

Анализ генов эффекторов и микотоксинов у патогенов *Alternaria*, поражающих пасленовые

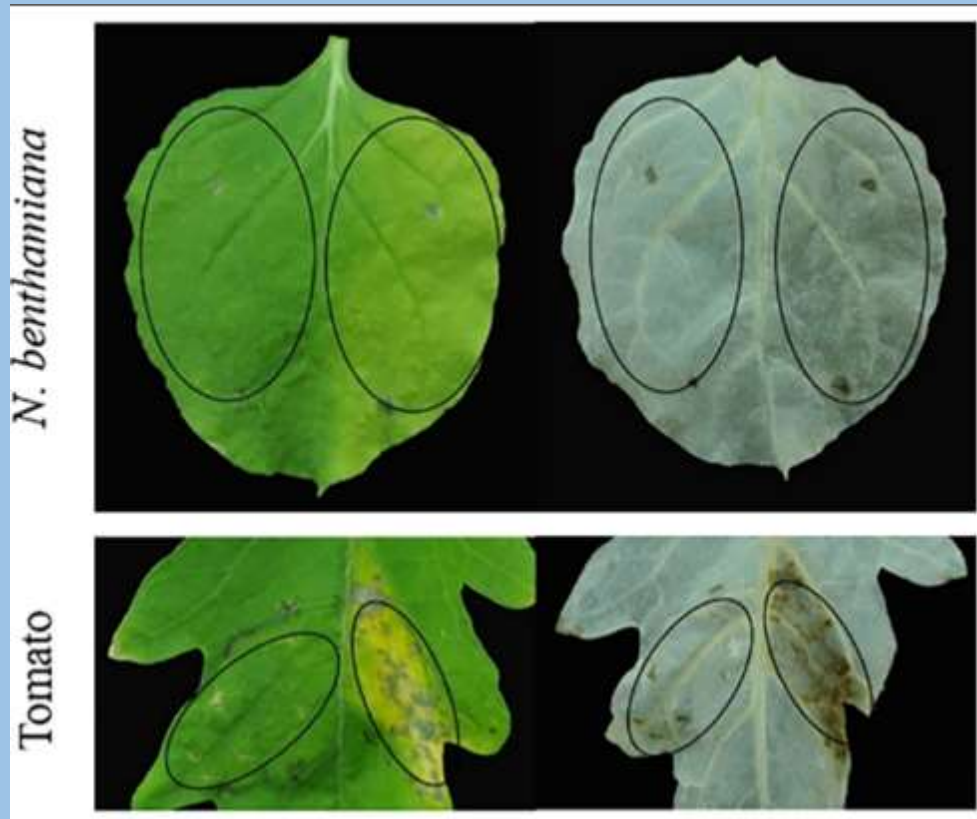
Дипломная работа

Руководитель : к.б.н., с.н.с. Кокаева Л. Ю.

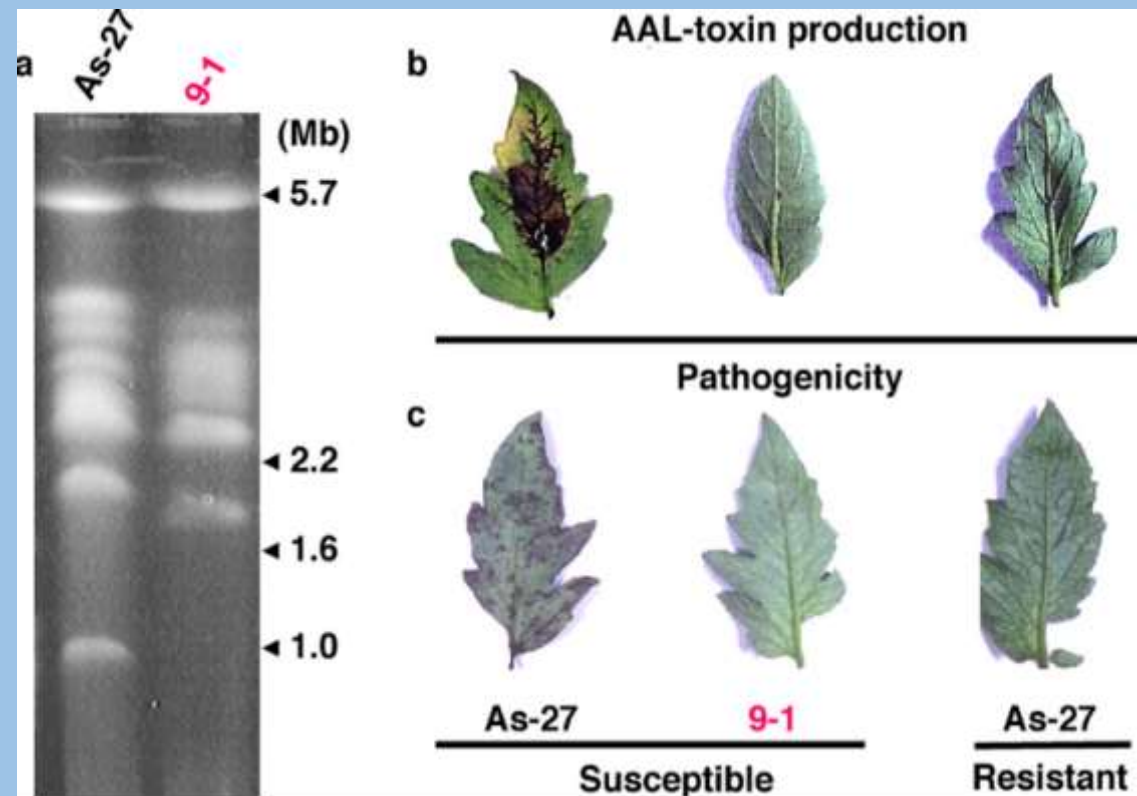
Исполнитель : магистр 2 курса Ши Вэньцзе

20 мая 2025, Москва

Патогенность видов рода *Alternaria*



- Патоген: *A. alternata/solani*
- Симптомы: коричневые пятна, некроз
- Экономический ущерб: 20-30% потери урожая (Wang et al., 2023)



- Ключевые гены:
 - MSAS → хозяин-специфичный токсин (Akagi et al., 2009)
 - AsCEP50 → эффектор подавление иммунитета
- Гены расположены на отдельных дополнительных коротких хромосомах

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования являлось изучение полиморфизма генов эффекторов и токсинов патогенных грибов *Alternaria alternata* и *Alternaria solani*, выделенных с растений картофеля и томата.

- В рамках работы были поставлены следующие **задачи**:
- 1. Выделение культур, идентификация по морфологическим признакам
- 3. Идентификация с помощью секвенирования ITS рДНК
- 4. Поиск и анализ генов эффекторов и токсинов, подбор праймеров для генов
- 5. Секвенирование последовательностей генов, кодирующих эффекторы и токсины

Коллекция штаммов и растительные образцы

№	Штамм	Хозяин	Вид
1	A23АКТЛ1	Томат	<i>A. alternata</i>
2	A23АКТЛ5	Картофель	<i>A. solani</i>
...	...	...	...
35	Акл17	Томат	<i>A. alternata</i>

- Штаммы:

-  35 изолятов *Alternaria* (томат: 20, картофель: 15) из Астраханской области

- Референсные штаммы:
кафедральная коллекция

- Растения-хозяева:

-  Томат (*Solanum lycopersici*)

-  Картофель (*S. tuberosum*)

Схема молекулярного анализа

[🍄 Штаммы, выделенные из листьев томата/картофеля]



[🧪 СТАВ + Precellys Evolution]



[🔬 ДНК (260/280 нм >1.8)]



[🔬 ПЦР: 95°C 30s → 60°C 30s → 72°C 30s (×35)]



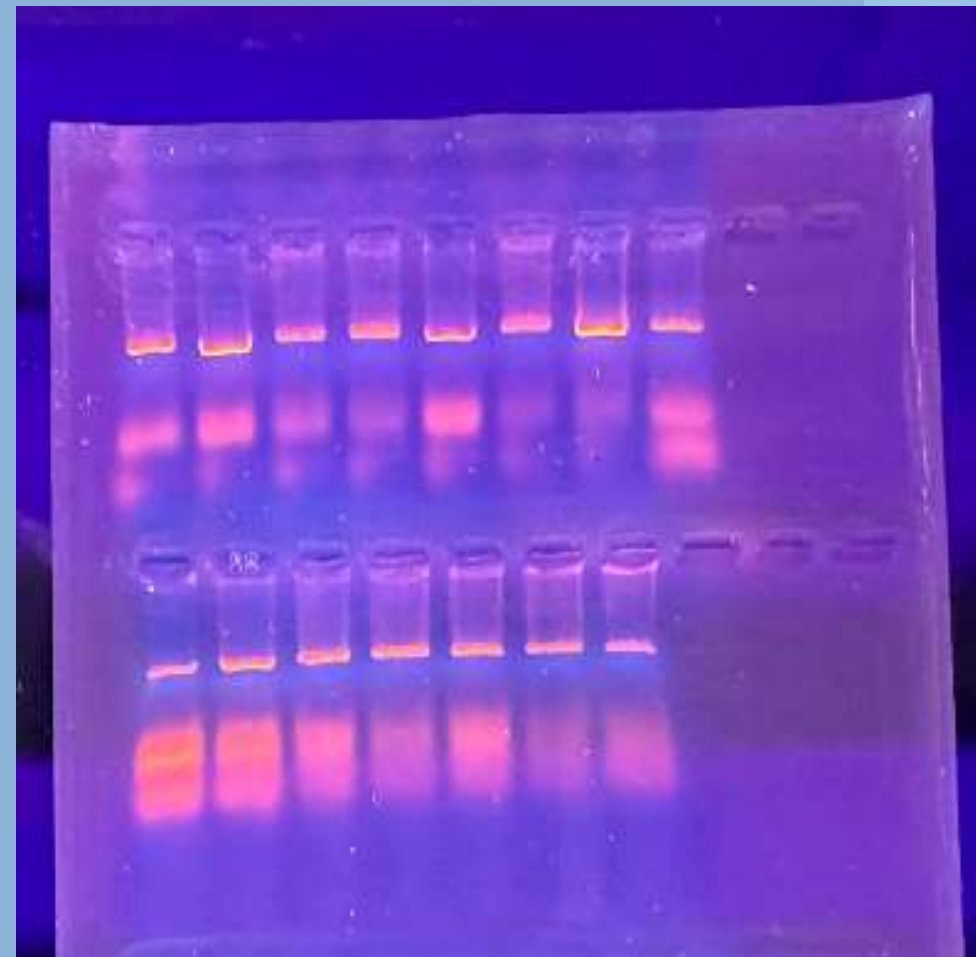
[📊 Электрофорез (1.8% агарозный гель)]



[💻 Секвенирование (3500xL Genetic Analyzer)]



[🏠 Филогенетический анализ (MEGA11)]

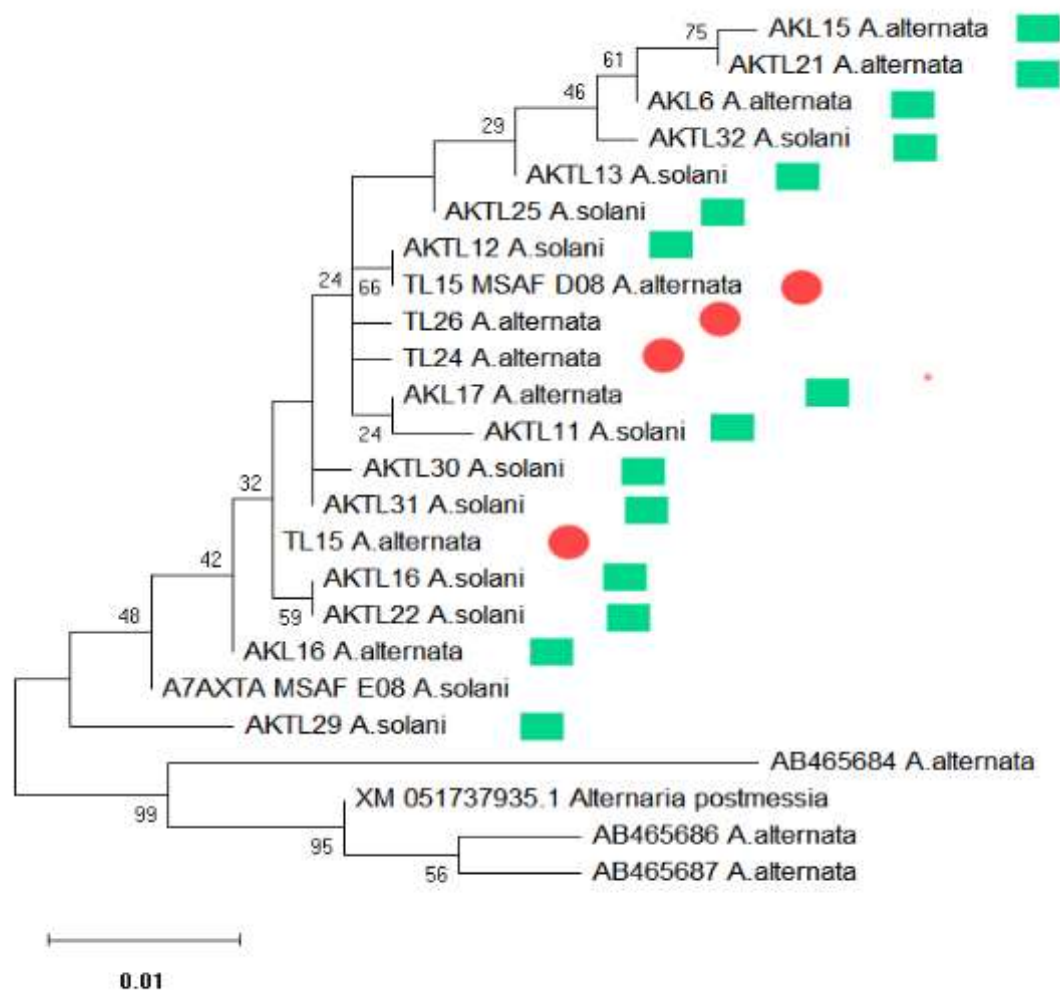


Результаты

- Анализ гена **MSAS** - токсин AAL (*Alternaria alternata* литический токсин), доминирующий и специфическим токсин, продуцируемый грибом *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersicum*
- Анализ гена **PKS** - поликетидсинтаза I типа (PKS I типа) микотоксина альтернариола *A. alternata* (АОН).
- Анализ гена **ASCEP50** - эффекторный белок, секретируемый грибом *Alternaria solani*.
- Анализ гена **ASCEP112** -пропатогенный эффектор при заражении растений *Alternaria solani*

Анализ гена MSAS

(токсин AAL *A. alternata* f. sp. *lycopersici*)



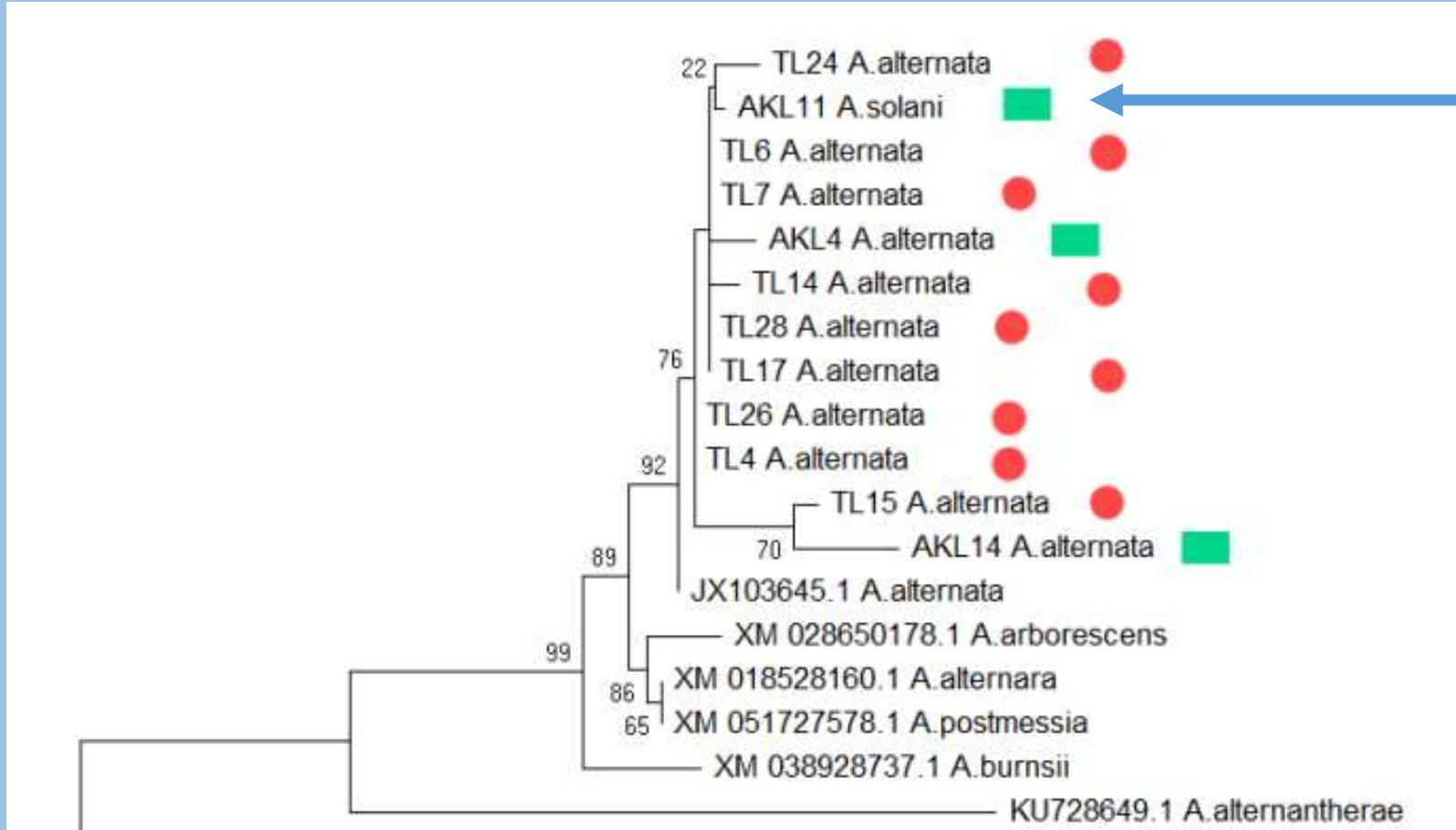
Не обнаружено специфичности к растению-хозяину

1. AB465686_Alternaria_alternata	CATGTGCGTGATGCCA
2. AB465687_Alternaria_alternata	CATGTGCGTGATGCCA
3. AB465684_Alternaria_alternata	CATGTGCGTGATGCCA
4. AKTL32 A_solani	CATGTATGTGATGCCA
5. AKTL13 A_solani	CATGTATGTGATGCCA
6. AKTL11 A_solani	CATGTATGTGATGCCA
7. AKTL25 A_solani	CATGTATGTGATGCCA

Филогенетическое дерево гена MSAS (зеленым цветом выделены штаммы изолированные из листьев картофеля; красным - томатов)

Анализ гена PKS

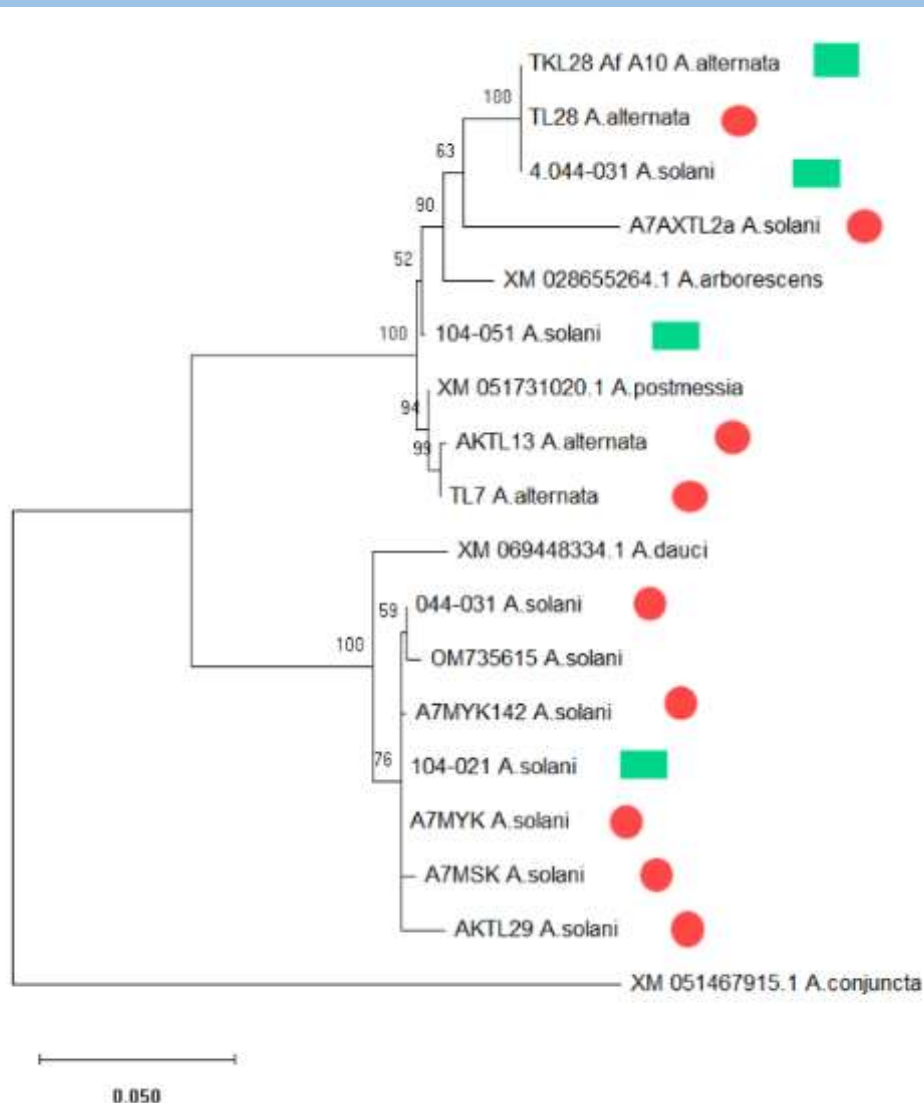
(токсин альтернариол *A. alternata*).



PKS у *A. solani* AKL11 →
возможный горизонтальный
перенос

Филогенетическое дерево гена PKS (зеленым цветом выделены штаммы изолированные из листьев картофеля; красным - томатов).

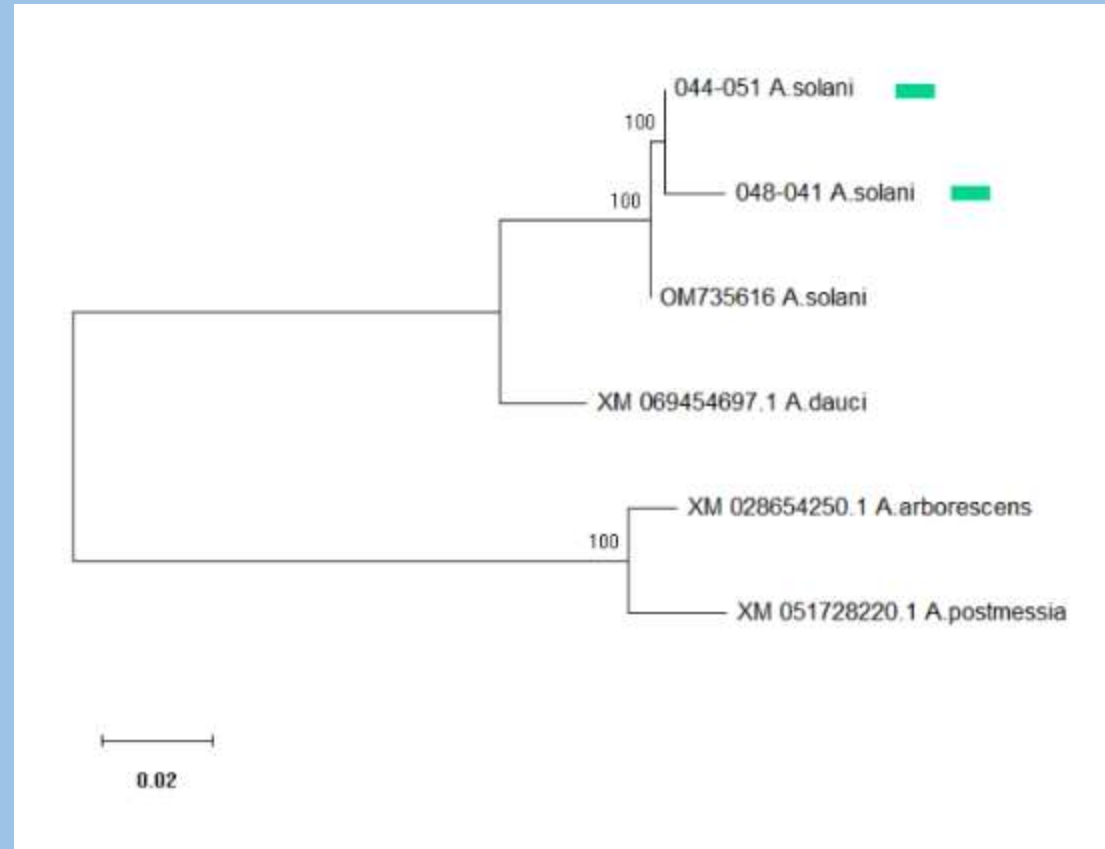
Анализ гена ASCER50 (эффектор)



Species/Abbrv	*	**	*	*****	*****	*				*****	*****	*
1. 104-051_A. solani	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
2. A7AXTL2a_A. solani	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
3. 4.044-031_A. solani	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
4. TKL28 Af A10_A. alternata	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
5. TL28_A. alternata	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
6. XM 051731020.1_A. postmessia	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
7. AKTL13_A. alternata	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
8. XM 028655264.1_A. arborescens	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
9. TL7_A. alternata	TTGCGTCAT	ACTATGTCG	ACATTGCCG	CCAAACAAG	CTTAT							
10. 044-031_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
11. 104-021_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
12. A7MSK_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
13. A7MYK_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
14. AKTL29_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
15. A7MYK142_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
16. XM 051467915.1_A. conjuncta	TCGCCGCC	TACTACGTCG	ACGTTGCC	TCCAAACAAG	CTCGT							
17. OM735615_A. solani	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							
18. XM 069448334.1_A. dauci	TCGCATCCT	ACTACGTCG	ACGTCATTGCC	AAACAAGCT	CGT							

Филогенетическое дерево гена ASCER50 (зеленым цветом выделены штаммы изолированные из листьев картофеля; красным - томатов).

Анализ гена ASCER112 (эффектор)



Филогенетическое дерево гена ASCER112 (зеленым цветом выделены штаммы, изолированные из листьев картофеля).

Выводы

1. Сравнительный анализ *Alternaria alternata* и *A. solani* выявил существенные различия в уровне генетического разнообразия: первый вид демонстрирует более высокую вариабельность, что, вероятно, связано с его способностью поражать широкий спектр растений-хозяев. В противоположность этому, *A. solani* характеризуется узкой специализацией и высокой консервативностью ключевых генов, что может отражать его адаптацию к ограниченному числу хозяев.
2. Эффекторный ген (ASCEP50) и гены, участвующие в биосинтезе токсинов (MSAS, PKS), являются ключевыми факторами вирулентности *Alternaria*. Их универсальность у разных штаммов подчеркивает важность этих генов в патогенезе, независимо от растения-хозяина.
3. Выявление гена PKS у штамма *A. solani* (AKL11), характерного преимущественно для *A. alternata*, указывает на возможный горизонтальный перенос генов между видами, что представляет собой интересное направление для дальнейших исследований эволюции патогенных свойств.

Спасибо за внимание!

Ключевые выводы и направления будущих исследований

-  **Генетические механизмы патогенности**
- **У генов эффекторов Ascer50 и Ascer112:**
 - Полиморфизм определяет специфичность к хозяевам (*A. solani* vs *A. alternata*)
 - PKS у *A. solani* AKL11 → возможный горизонтальный перенос

Практическое значение

- Маркеры для диагностики вирулентных штаммов
- Мишени для CRISPR-селекции устойчивых сортов
-  **Перспективные исследования**

Прикладные решения:

- Разработка ПЦР-тестов на основе SNP
-  **Экологические аспекты**
- Влияние климатических изменений на экспрессию токсинов