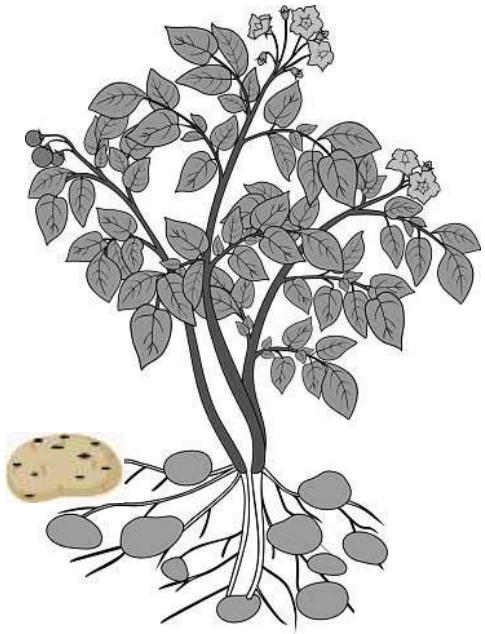
Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова
Биологический факультет
Кафедра микологии и альгологии

Биологические особенности и генотипическое разнообразие *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn



Выпускная квалификационная работа
студентки 2 курса магистратуры
Ярмеевой Марии Маратовны

Научные руководители
д.б.н., в.н.с. Еланский Сергей Николаевич
к.б.н., н.с. Кокаева Людмила Юрьевна

Введение

Черная парша на клубне

Чистая культура *R. solani*

Жизненный цикл *R. solani* (по Wharton et al., 2007)

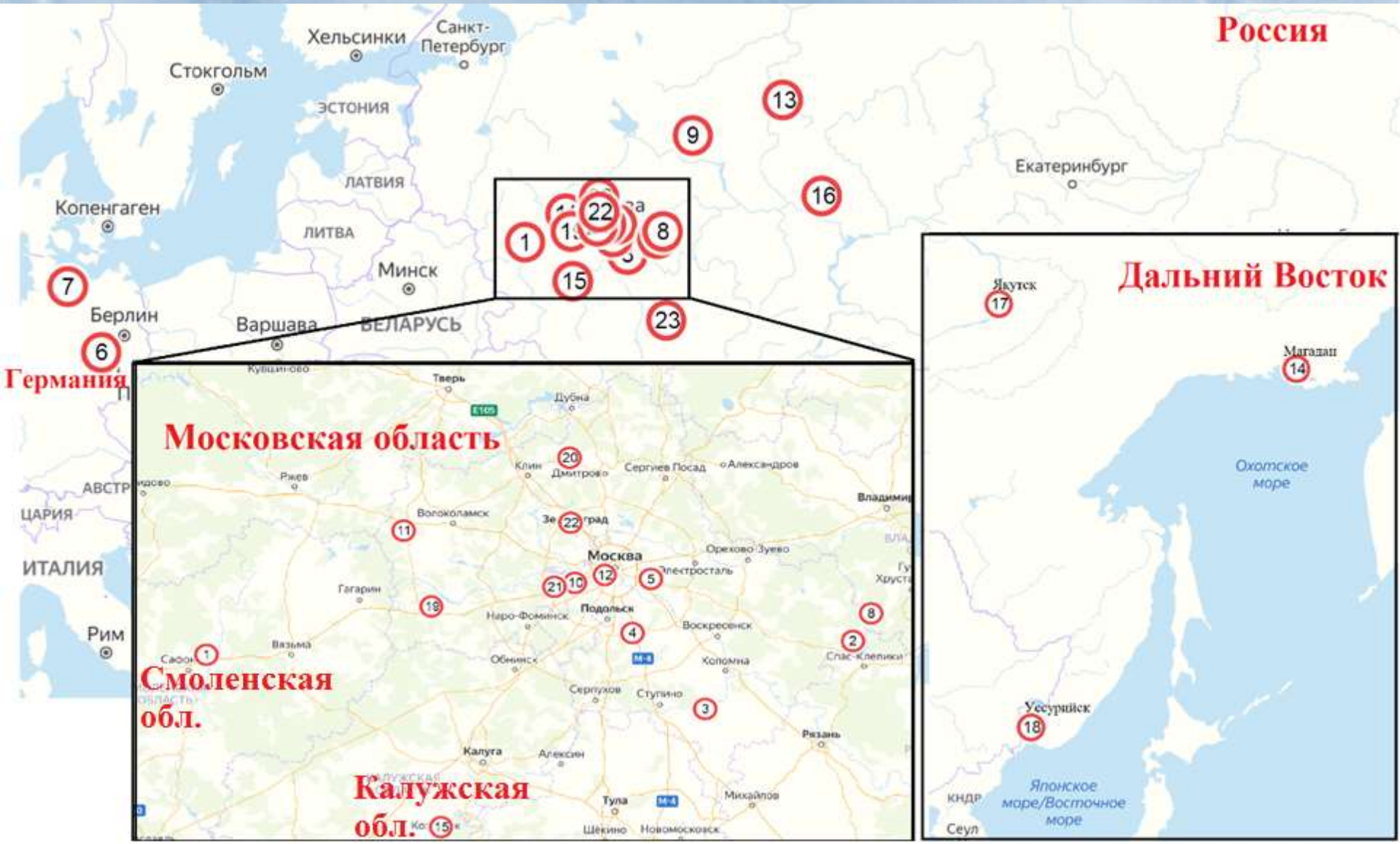
Цели и задачи

Цель работы – изучение биологических особенностей и генотипического разнообразия возбудителя ризоктониоза картофеля.

Задачи:

- выделение изолятов *R. solani* с клубней картофеля и пополнение имеющейся коллекции;
- проверка штаммов коллекции на чувствительность к применяемым против возбудителя ризоктониоза картофеля фунгицидным препаратам;
- оценка вирулентности штаммов к растениям-хозяевам;
- сравнение штаммов по последовательностям участка ITS1-5,8S-ITS2 и гена tef-1α;
- поиск генетических факторов устойчивости к пенцикурону.

Места сбора образцов



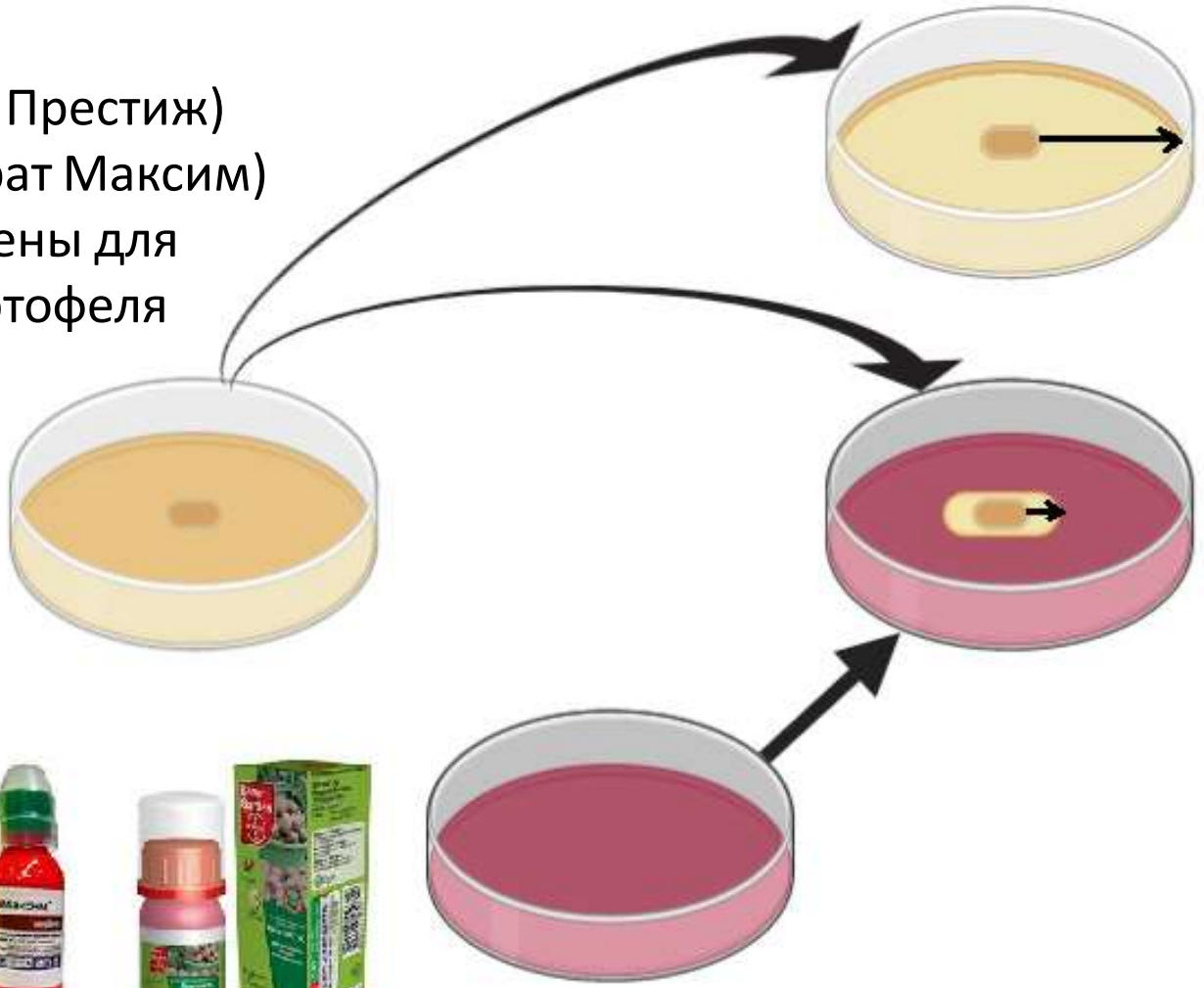
Места сбора образцов

Регион сбора*	Годы сбора	Количество изолятов	Регион сбора*	Годы сбора	Количество изолятов
Москва и Московская обл. (12)	2012-2019	40	Калужская обл. (1)	2018	4
Смоленская обл. (1)	2012	20	Респ. Марий-Эл (1)	2018	1
Владимирская обл. (1)	2014	6	Якутия (1)	2018	1
Костромская обл. (2)	2014, 2017-2018	16	Приморский край (1)	2018	1
Магаданская обл. (1)	2017	2	Тамбовская обл. (1)	2019	1
Германия (2)	2013	7			
Всего		**99**			

*в скобках указано количество точек сбора в регионе

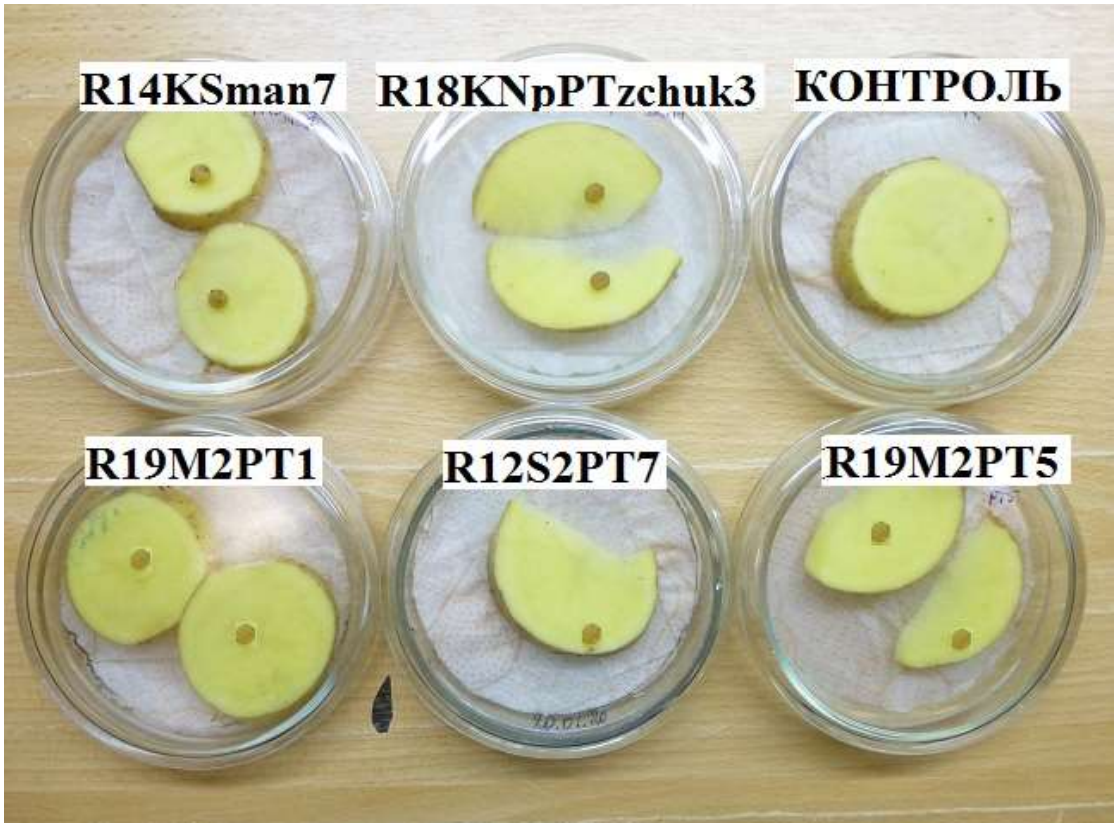
Определение устойчивости к фунгицидам

Исследованы
пенцикурон (препарат Престиж)
флудиоксонил (препарат Максим)
Оба препарата разрешены для обработки клубней картофеля перед посадкой



Определение патогенности

Заражение ломтиков картофеля



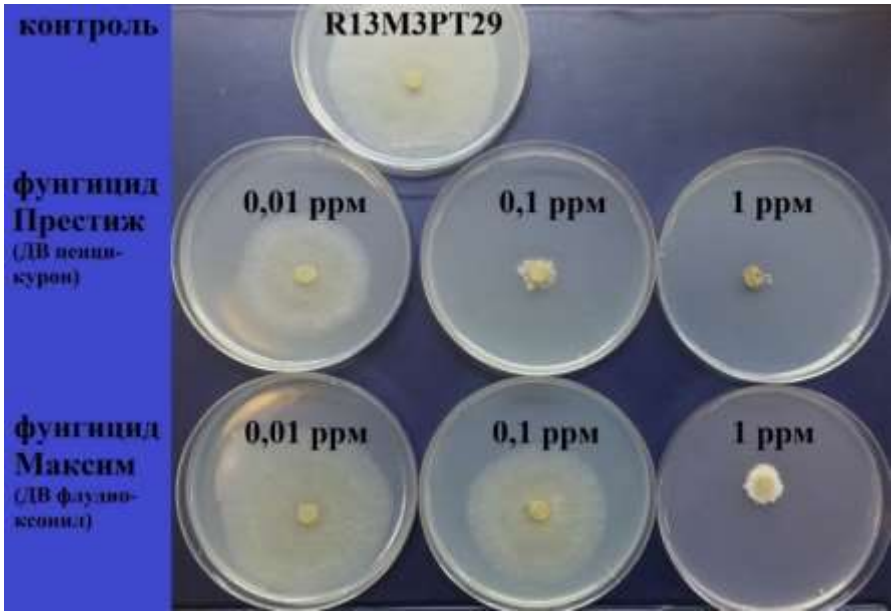
Анализ участков генома

Использованные в работе праймеры

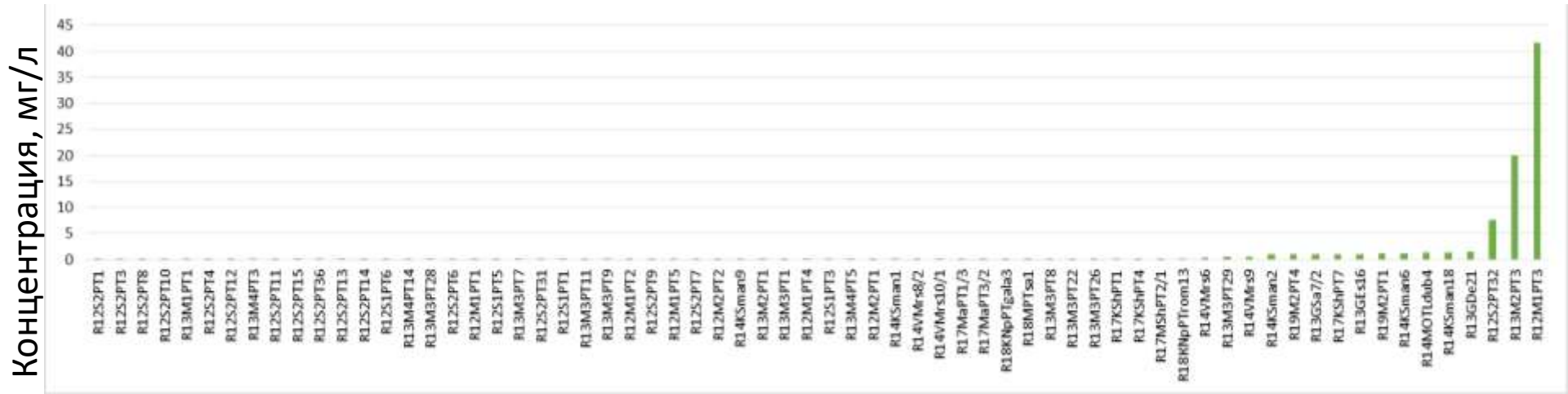
Ген	Название праймера	Последовательность нуклеотидов праймера	Температура отжига	Ссылка
1	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	55°C	White et al., 1990
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
2	TEF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	60°C	Rehner, Buckley, 2005
	TEF1-2218R	ATGACACCRACRGCRACRGTYTG		
3	B36F	CACCCACTCCCTCGGT	58°C	Thon, Royse, 1999, модиф.
	B42R	CTGGTACTGCTGGTACTC		

Проанализированы участки ДНК 1) ITS региона, 2) гена tef-1α и 3) β-тубулина

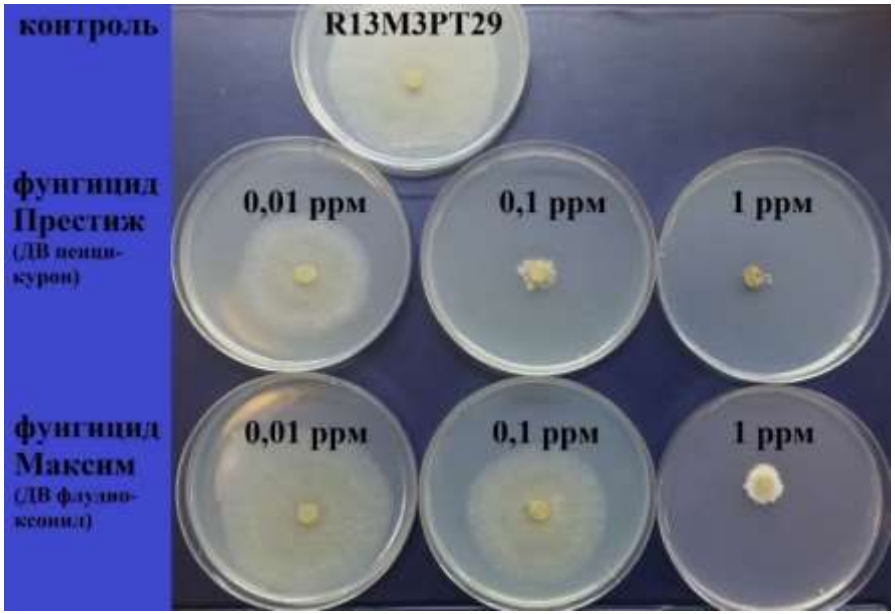
Чувствительность к флудиоксонилу



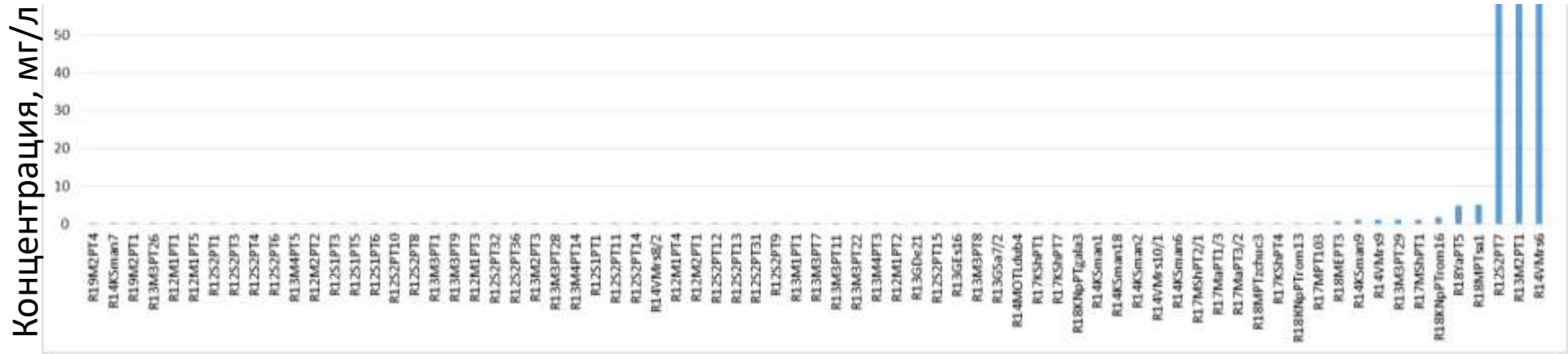
EC50 (эффективная концентрация), мг/л	
Ср.	1,264
Мин.	0,006
Макс.	41,687



Чувствительность к пенцикурону



EC50 (эффективная концентрация), мг/л	
Ср.	0,271
Мин.	0,003
Макс.	>500

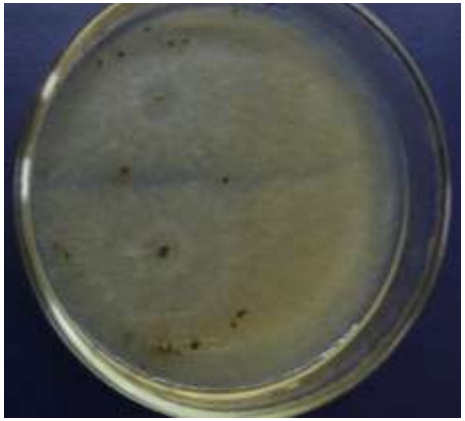


Заражение ломтиков картофеля

3 сут роста

3 нед роста

Штаммы после заражения, на питательной среде

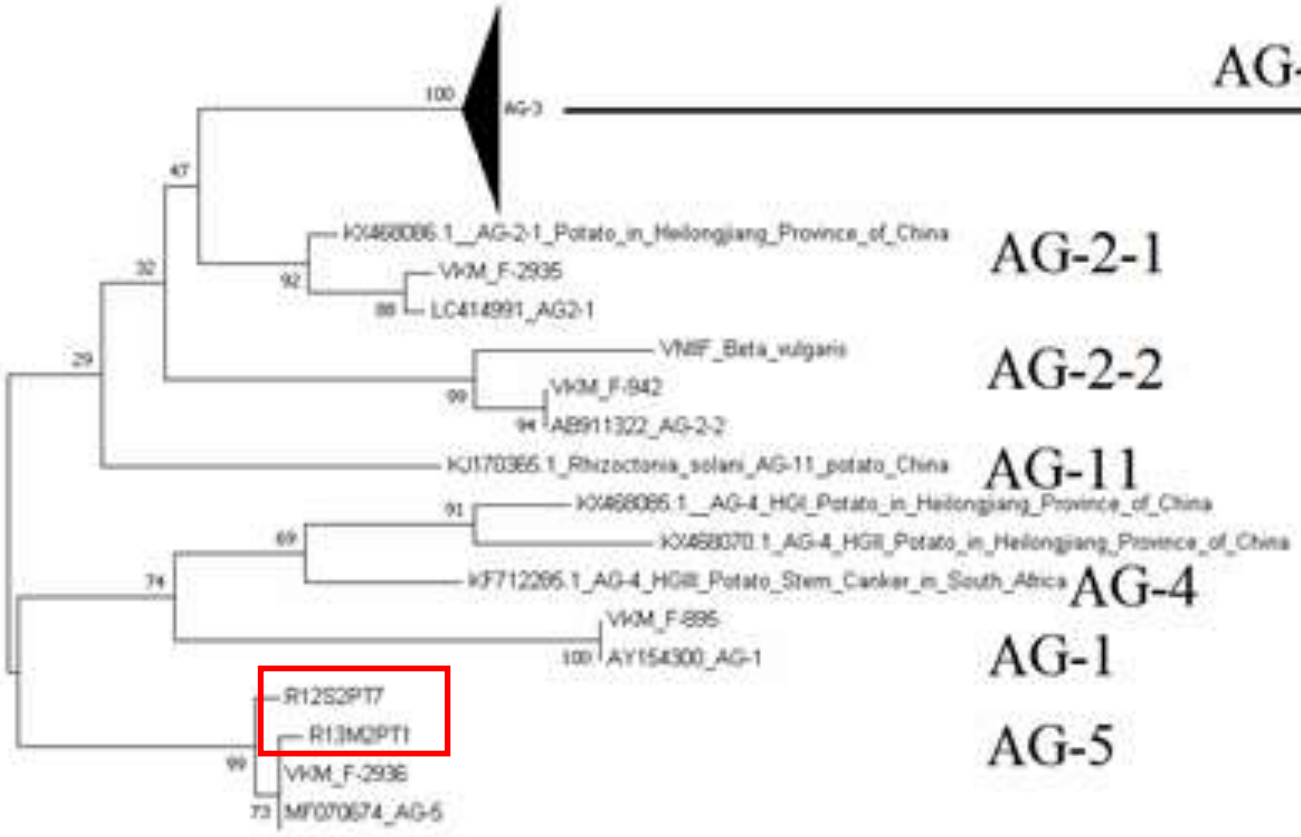


Идентификация

Штаммы AG-3 и AG-5, устойчивые к пенцикурону, образовывали характерные симптомы на клубнях.

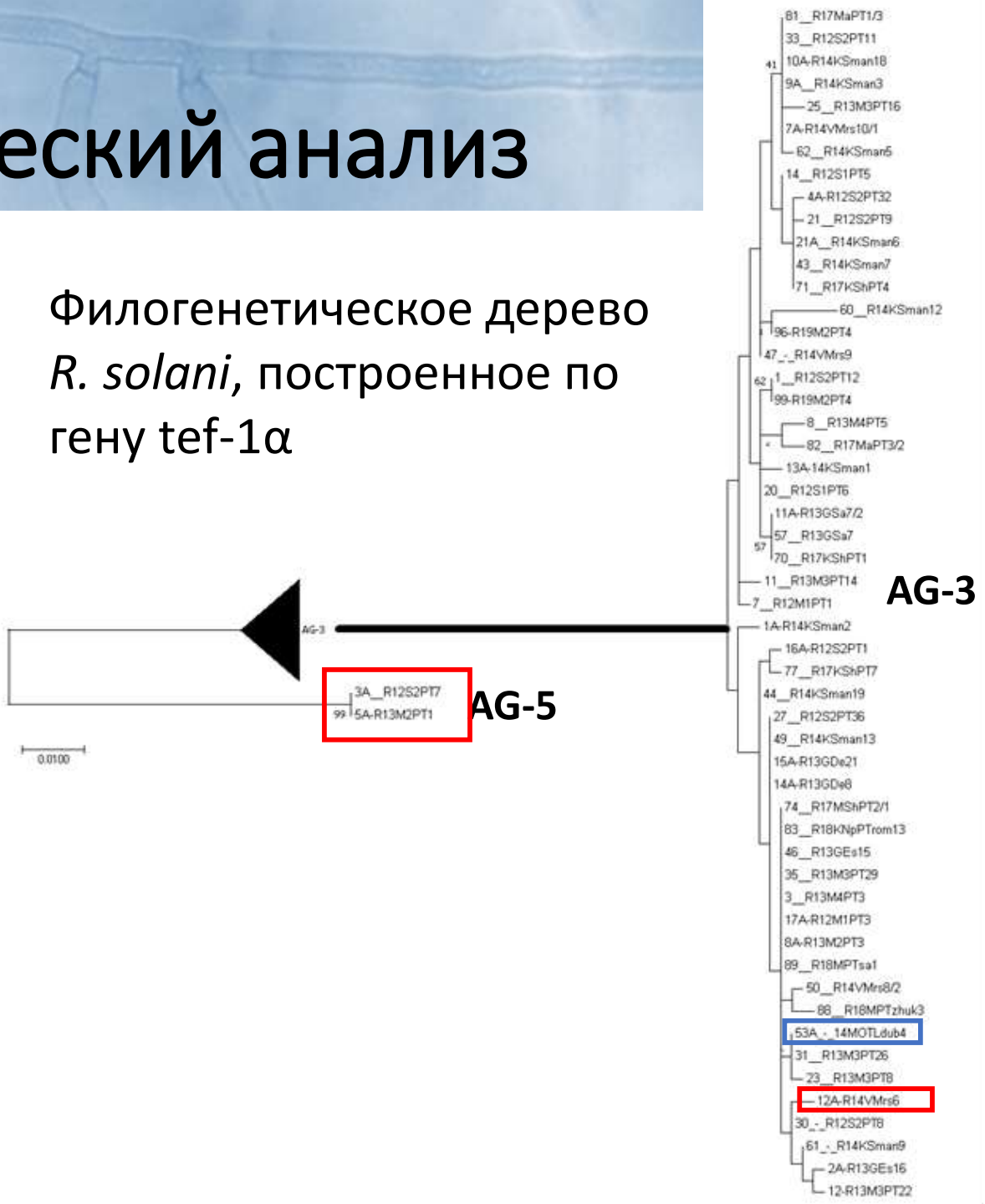
Филогенетический анализ

Филогенетическое дерево *R. solani*, построенное по участку ITS1-5,8S-ITS2



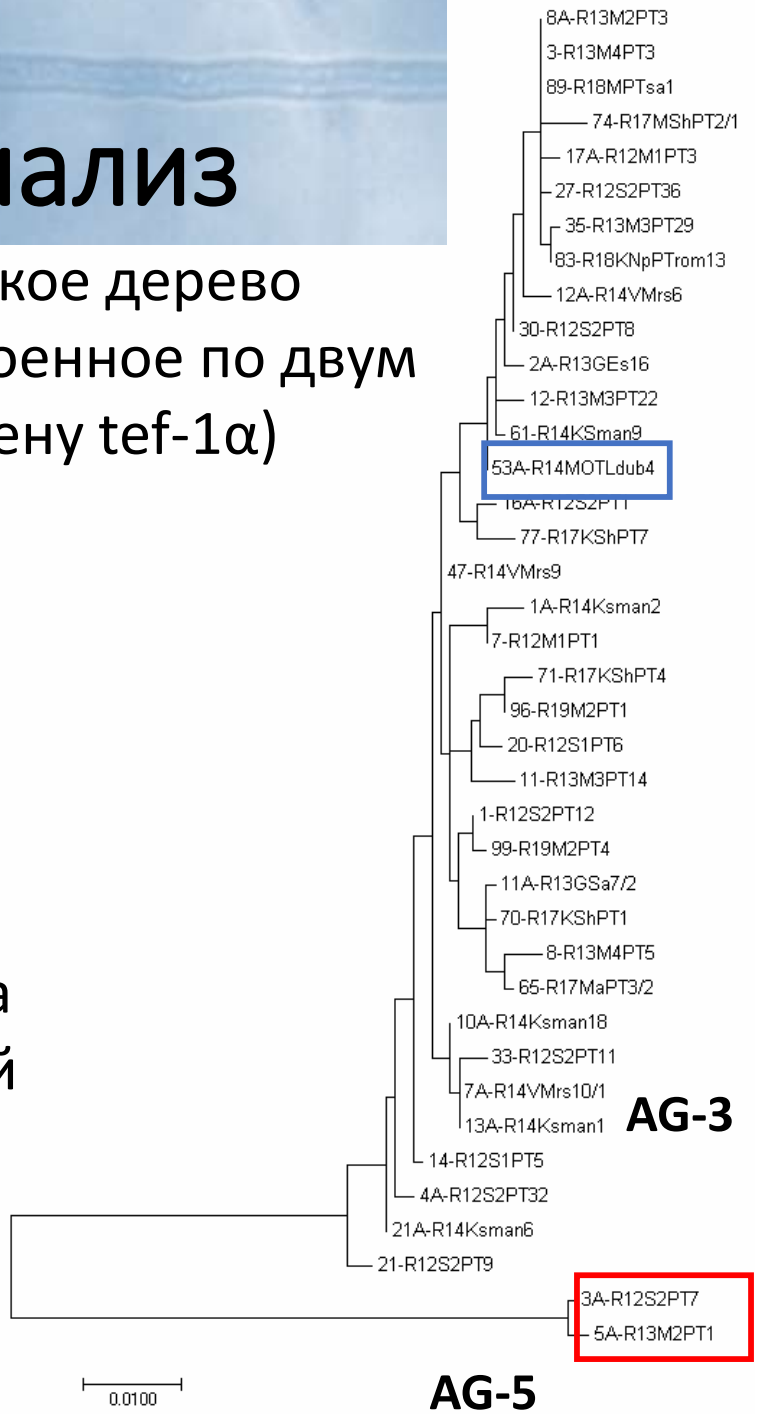
Филогенетический анализ

Филогенетическое дерево *R. solani*, построенное по гену tef-1α



Филогенетический анализ

Филогенетическое дерево *R. solani*, построенное по двум участкам (ITS, гену tef-1α)



Не было выявлено группировки штаммов по регионам происхождения и сортам картофеля.

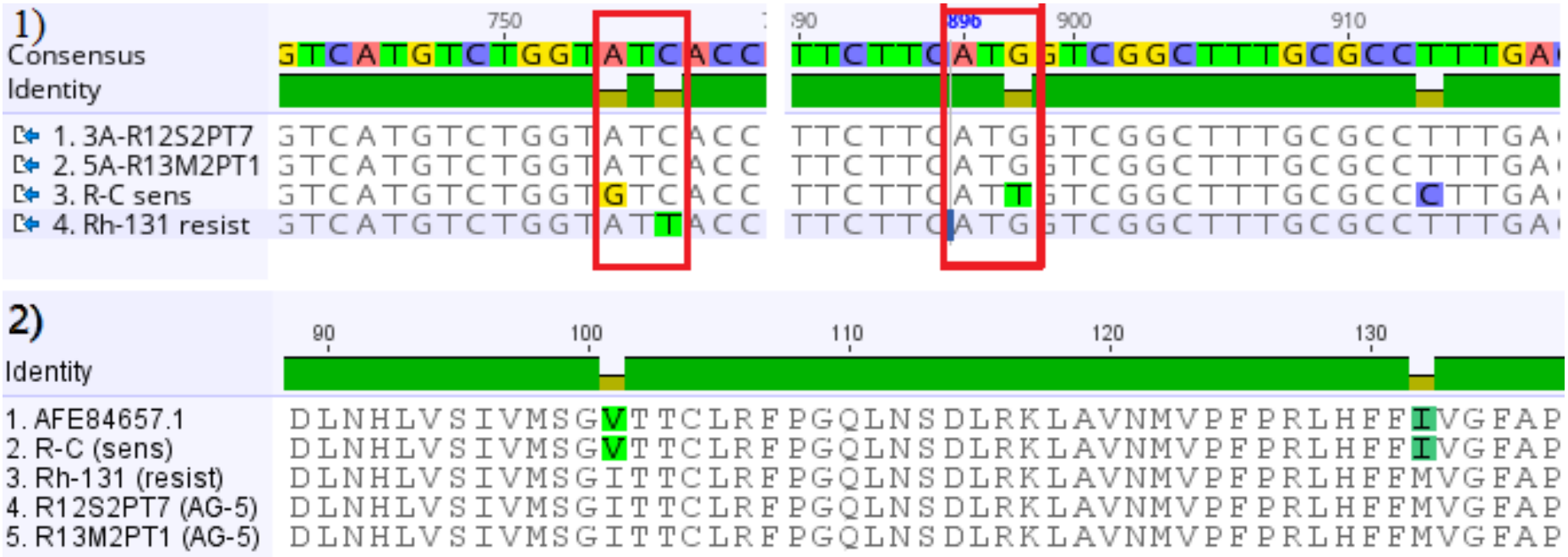
Кроме того, выделенный с листа томата **штамм** не имеет существенных отличий от штаммов, выделенных с клубней картофеля.

Все последовательности депонированы в Genbank.

Изучение структуры гена β-тубулина

1) Нуклеотидная последовательность
2) Аминокислотная последовательность.

Выделены кодоны, содержащие значимые мутации



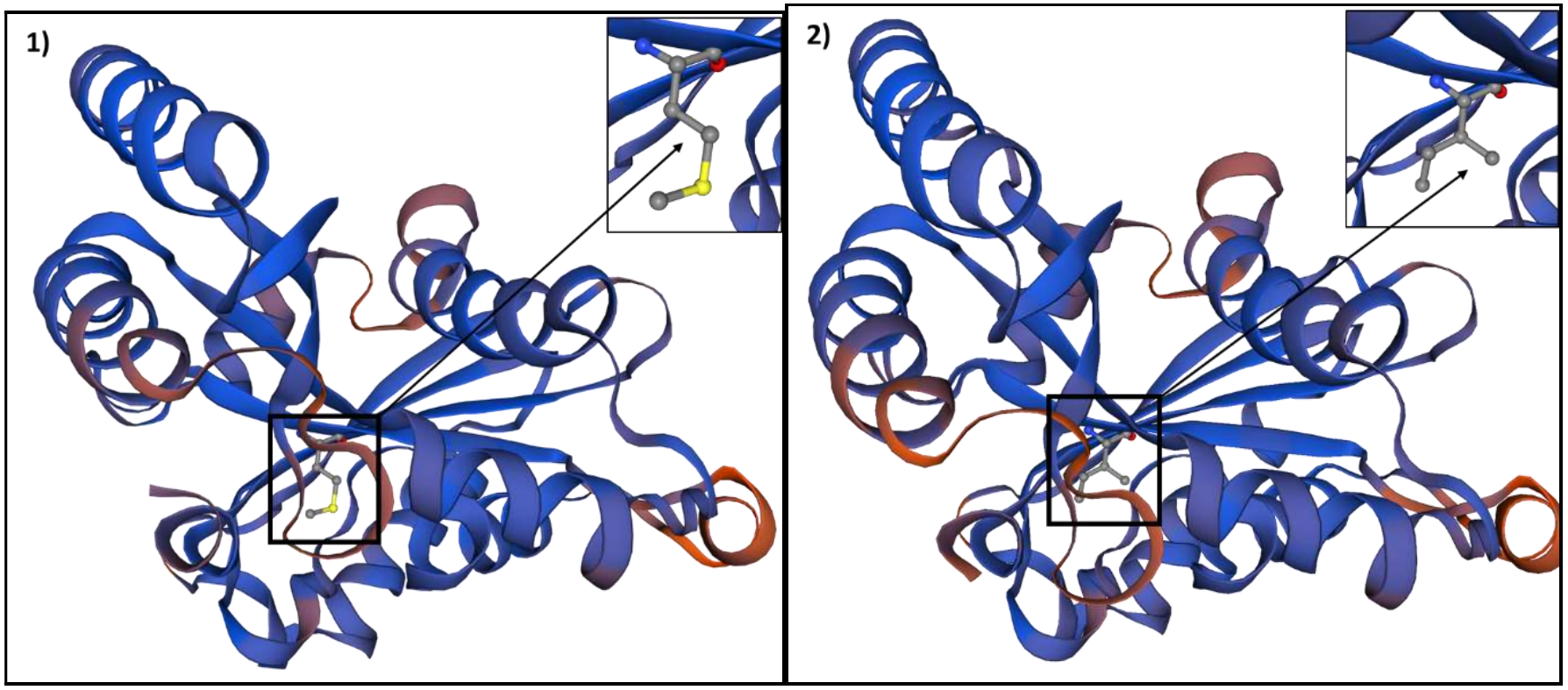
3A-R12S2PT7 и **5A-R13M2PT1** – обнаруженные нами устойчивые к пенцикурону штаммы AG-5;

Rh-131 – устойчивый, **R-C** – чувствительный к пенцикурону штаммы японских исследователей AG-4 (Roh et al., 1999);

AFE84657 – штамм AG-1-IA из Китая (GenBank)

Изучение структуры гена β-тубулина

Компьютерное моделирование пространственной структуры β цепи тубулина с использованием пакета Swiss-Model



1) Замена в 132 кодоне на метионин у мутантного штамма

2) Изолейцин в 132 кодоне у чувствительного штамма

Выводы

1. Обнаружено два устойчивых к пенцикурону штамма пятой и один третьей анастомозной группы.
2. Штаммы способны расти на живой ткани клубней картофеля.
3. Выявлена генетическая неоднородность участка ITS1-5,8S-ITS2 и гена tef-1α внутри третьей анастомозной группы.
4. Обнаружены однонуклеотидные замены в последовательностях β-тубулина устойчивых к пенцикурону штаммов пятой анастомозной группы.

Спасибо за внимание!