

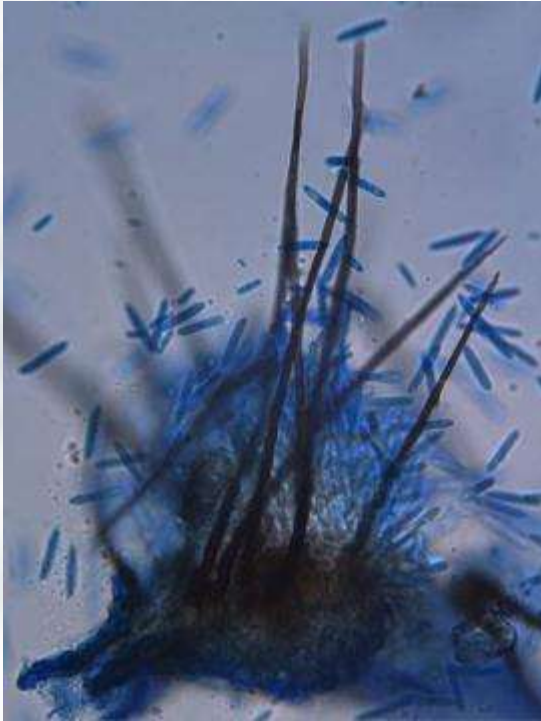
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Биологический факультет

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ
ФИТОПАТОГЕННЫХ ВИДОВ РОДА
COLLETOTRICHUM В ПОРАЖЕННЫХ
ОРГАНАХ КАРТОФЕЛЯ И ТОМАТА

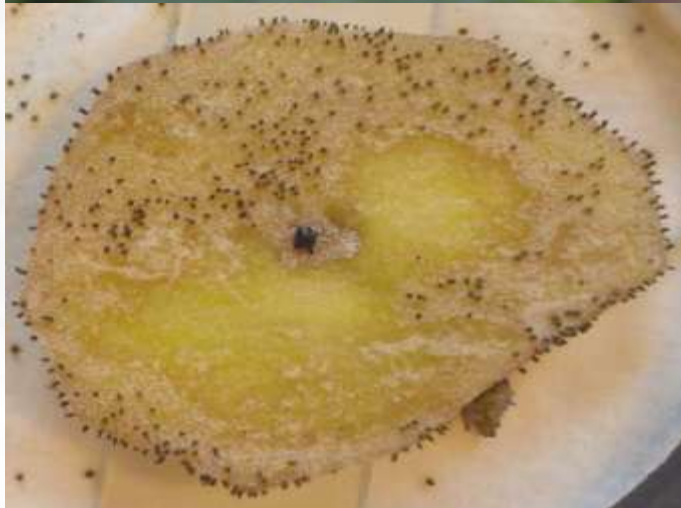
Выпускная квалификационная работа магистра
Студента 2 курса магистратуры
Белосохова А.Ф.

Научные руководители:
д.б.н., в.н.с. С.Н. Еланский
к.б.н., н.с. Л.Ю. Кокаева

Введение



Фитопатогенные грибы рода *Colletotrichum* вызывают антракноз и черную пятнистость на картофеле и томате.



Развитие антракноза считается основной причиной снижения урожая технического томата (Зейрук, 2009). Потери урожая картофеля от вызываемых *Colletotricum coccodes* антракноза и черной пятнистости картофеля могут достигать 30%

Цель и задачи

Целью работы было изучение распространенности видов рода *Colletotrichum* на листьях картофеля и томата, собранных в разных регионах России, с помощью ПЦР-диагностики без выделения чистых культур.

Задачи:

- Апробация зарубежных тест-систем для идентификации *C. acutatum* на российских изолятах:
 - проверка специфичности в ПЦР с коллекционными изолятами различных фитопатогенных грибов, при разных концентрациях целевой ДНК, в пораженной ткани растения.
- Выявление *C. coccodes* и *C. acutatum* в зараженной ткани фиксированных образцов растений томата и картофеля из разных регионов без выделения чистых культур.

Места сбора образцов



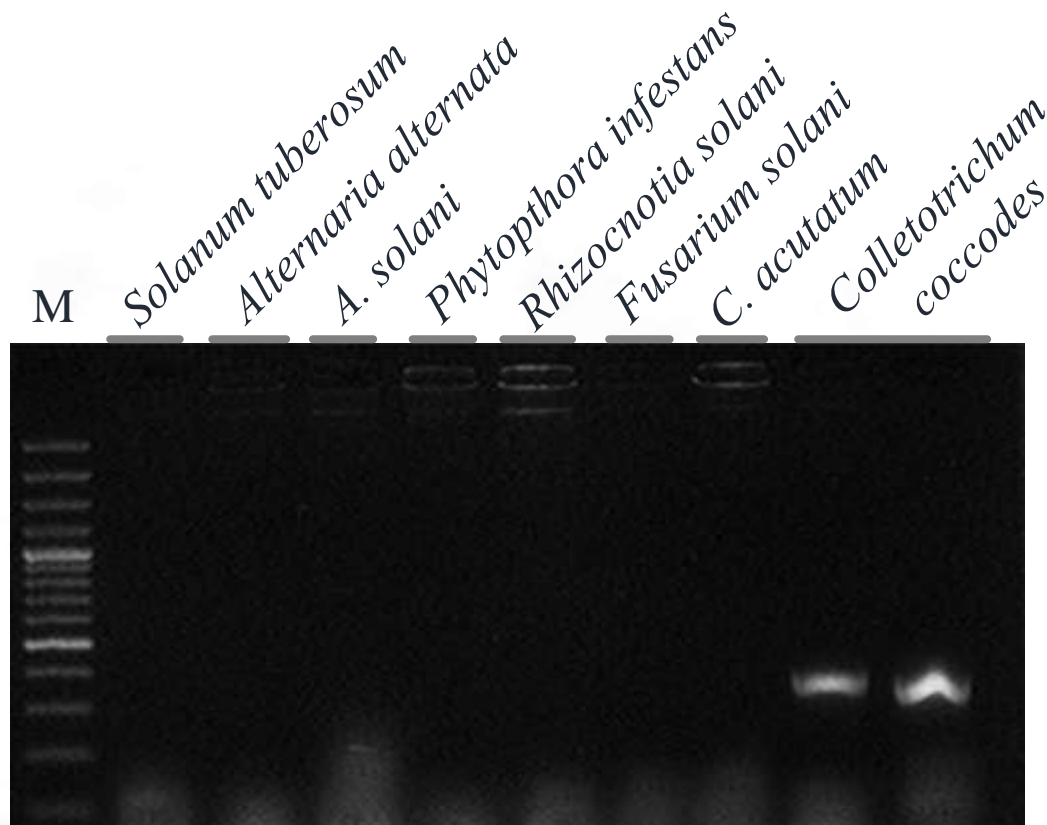
№	Регион	Кол-во образцов
T1-T4	Тамбовская обл.	25
T5	Костромская обл.	9
T6	Ростовская обл.	13
T7-T9	Краснодарский край	58
P1,P2	Московская обл.	42
P3	Тамбовская обл.	2
P4	Новгородская обл.	16
P5	республика Карелия	18
P6	Вологодская обл.	14
P7-P10	Костромская обл.	70
P11	Рязанская обл.	8
P12	респ. Северная Осетия - Алания	10
P13	респ. Марий Эл	12

Всего в работе проверено **297 образцов**: **192** образца пораженной ткани картофеля и **105** образцов томата из 22 мест сбора в 13 регионах

Праймеры, использованные в работе

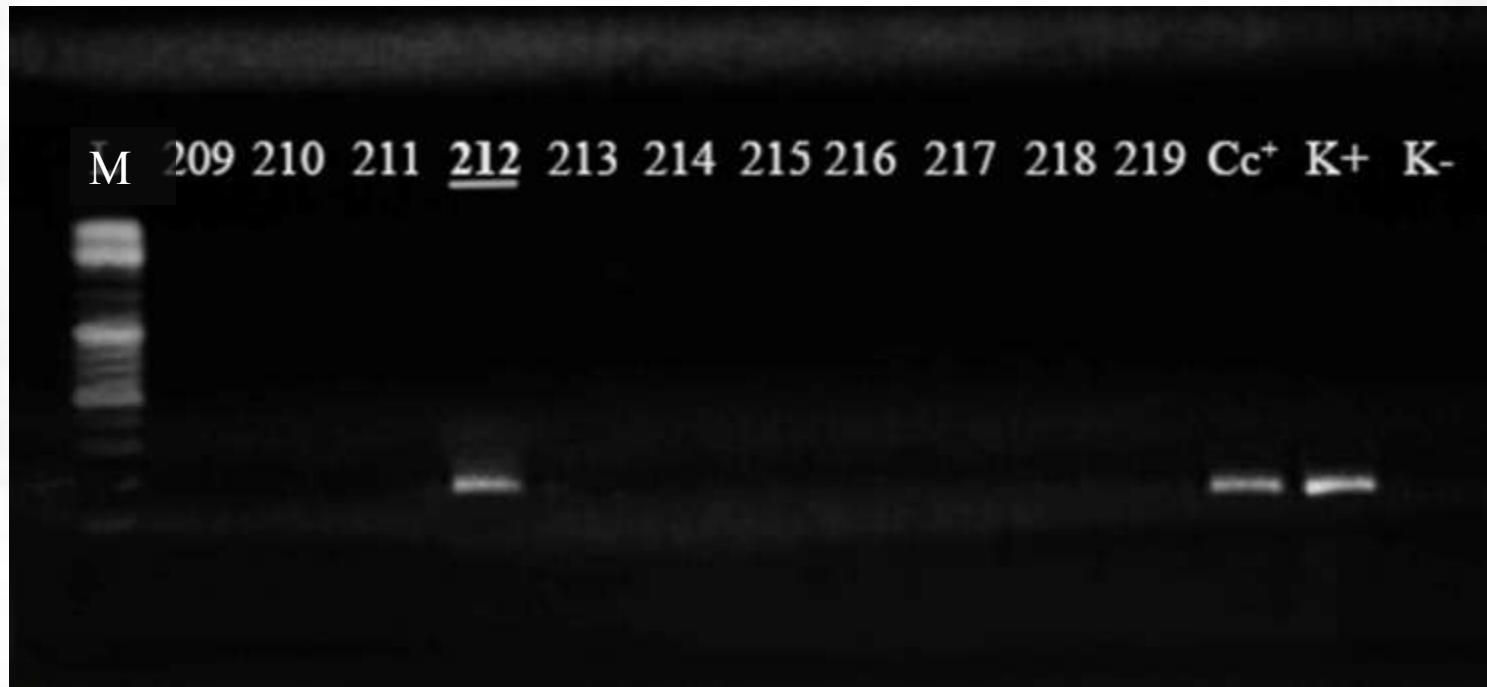
Название	Последовательность ДНК	Источник	Температура отжига, °С
Праймеры для избирательной амплификации грибной ДНК (ITS)			
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	White et al., 1990	54
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'		
ITS1F	5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	Gardes, Bruns, 1993	
Праймеры для избирательной амплификации <i>C. coccodes</i>			
Cc1NF1	5'-TGCCGCCTGCGGACCCCCCT-3'	Cullen et al., 2002	66
Cc2NR1	5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA-3'		
Праймеры для избирательной амплификации <i>C. acutatum</i>			
CaInt2	5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'	Sreenivasaprasad et al. 1996	55
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	White et al., 1990	

Проверка специфичности тест-систем для идентификации *Colletotrichum coccodes*



Электрофореграмма контрольных амплификаций с праймерами Cc1NF1/Cc2NR1 на ДНК *C. coccodes*, коллекционных изолятов различных патогенных грибов и картофеля.

Идентификация *Colletotrichum coccodes*



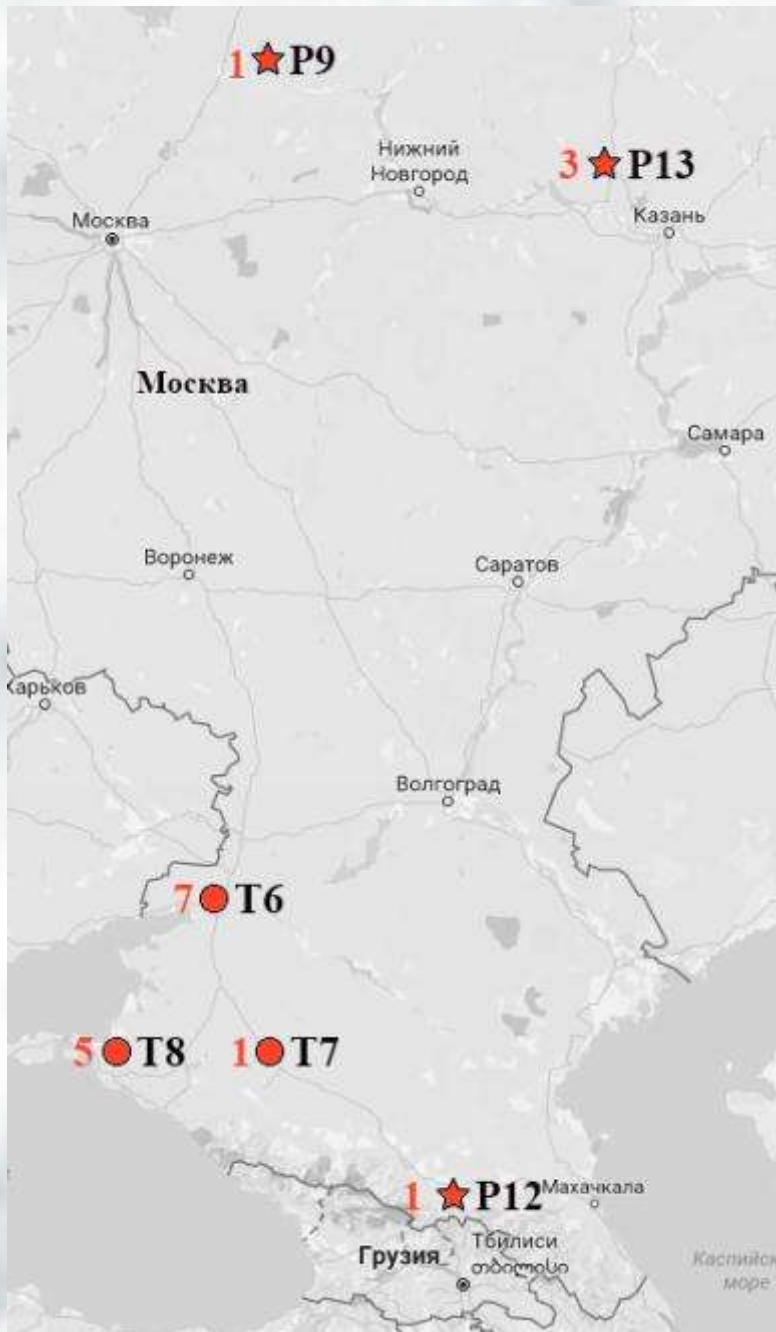
Амплификация ДНК образцов пораженных листьев *S. tuberosum*
Проба Р10 (Костромская обл. Костромской р-н., с. Стрельниково) с
праймерами Cc1NF1/Cc2NR1

Идентификация *S. coccoodes* в растениях томата

№	Место сбора	Число проверенных образцов	Число образцов с ДНК <i>S. coccoodes</i>
T1-T4	Тамбовская обл.	25	0
T5	Костромская обл.	9	0
T6	Ростовская обл.	13	7
T7	Краснодарский край	25	1
T8	Краснодарский край	18	5
T9	Краснодарский край	15	0
Всего томат		105	13

Идентификация *S. coccoodes* в растениях картофеля

№	Место сбора	Число проверенных образцов	Число образцов с ДНК <i>S. coccoodes</i>
P1,P2	Московская обл.	42	0
P3	Тамбовская обл,	2	0
P4	Новгородская обл.	16	0
P5	респ. Карелия	19	0
P6	Вологодская обл	14	0
P7-P9	Костромская обл.	54	0
P10	Костромская обл.	15	1
P11	Рязанская обл.	8	0
P12	респ. Северная Осетия – Алания	10	1
P13	респ. Марий Эл.	12	3
Всего картофель		192	5

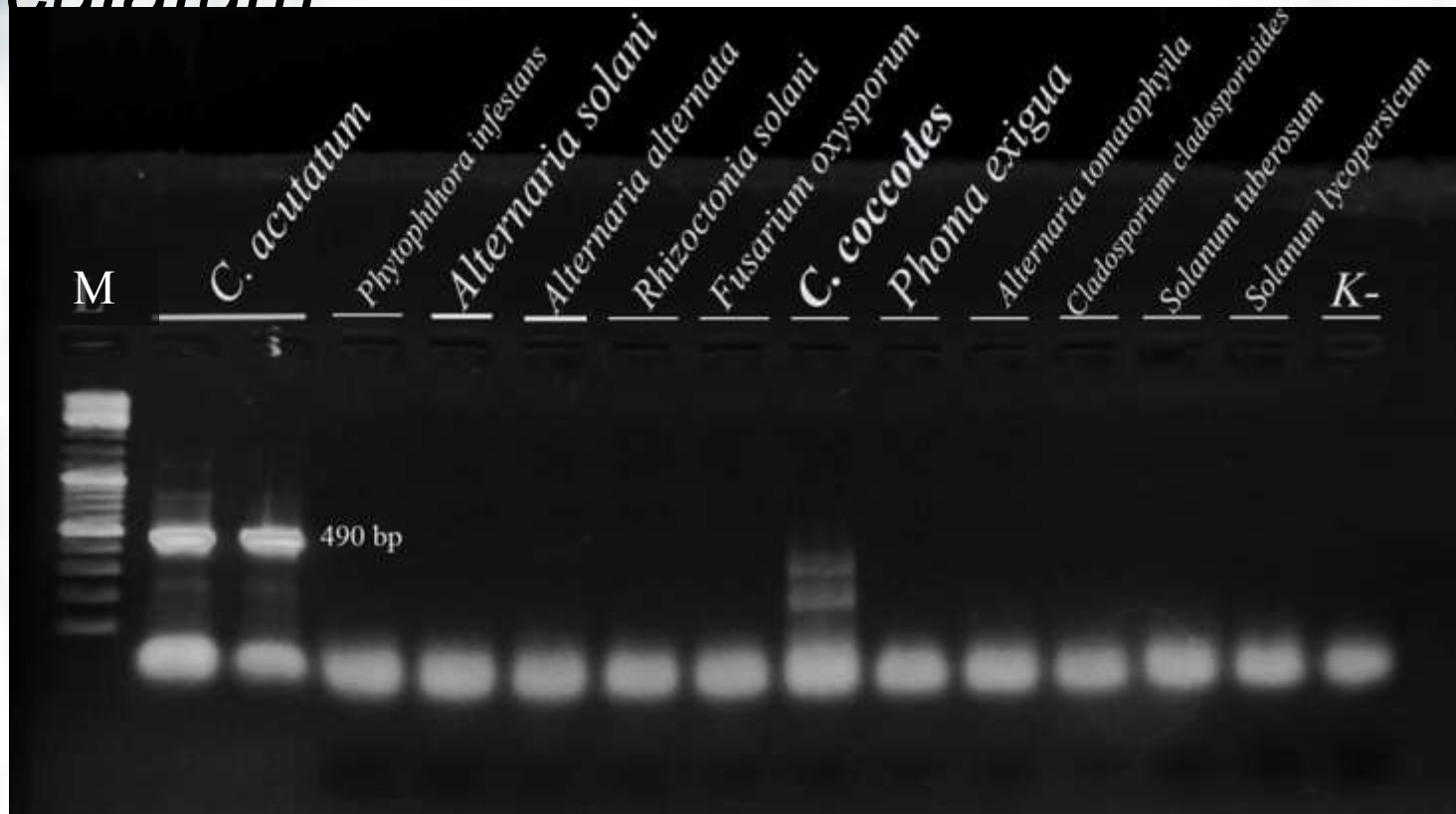


Карта с отмеченными местами сбора, в которых был обнаружен *C. coccodes*

- - В образцах томата,
- ★ - В образцах картофеля

Числа (выделены цветом) показывают количество образцов в пробе, положительных в тесте с Cc1NF1/Cc2NR1

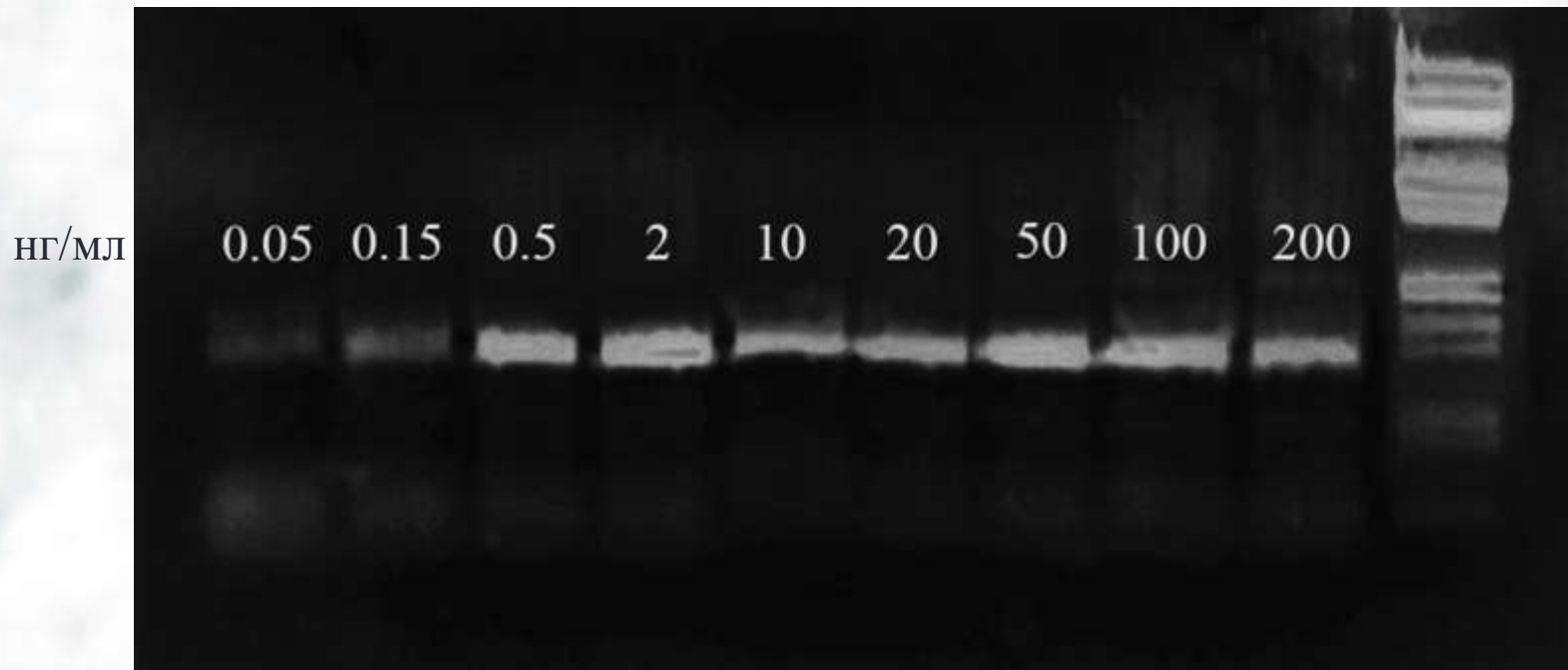
Проверка специфичности тест-систем для идентификации *Colletotrichum acutatum*



Электрофореграмма контрольных амплификаций с праймерами CaInt2/ITS4

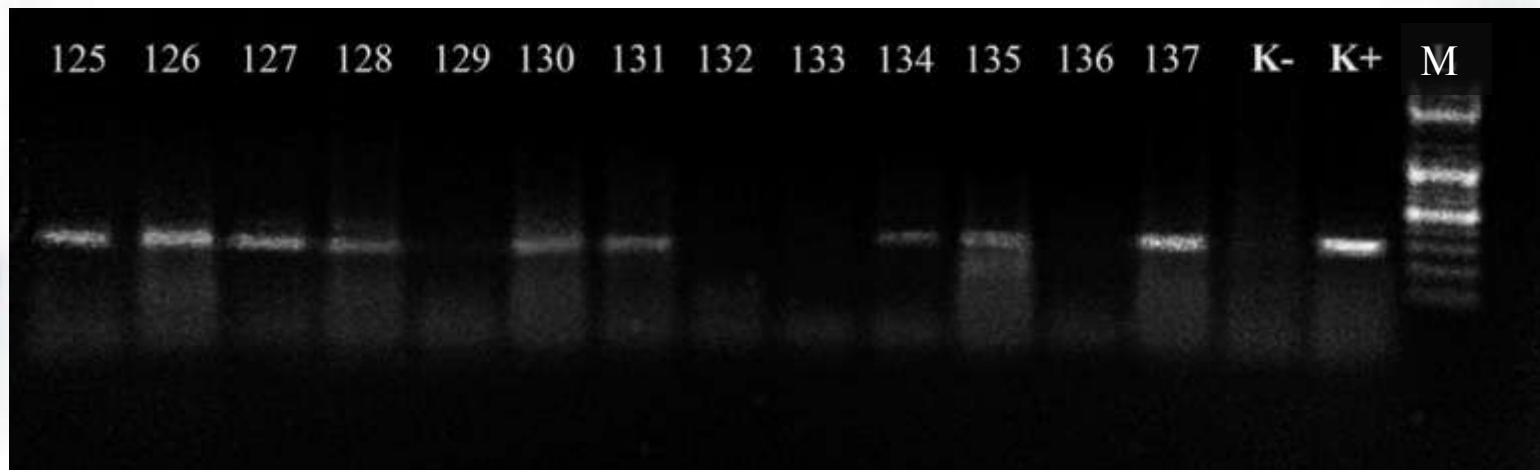
Анализ специфичности *in silico* не выявил неспецифической гибридизации с другими патогенами картофеля и томата.

Проверка чувствительности тест-систем для идентификации *Colletotrichum acutatum*



Амплификация ДНК *C. acutatum* в разных концентрациях с праймерами CaInt2/ITS4.

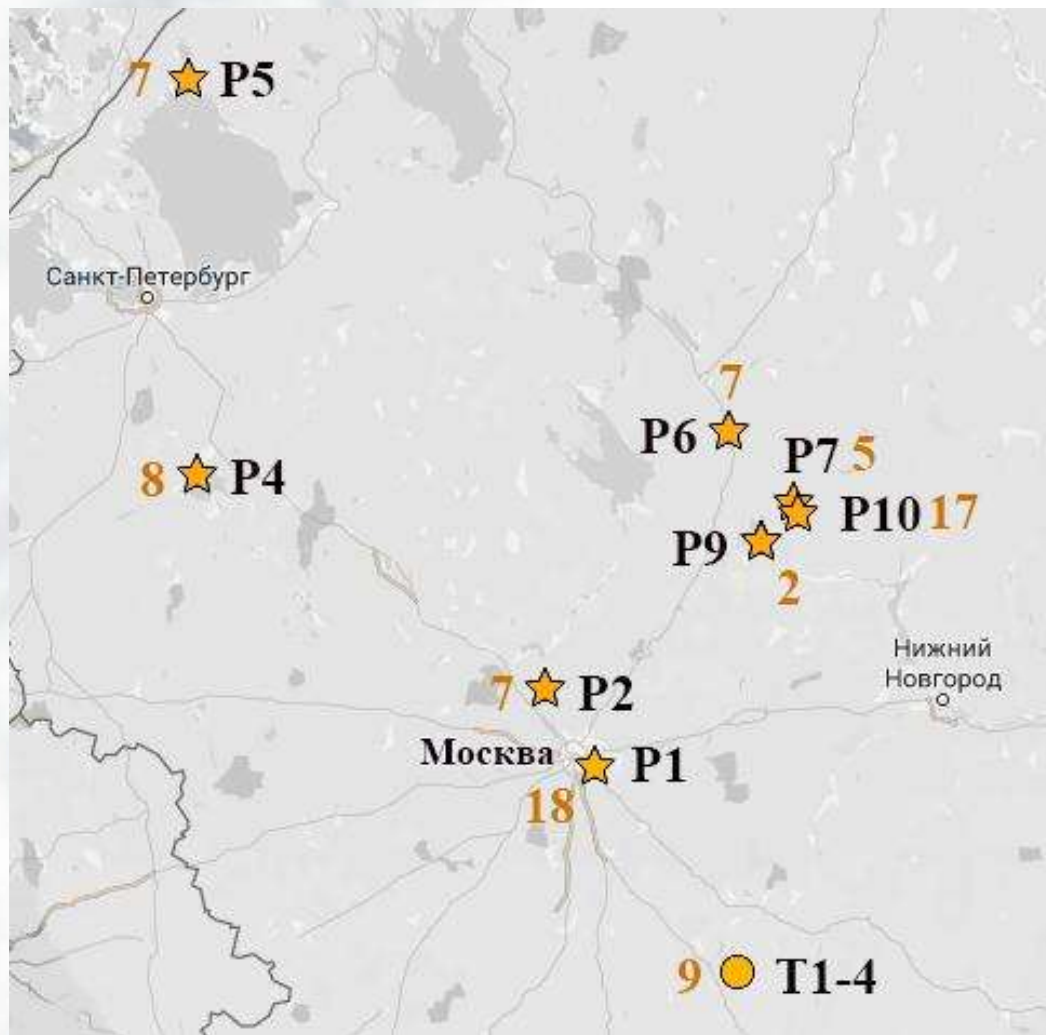
Идентификация *Colletotrichum acutatum*



Амплификация ДНК образцов пораженных листьев *S. tuberosum*
Проба Р5 (респ. Карелия, Питкярантский р-н пос. Ляскеля) с
праймерами CaInt2/ITS4

Идентификация *Colletotrichum acutatum*

№	Место сбора	Число проверенных образцов	Число образцов с ДНК <i>S. acutatum</i>
Томат крупноплодный			
T1-T4	Тамбовская обл.	25	9
T5	Костромская обл.	9	0
Всего томат		34	9
Картофель			
P1, P2	Московская обл.	42	25
P3	Тамбовская обл.	2	0
P4	Новгородская обл.	16	8
P5	респ. Карелия	19	7
P6	Волгоградская обл.	14	7
P7, P9, P10	Костромская обл.	61	24
P8	Костромская обл.	9	0
P11	Рязанская обл.	8	0
Всего картофель		170	71



Карта с
отмеченными
местами сбора, в
которых был
обнаружен *S.
acutatum*

○ - В образцах томата,
★ - В образцах картофеля

Числа (выделены цветом)
показывают количество
образцов, содержащих
ДНК *S. acutatum*

Выводы

- *S. coccodes* был выявлен в 13 образцах томата из Ростовской области и Краснодарского края, и в 5 образцах картофеля из Костромской области, респ. Северная Осетия-Алания и респ. Марий Эл.
- *S. acutatum* был идентифицирован в 9 образцах томата и 71 образце картофеля, собранных в Московской, Тамбовской, Новгородской, Волгоградской, Костромской областях и респ. Карелия.
- Чувствительность тест-системы для идентификации *S. acutatum* позволяет выявлять целевую ДНК при концентрации от 0.05 нг/мл. Проверка специфичности показала, что тест-система не дает перекрестной амплификации с исследованными ДНК других грибов, картофеля и томата. С ДНК близкородственного *S. coccodes* тест-система может давать неспецифический отжиг, отличающийся по длине фрагментов. Анализ специфичности *in silico* не выявил неспецифической гибридизации с другими патогенами картофеля и томата.



Спасибо за внимание!

Результаты идентификации *C. acutatum* и *C. coccodes*

○ - В образцах томата,
★ - В образцах картофеля

● - Присутствуют образцы,
положительные на *C. coccodes*

● - Присутствуют образцы,
положительные на *C. acutatum*

Числа (выделены цветом) показывают
количество положительных образцов в
пробе

