-продукт можно выделить из геля, очистить и использовать для дальнейшего анализа, например, секвенирования или клонирования.
- ПЦР-продукт можно использовать в качестве контроля в тест-системах

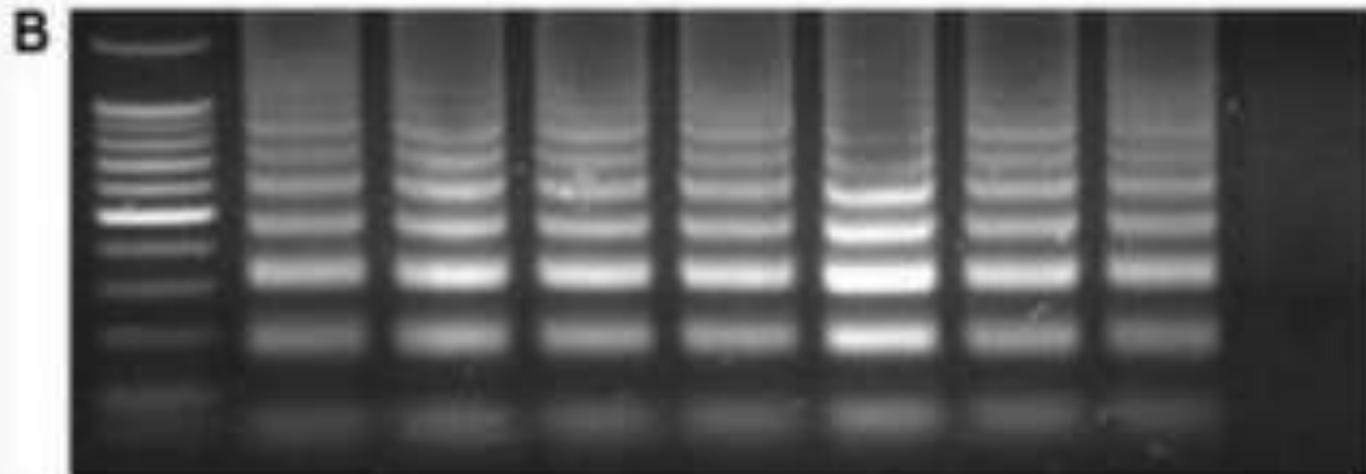
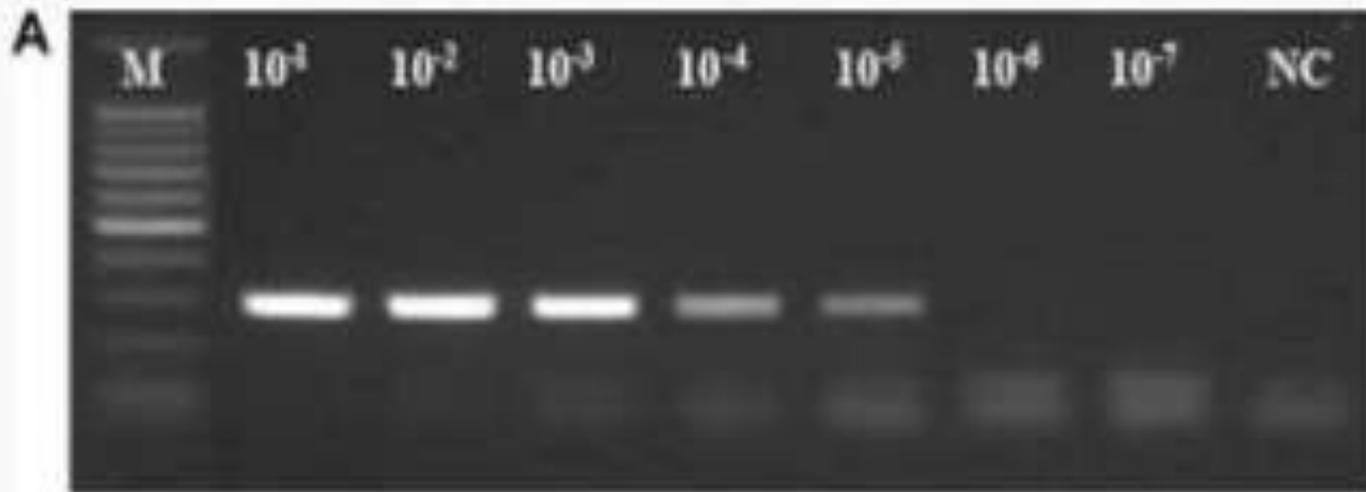
Изотермическая петлевая амплификация



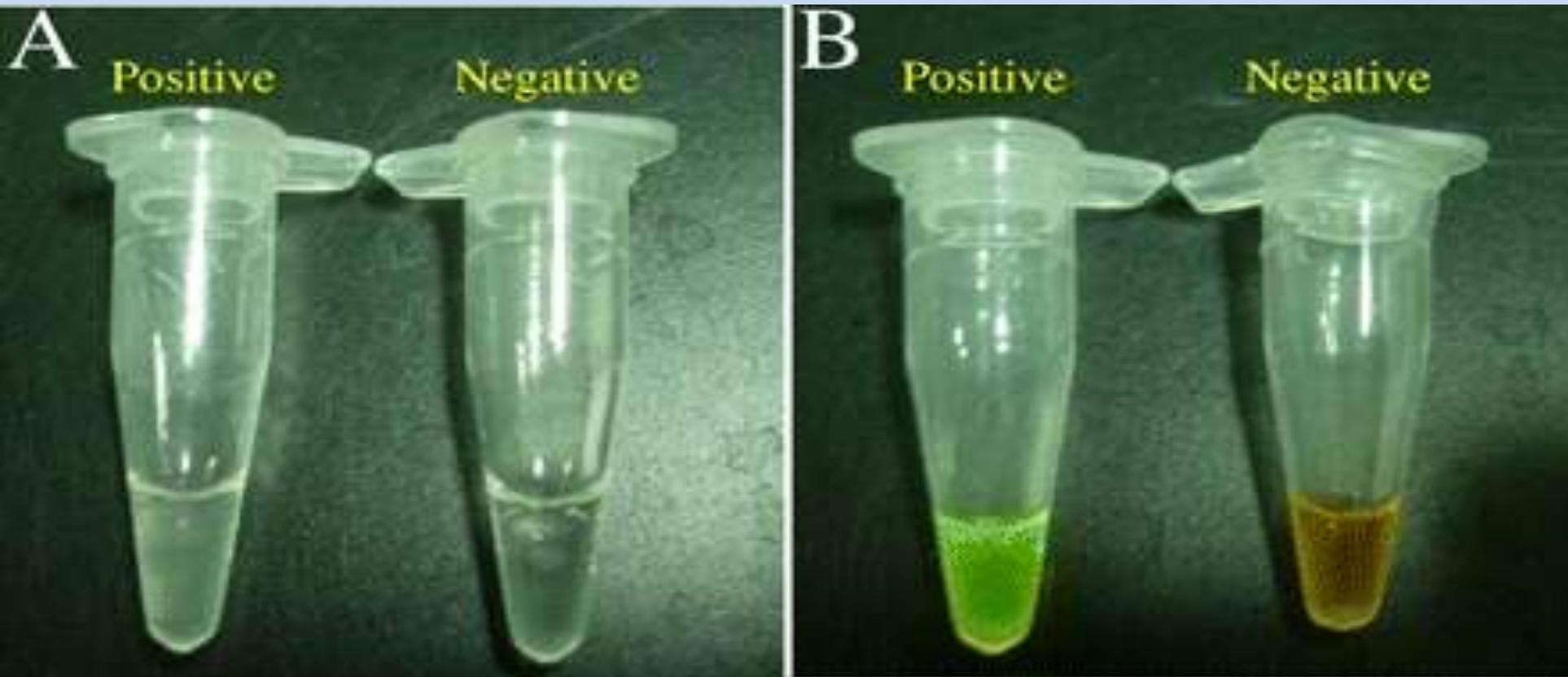
Изотермическая петлевая амплификация



Сравнение ПЦР- и LAMP- продуктов амплификации одной и той же мишени



Результат анализа LAMP можно увидеть невооруженным глазом



Раствор мутнеет за счет выпадения в осадок пирофосфата магния

С добавлением SYBR Green I и подсветкой

Оборудование для ПЦР-РВ и LAMP-РВ



**Детектирующий термостат
Genie III (Optigene) для LAMP**



**Детектирующий амплификатор
BioRad для ПЦР в реальном времени**

Изотермическая петлевая амплификация

- Использование 4-х праймеров обеспечивает высокую чувствительность и избирательность.
- Не требуется термоциклер, только термостат на 60°C. Возможна визуальная идентификация без специального оборудования.
- **Удобна для проведения анализа в полевых условиях**
- Разработка тест-систем возможна *in silico*, чистые культуры не требуются. Тест-системы конструировать сложнее, чем для ПЦР – из-за 4 праймеров.
- LAMP-продукт нельзя использовать в качестве контроля в тест-системах или для дальнейших исследований
- Очень сложное создание мультиплексных тест-систем

Использование тест-систем

Токсинообразующие виды

Другие цели

В поле с целью защиты

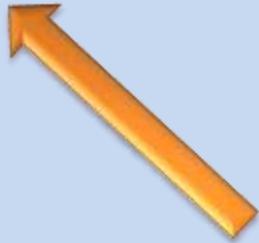
Диагностика

В семеноводстве

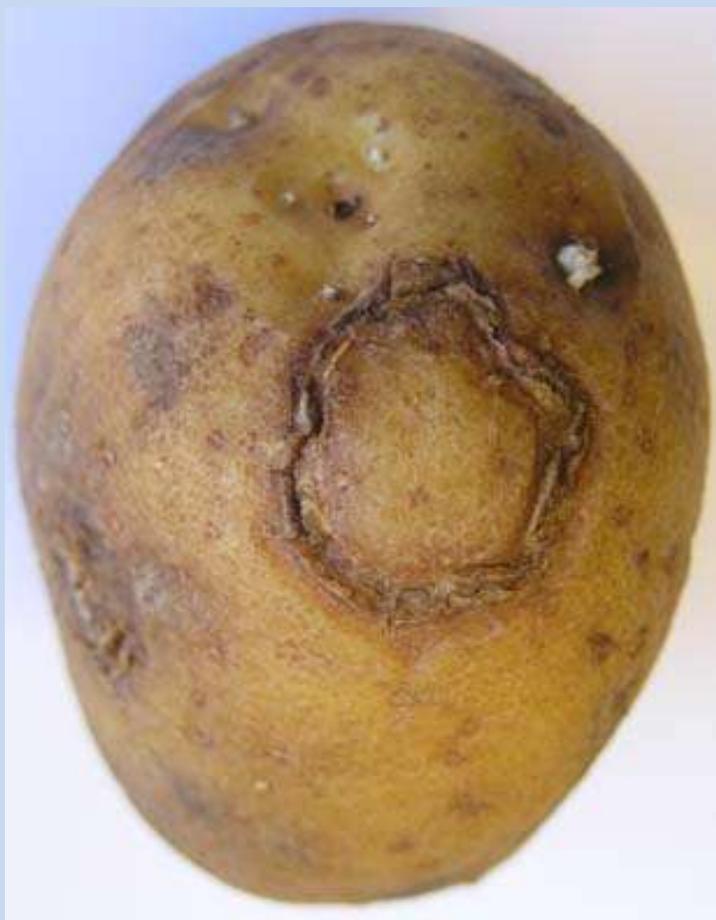
Перед закладкой на хранение

При покупке семенного материала

Карантинные организмы



Некротический штамм вируса Y (PVY)



Бактериальная кольцевая гниль



На начальном этапе заражения симптомы кольцевой гнили не заметны, однако могут вызвать сильное поражение картофеля при хранении

Растения с похожими симптомами в поле

Повреждение гербицидом



Вирус мозаичности люцерны (AMV)



Растения с похожими симптомами в поле

Фузариоз



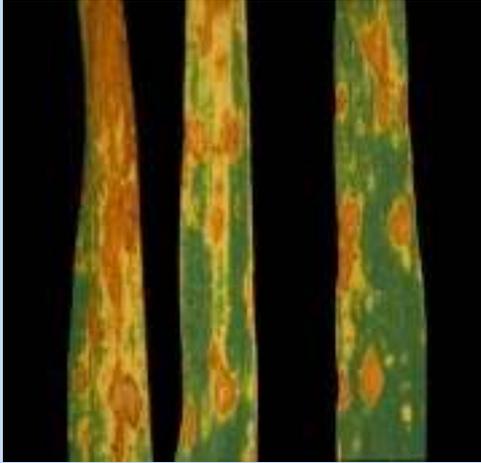
*Ralstonia
solanacearum*



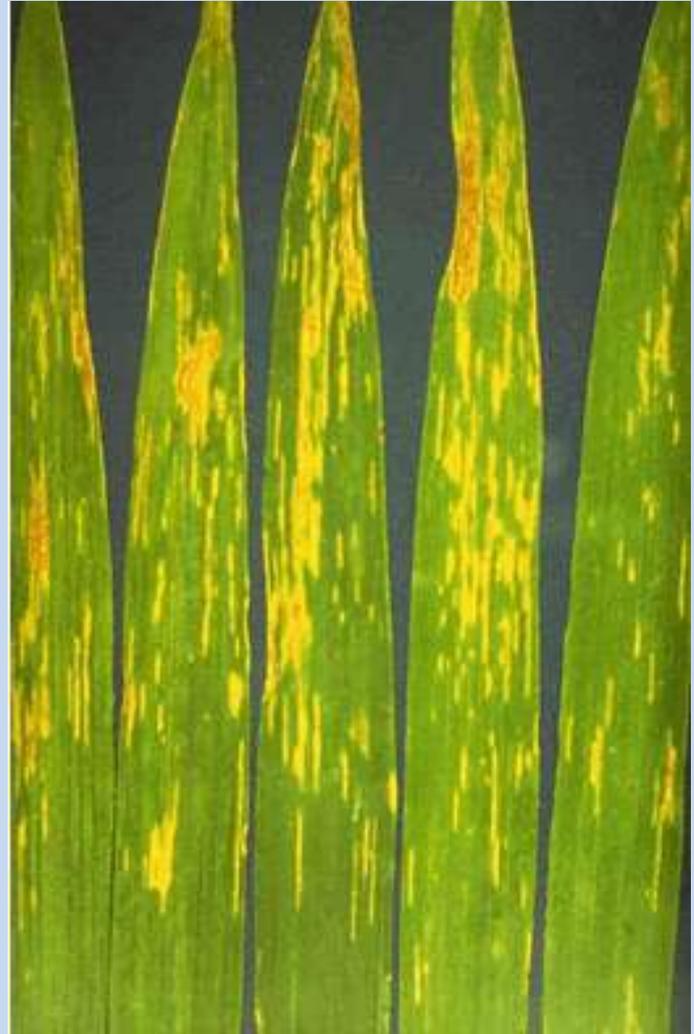
*Вирус скручивания
листьев (PLRV)*

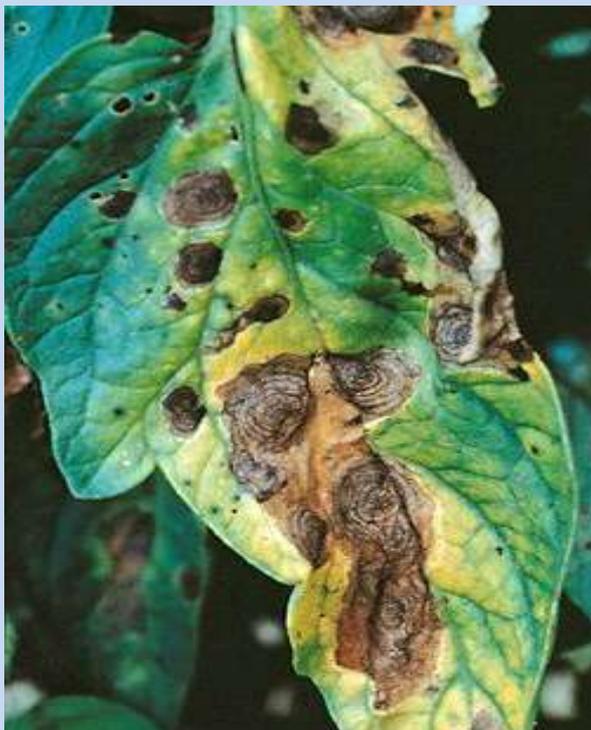


Гельминтоспориоз



Xanthomonas translucens





Альтернариоз
Alternaria sp.



Септориоз
Septoria lycopersici Speg.



Бактериоз
Xantomonas sp.



На томате болезнь с листьев быстро переходит на плоды



Alternaria

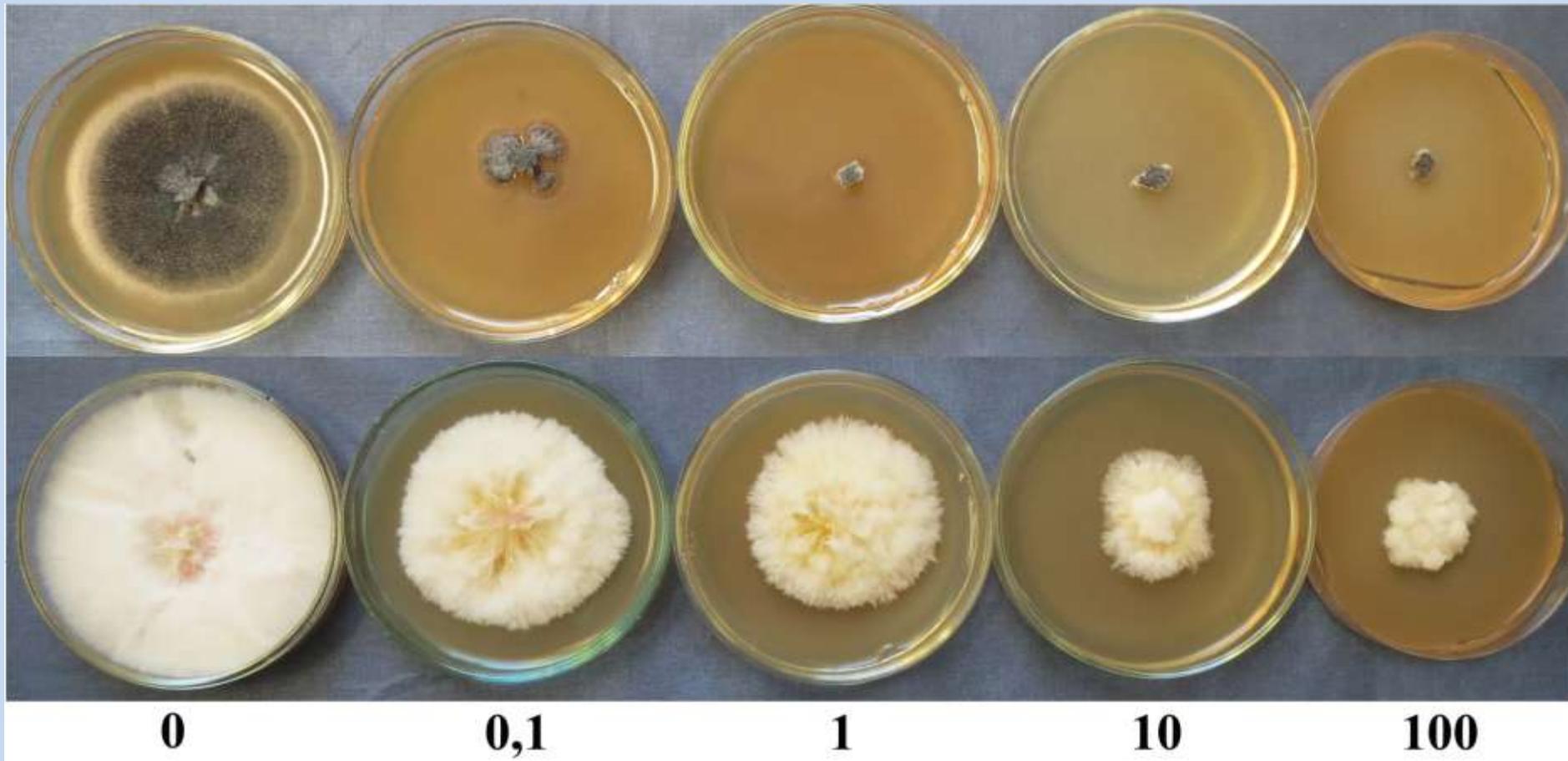
Остановить болезнь на листьях
можно, правильно подобрав
фунгициды

Бактерия Xanthomonas vesicatoria



Фунгициды не действуют!!

Разные виды – разная устойчивость к фунгицидам



Концентрация фунгицида в среде, мг/л

Рост *Colletotrichum coccodes* и *Fusarium solani* на среде с азоксистробином

Разные фунгициды...



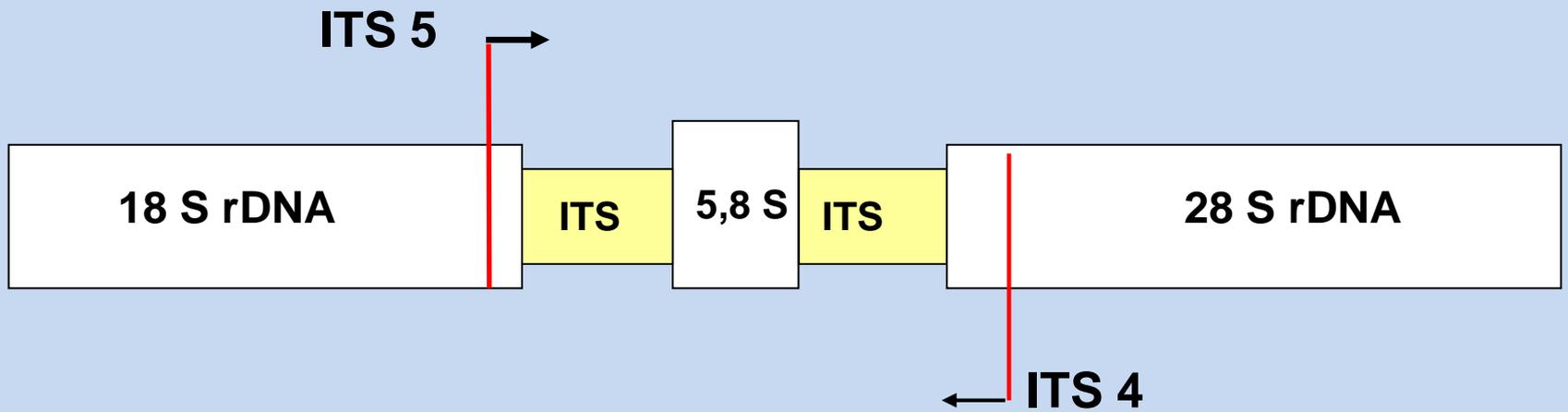
Опыты ВНИИ фитопатологии

Конструирование тест-систем

Тест-системы на основе ПЦР

Гриб	Культура	Участок ДНК	Автор
<i>Septoria tritici</i>	пшеница	B-tubulin	Fraaije et al., 1999
<i>Stagonospora nodorum</i>		ITS	Beck, Ligon, 1995
<i>Rynchosporium secalis</i>	ячмень	ITS	Gubis et al., 2004
<i>Pyrenophora teres</i>		AFLP	
<i>Mycosphaerella melonis</i>	арбуз	ITS	Zhang et al., 2005
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>			
<i>Pirenopeziza brassicae</i>	рапс	ITS	Karolewski et al., 2006
<i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i>	пшеница	ITS	Zhao et al., 2007
<i>Alternaria alternata</i> pathotype <i>apple</i> = <i>A. mali</i>	яблоня	Ген АМ- токсина	Johnson et al., 2000
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	банан	Actine conv., B-tubulin - TaqMan	Arzanlou et al., 2007
<i>M. musicola</i>			
<i>M. eumusae</i>			

Участок ДНК, амплифицируемый праймерами ITS5 – ITS4



Локализация диагностических праймеров, используемых для идентификации *A. solani* (SR) и *A. alternata* (MR)

```

ITS A. alternata - A. solani
Query 1  GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAA 60
          GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAA 61
          ||| ITS 5 ||| →
Sbjct 2  GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTCTCCGTAAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACACAAA 61

Query 61  TATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGT-TACAGCCTTGCTGAATTATT-CACCCTTGT 118
          |||
Sbjct 62  TATGAAGGCGGGCTGGCACCTCCCAGGGGTGGCCAGCCTTGCTGAATTATTCCACCCGTGT 121

Query 119  CTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCACCAC TAGGA-CAA-ACATAAAC 176
          |||
Sbjct 122  CTTTTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCACCACAAGGACCAACCCATAAAC 181

Query 177  C-TTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAAT-TAATAA-TTACAAC TTTCAACAACG 233
          |||
Sbjct 182  CTTTTGCAATGGCAATCAGCGTCAGTAAC-AATGTAATAATTTACAAC TTTCAACAACG 240

Query 234  GATCTCTTGGTTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG 293
          |||
Sbjct 241  GATCTCTTGGTTC TGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTG 300

Query 294  CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGG 353
          |||
Sbjct 301  CAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGG 360

Query 354  GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCC TCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCT 413
          |||
Sbjct 361  GCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCC TCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTTTT 420

Query 414  -TCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAG 472
          |||
Sbjct 421  GTCTCCCTTTGCGGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAG 480
          ||| MR |||

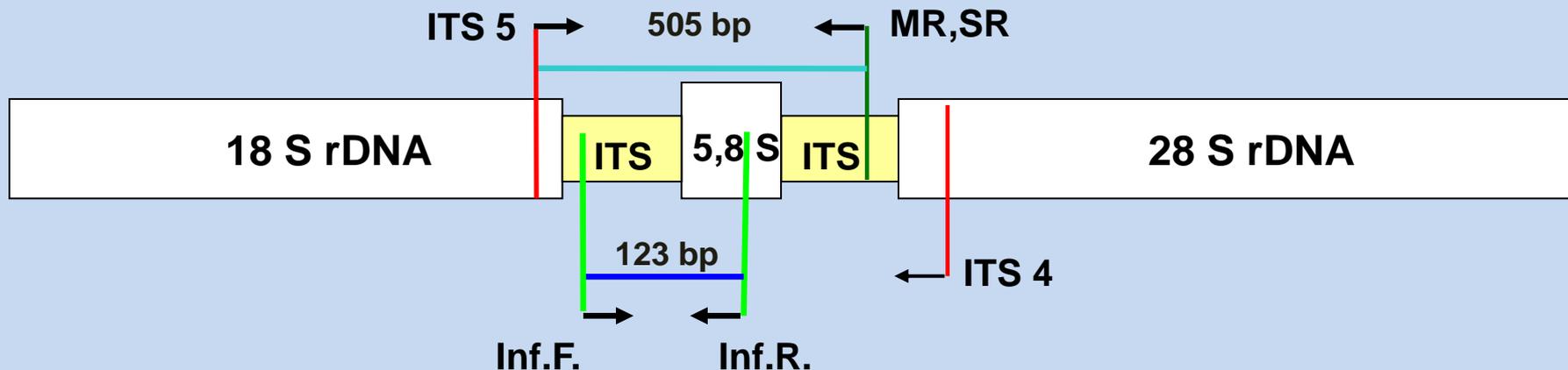
A. alt.  CGCAGCACAAAGTCGCACTCTCTATC-AGCA--AAGGTCTAGCATCCATTAAGCctttttt 529
          ||| ←
A. sol.  CGCAGCACAAAGTCGCGCTCTCT-TCCAGCCCCAAGGTCTAGCATCCACCAAGCCTTTTTT 539
          |||

Query 530  t-CAACTTTTGACCTCGGATCA GATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGC 588
          ||| SR ||| ← ITS 4 |||
Sbjct 540  TTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATCAATAAGC 599
          |||

Query 589  GGAGGAA 595
          |||
Sbjct 600  GGAGGAA 606
          |||

```

Диагностические праймеры для видов рода *Alternaria*



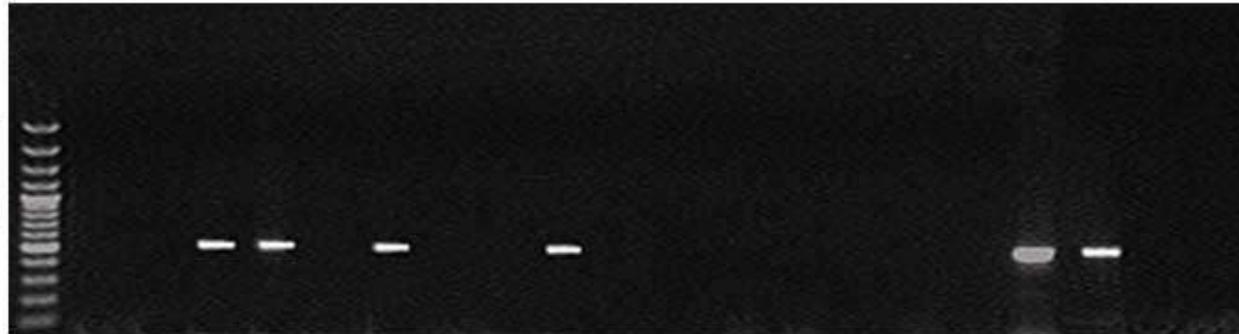
Название праймера	Нуклеотидная последовательность
Прямой праймер (ITS 5)	5' – GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
Обратный для <i>A. alternata</i> (MR)	5' – GACCTTTGCTGATAGAGAGTG-3'
Обратный для <i>A. solani</i> (SR)	5' – CTTGGGGCTGGAAGAGAGCGC-3'
Прямой для <i>A. infectoria</i> (Inf.F.)	5' - GACACCCCCCGCTGGGGCACTGC-3'
Обратный для <i>A. infectoria</i> (Inf.R.)	5' - GGTGGTCCTGAGGGCGGGCGA-3'

Тест-системы для идентификации видов *Alternaria* методом ПЦР в реальном времени

Праймеры		Зонды
A.sol.F	5'-GCCCACCACAAGGACCAACC-3'	(FAM)-TТАCTGACGCTGATTGCCATTGC-(RTQ1)
A.sol.R	5'-ATCGATGCCAGAACCAAGAG-3'	
A.alt.F	5'-TTCGCCCACCACTAGGACAAACA-3'	(FAM)-TТАCTGACGCTGATTGCAATTACA-(RTQ1)
A.alt.R	5'-ATCGATGCCAGAACCAAGAG-3'	
A.inf.F	5'-CACTGCTTCACGGCGTGCG-3'	(FAM)-TGAATAATTCAGCAGGGCCGG-(RTQ1)
A.inf.R	5'-GTTTGTGGTTGGTCCTGAGG-3'	

Идентификация видового состава возбудителей альтернариоза картофеля и томата

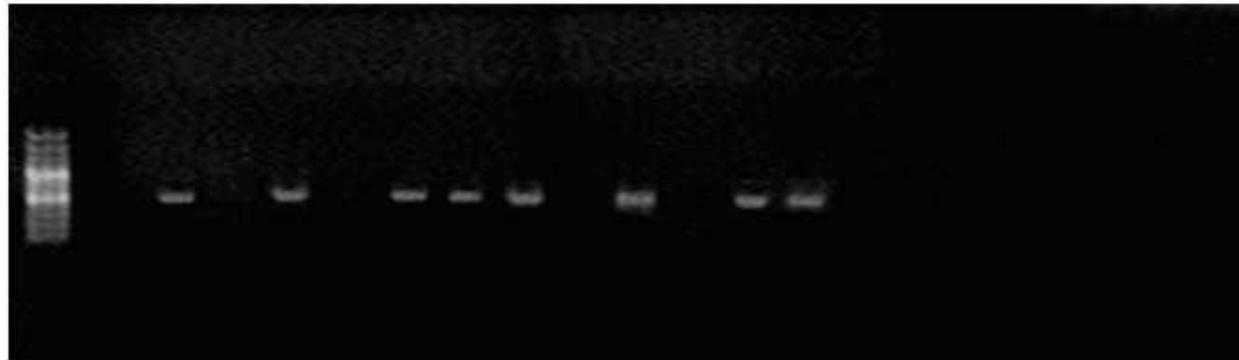
ITS5-MR



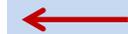
505 по



ITS5-SR



516 по



Inf.pr-inf.obr



123 по



Места сбора образцов листьев с некрозами



Всего в коллекции 31 проба, 504 образца пораженных листьев

Определение видового состава *Alternaria* в фиксированных на поле пораженных листьях **томата** с помощью ПЦР-диагностики

Регион России, место сбора	N	Число образцов в которых обнаружена					
		<i>A. sol.</i>	<i>A. alt.</i>	<i>A. inf.</i>	<i>A.s.+ A.inf.</i>	<i>A. s. + A.alt.</i>	<i>A.alt. + A.inf.</i>
Московская область, д. Волково	20	6	8	0	0	6	0
Татарстан, Казань	10	2	6	0	0	1	0
Ростовская обл.	13	0	7	1	0	0	0
Краснодарский край, Туапсинский р-н	20	7	4	2	0	1	0
Краснодарский край, Анапский р-н	22	8	5	2	0	2	0
Ростовская обл., Армавирский р-н	13	0	6	2	1	0	1
Ставропольский край, КВНС	17	6	0	0	0	0	0
Всего	115	29	36	7	1	10	1

N- число исследованных образцов (простых листьев)

Определение видового состава *Alternaria* в фиксированных пораженных листьях картофеля с помощью ПЦР-диагностики

Регион России, место сбора	N	Число образцов в которых обнаружена					
		<i>A. sol.</i>	<i>A. alt.</i>	<i>A. inf.</i>	<i>A.s.+ A.inf.</i>	<i>A. s. + A.alt.</i>	<i>A.alt. + A.inf.</i>
Московская обл., п. Коренево	25	9	8	2	1	3	0
Московская обл., п. Раменки	67	21	17	5	2	9	1
Костромская обл., с. Нежитинское	15	0	11	1	1	1	1
Костромская обл., с. Минское	42	3	17	4	2	2	4
Рязанская обл., с. Ардабьево	12	3	6	0	0	0	0
респ. Татарстан, Казанский р-н	78	10	25	2	0	3	0
респ. Северная Осетия, с. Михайловское	8	0	1	0	0	5	2
Воронежская обл., Панинский р-н	28	8	12	1	2	3	2
Ставропольский кр, КВНС	23	2	14	0	0	1	0
Краснодарский край, Анапский район, ст. Благовещенская	8	0	4	2	0	0	2
Всего	306	56	115	17	8	27	12

***Изучение
микобиоты
пораженных
листьев***

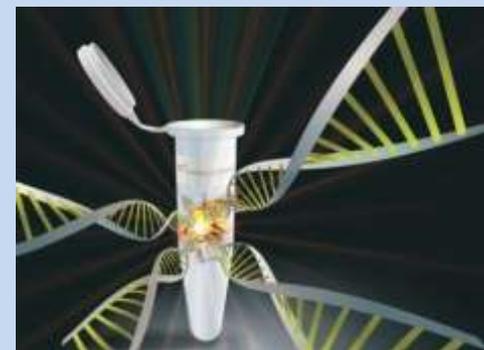
Анализ микобиоты пораженных образцов



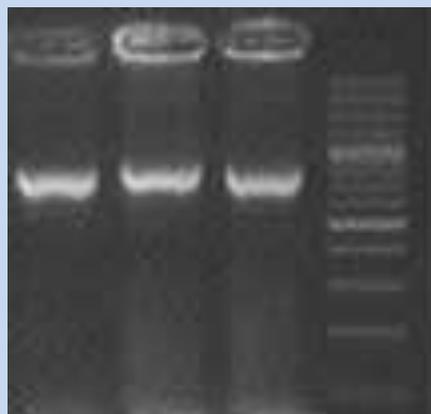
Полевой образец

Fix in 70%
 C_2H_5OH
или СТАВ

Отмывка в
стерильной
дистилл.
воде



Выделение тотальной ДНК

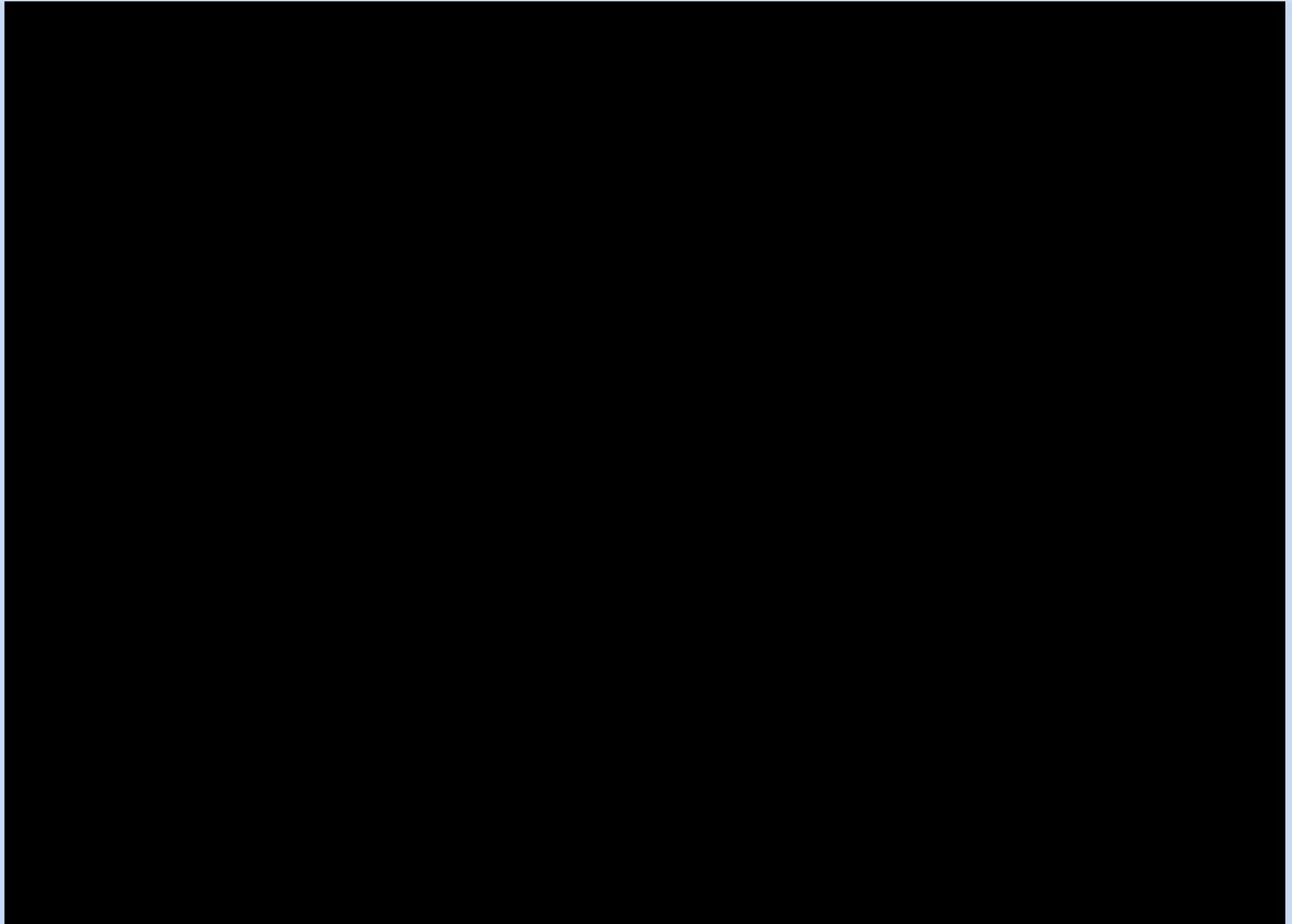


Клонирование
в *E. coli*

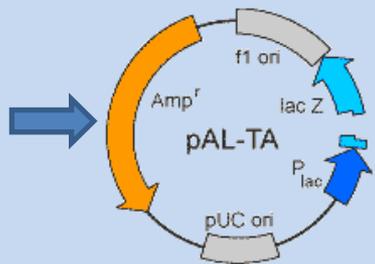
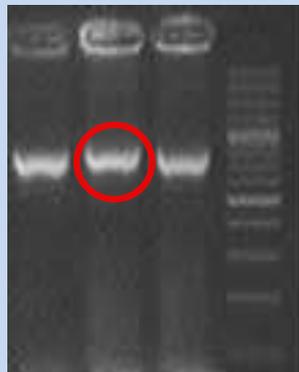


ПЦР с праймерами
ITS 1f – ITS 4

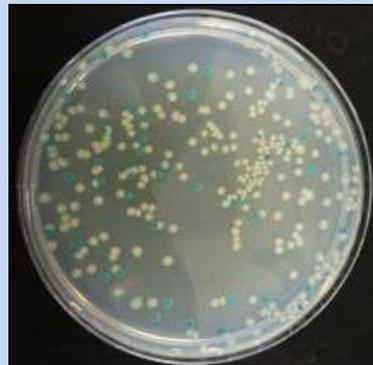
Клонирование последовательности ДНК в *E. coli*



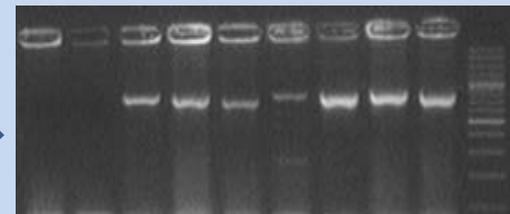
Анализ микобиоты пораженных образцов



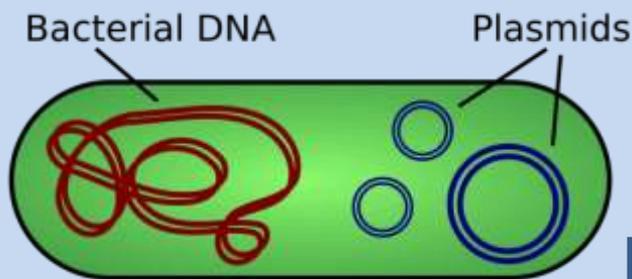
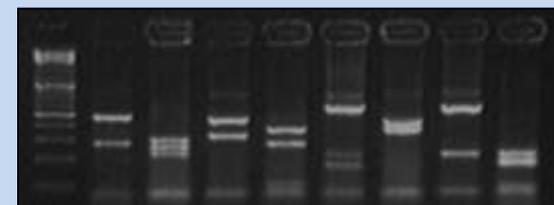
Бело-голубая
селекция



ПЦР с праймерами
ITS 1f – ITS 4

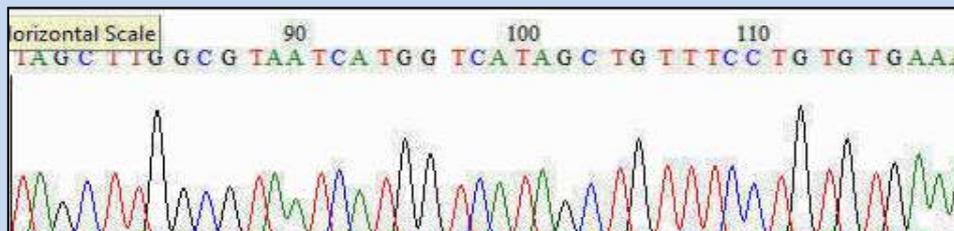


Рестрикционный
анализ (MspI)



Plasmid's DNA
extraction

Sequencing



Наращивание
выбранных клонов



Образец (листовая пластинка)	Результаты клонирования
<p>№ 241, респ. Северная-Осетия, картофель, сбор 2014</p>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
	<i>Rhodotorula ingeniosa</i>
	<i>Sporobolomyces</i> sp.
	<i>Cladosporium cladosporoides</i>
	<i>Cladosporium tenuissimum</i>
	<i>Cryptococcus</i> sp.
	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>
	<i>Hannaella oryzae</i>
<p>№ 4, Ростовская область, томат, сорт Линда, сбор 2014</p>	<i>Dioszegia hungarica</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Neocamarosporium goegapense</i>
	<i>Alternaria alternata</i>
	<i>Rhizoctonia solani</i>
	<i>Candida albicans</i>
<p>№ 249, Москва, паслен сладко-горький, сбор 2015</p>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
	<i>Cladosporium herbarum</i>
	<i>Thielavia basicola</i>
	<i>Colletotrichum acutatum</i>
	<i>Mycosphaerella</i> sp.
	<i>Phoma herbarum</i>
	<i>Alternaria alternata</i>
	Pezizomycotina

Исходный образец (листовая пластинка)		кол-во клонов	кол-во видов
картофель	№ 42, Ставропольский край, Шатжатмас, 2014	13	3
	№ 45, Ставропольский край, —//—	10	4
	№ 52, Ставропольский край, —//—	10	8
	№ 226, респ. Северная-Осетия, 2014	12	3
	№ 240, респ. Северная-Осетия, 2014	12	8
	№ 241, респ. Северная-Осетия, 2014	12	9
	№ 2, Московская область, 2012 г.	10	3
	№ 3, Московская область, 2012 г.	5	1
	№ 4, Московская область, 2012 г.	10	3
	№ 200, Воронежская обл., Панинский р-н, 2014	9	3
	№ 201, —//—	9	3
	№ 202, —//—	7	5
томат	№ 4, Ростовская область, томат, сорт Линда, 2014	12	7
	№ 82, Ставропольский край, Шатжатмас, 2014	11	4
	№76, —//—	10	10
	№100, Краснодарский кр. Славянск-на-Кубани	10	10
	№110, Ставропольский кр., Темрюкский р-н	8	2
	№12, Ростовская область, томат, сорт Линда, 2014	15	5
	№208, Воронежская обл., Панинск. р-н, 2014	10	2
паслен	№ 243, Москва	11	6
	№ 244, Москва	8	5
	№ 246, Москва	10	6
	№ 249, Москва	10	8

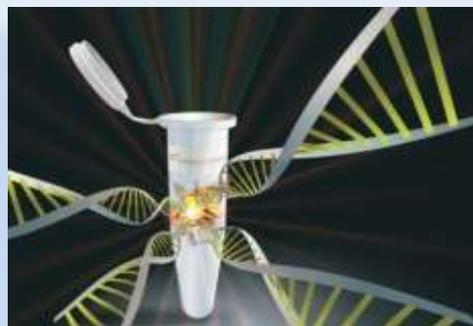
Выявленные виды

<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Solanum dulcamara</i>
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Alternaria alternata</i>
<i>Alternaria solani</i>	<i>Alternaria infectoria</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
<i>Alternaria infectoria</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Cladosporium herbarum</i>
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	<i>Didymella lycopersici</i>	<i>C.cladosporioides</i>
<i>Cladosporium herbarum</i>	<i>Neocamarosporium goegapense</i>	<i>C. tenuissimum</i>
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	<i>Passalora fulva</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>
<i>Colletotrichum coccodes</i>	<i>Peyronellaea glomerata</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Podosphaera fusca</i>	<i>Mycosphaerella sp</i>
<i>Epicoccum nigrum</i> *	<i>Septoria lycopersici</i>	неидент. Pezizomycotina (1)
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Thanatephorus cucumeris</i>	неидент. Pezizomycotina (2)
<i>Mycosphaerella sp.</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Phialophora sp.</i>
<i>Phoma sp.</i>	<i>Cryptococcus tephrensis</i>	<i>Phoma herbarum</i>
<i>Phytophthora infestans</i>	<i>Dioszegia hungarica</i>	<i>Phoma sp.</i>
<i>Tolypocladium inflatum</i>		<i>Phytophthora infestans</i>
		<i>Thielavia basicola</i>

* - голубым выделены виды, ранее не отмеченные в России на листьях изучаемых растений

Учитывались только виды с уровнем гомологии не менее 97%

Не искать возбудителя, а анализировать пораженный орган



**Весь анализ
занимает
несколько часов**



По итогам анализа – рекомендации по подбору и применению фунгицидов



***СПАСИБО ЗА
ВНИМАНИЕ!***