

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

Биологический факультет

На правах рукописи

СУРИНА Татьяна Александровна

**ФИТОФТОРОЗНЫЕ КОРНЕВЫЕ ГНИЛИ ДРЕВЕСНЫХ И
КУСТАРНИКОВЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИАГНОСТИКА**

03.02.12 – микология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2015

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель: доктор биологических наук, старший научный сотрудник кафедры микологии и альгологии МГУ имени М.В. Ломоносова
Еланский Сергей Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор кафедры защиты растений ФГБОУ ВПО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева
Смирнов Алексей Николаевич

доктор биологических наук,
заведующий отделом защиты растений
ФГБУН Главный ботанический сад им.
Н.В. Цицина РАН
Ткаченко Олег Борисович

Ведущая организация: **ФГАОУВО «Российский Университет Дружбы Народов»**

Защита состоится «24» апреля 2015 г. в 17 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.46 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, ауд. М1.
Факс: (495) 939-43-09, e-mail: shch_a_w@mail.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке МГУ им. М.В. Ломоносова

Автореферат разослан «___» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



А.В. Щербаков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Оомицеты рода *Phytophthora* de Bary поражают широкий спектр видов древесных и кустарниковых растений, обладают высокой вредоносностью, пластичностью и хорошо приспосабливаются к новым климатическим условиям. Для успешной борьбы с фитопатогенными оомицетами необходимо правильно провести их идентификацию в пораженном материале и подобрать эффективные фунгициды.

Традиционно идентификация возбудителей фитопфторозов древесных растений проводится на питательной среде после выделения изолята возбудителя в чистую культуру. Определение по морфолого-культуральным признакам занимает длительное время и требует хороших знаний биологии и морфологии видов рода *Phytophthora*.

Экспресс-диагностика возбудителей фитопфторозов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) может проводиться быстро (за несколько часов) и не требует выделения возбудителя в чистую культуру. В нашей работе мы провели оценку и сравнительный анализ тест-систем (в том числе мультиплексных, разработанных за рубежом, а также созданных в нашей лаборатории), на штаммах из собственной коллекции изолятов *Phytophthora* sp., выделенных с пораженных растений в разных регионах, а также переданных зарубежными коллегами (из коллекций «FERA», Англия, EVIRA, Финляндия, «DSMZ», Германия).

Другой задачей, которую мы ставили в данной работе, был поиск эффективных препаратов для борьбы с фитопфторозами древесных растений. Фунгициды против грибов не всегда эффективны против оомицетов рода *Phytophthora*. У зарегистрированных в России препаратов, как правило, изучали эффективность по отношению к *P. infestans* (Mont.) de Bary – возбудителю опасного заболевания картофеля и томата.

Цель и задачи исследования. Целью проводимых исследований являлось уточнение видового состава оомицетов рода *Phytophthora*, вызывающих поражения древесных и кустарниковых растений, разработка и испытание систем их диагностики на основе ПЦР, а также изучение эффективности используемых против них химических фунгицидных препаратов.

Для достижения цели предстояло решить следующие задачи:

1. Изучить видовой состав фитопатогенных оомицетов рода *Phytophthora*, вызывающих поражения древесных и кустарниковых растений в питомниках и лесопосадках.

2. Разработать и оптимизировать тест-системы и протоколы пробоподготовки и проведения ПЦР (обычного и «в реальном времени») для экспресс-идентификации возбудителей фитофторозов древесных растений.

3. Разработать метод диагностики возбудителей фитофторозов в воде с помощью комбинации метода биоприманок и ПЦР.

4. Определить наиболее эффективные фунгицидные препараты для борьбы с фитофторозами древесных растений.

Научная новизна. Научная новизна работы состоит в том, что впервые были проведены обследования лесопосадок, питомников и водоемов на наличие фитофторозных корневых гнилей древесных растений с использованием как традиционных методов, так и современной экспресс-диагностики. Для выявления видов рода *Phytophthora* в воде был применен метод биоприманок, которые ранее на территории России не применялся. Применение этого метода позволило выявить 3 вида рода *Phytophthora* (*P. gonapodyides*, *P. polonica*, *P. megasperma*) и *Phytophythium litorale*. О выявлении двух из этих видов в России ранее сообщений не было.

Впервые была проверена специфичность зарубежных тест-систем диагностики *P. ramorum* с использованием набора российских и зарубежных штаммов грибов рода *Phytophthora*, проведена сравнительная оценка разных систем выделения ДНК.

На основании нуклеотидных последовательностей, полученных в результате мониторинга и из базы данных GenBank были разработаны праймеры и зонды для идентификации *P. ramorum* в пораженном растительном материале.

Впервые было изучено влияние на *P. ramorum* некоторых фунгицидов, зарегистрированных в России для борьбы с фитофторозом картофеля и томата.

Практическая значимость. Разработанные тест-системы показали высокую специфичность и чувствительность и могут применяться для выявления и идентификации *P. ramorum* в пораженном растительном материале. Метод диагностики возбудителей фитофторозов в воде с помощью биоприманок перспективен для применения при обследовании водоемов.

Результаты изучения эффективности фунгицидов в отношении *P. ramorum* могут быть использованы при разработке защитных мероприятий с этим патогеном.

Положения, выносимые на защиту:

1. Видовой состав возбудителей фитофторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений в питомниках и лесопосадках.

2. Разработка и оптимизация молекулярно-генетических методов идентификации возбудителей фитофторозов древесных растений (методы выделения ДНК, праймеры и зонды для ПЦР и ПЦР «в реальном времени»).

3. Разработка метода диагностики фитофторозов в воде с помощью комбинации биоприманок и ПЦР.

4. Определение наиболее эффективных препаратов для борьбы с фитофторозами древесных растений.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на 5 всероссийских и международных научных мероприятиях: Втором съезде микологов России (Москва, 16-18 апреля 2008 г.), Третьем съезде микологов России, (Москва, 10-12 октября, 2012 г.); Всероссийской научной конференции «Роль ботанических садов и охраняемых природных территорий в изучении и сохранении разнообразия растений и грибов (Ярославль, 13-16 октября 2011г.), Шестой встрече IUFRO «*Phytophthora* в лесах и природных экосистемах», (Кордова (Испания), 9 – 14 сентября 2012 г.); Десятом Международном конгрессе по фитопатологии (Пекин (КНР) 25 – 30 августа 2013 г.).

Публикации. По результатам диссертации опубликовано 9 печатных работ, из них 3 статьи в российских рецензируемых журналах, входящих в список ВАК РФ, 2 статьи в иностранных изданиях.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, выводов, списка литературы и четырех приложений. Материал изложен на 163 страницах машинописного текста, содержит 34 таблицы и 26 рисунков. Список литературы включает 155 источников, в том числе 146 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность и признательность научному руководителю С.Н. Еланскому за помощь в написании и определении основных направлений работы; заместителю директора ФГБУ ВНИИКР Е.С. Мазурину за консультации по научным вопросам; начальнику научно-экспериментального отдела

ФГБУ ВНИИКР И.О. Камаеву за помощь по статистической обработке данных; сотрудникам лаборатории микологии ФГБУ ВНИИКР О.В. Скрипка, М.Б. Копиной, И.П. Дудченко за помощь в проведении исследований; сотрудникам Пятигорского филиала В.В. Петиной и М.С. Чернову, сотрудникам Карельского и Ивановского филиалов ФГБУ ВНИИКР за помощь в проведении мониторинга, а также сотрудникам кафедры микологии и альгологии биологического факультета МГУ им. Ломоносова за поддержку и помощь в проведении работы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава I. Обзор литературы

В обзоре литературы освещены вопросы распространения и вредоносности наиболее опасных фитопаторозов древесных и кустарниковых растений. Рассмотрены систематическое положение, биология и симптоматика этих видов. Приведено описание методов их выявления и идентификации, мер борьбы с фитопаторозными корневыми гнилями.

Глава II. Материалы и методы

Работа была выполнена в 2010-2014 гг. в Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова на кафедре микологии и альгологии биологического факультета; часть работы выполнена на базе ФГБУ «Всероссийский центр карантина растений» (ФГБУ ВНИИКР).

Мониторинг проводился в 2011-2014 гг. в 6 субъектах Российской Федерации в питомниках и лесопосадках. Всего было отобрано и проанализировано 720 образцов вегетативных частей растений и почвы.

Для диагностики фитопатороза декоративных и кустарниковых культур использовали методы микроскопирования и морфометрии, влажных камер, выделения чистых культур с использованием питательных сред, ПЦР-диагностики.

При выявлении фитопаторозов в водоемах использовали метод биоприманок.

Изучение культурально-морфологических признаков культур проводили на четырех питательных средах (морковная (СРА), синтетическая (SNA), овсяно-глюкозная среда и V8).

Выделение ДНК проводили следующими методами: с использованием набора «Проба ГС» кат. № Р-003/1 (ООО «Агродиагностика», Москва); согласно методике описанной J.J. Doyle,

J.L. Doyle (1990); с использованием фосфатно-солевого буфера Дулбеско (DPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline); с помощью станции выделения нуклеиновых кислот Tecan Freedom EVO с использованием набора на основе магнитных частиц "М-Сорб-Туб" (ЗАО «Синтол»).

С выделенными образцами ДНК проводили классическую ПЦР. Для амплификации ДНК использовали праймеры ITS4/ITS5 (White, 1990), YPh1F/YPh2R (Schena et al., 2008), Phyto 1/Phyto 4 (Hayden et al., 2004) и Pram F1/Pram R1 (Lane et al., 2003b). Состав реакционной смеси и температурно-временные показатели изменяли в зависимости от использованных праймеров.

Результаты амплификации регистрировали после проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием в гель-документирующей системе Quantum-ST-4-1500 (Япония).

Амплификацию и детекцию в реальном времени проводили на амплификаторе iCycler iQ 5 (Bio-Rad, США) с специфичными к *P. ramorum* праймерами и зондами (Pram 114-FC/Pram 1527-190-R, зонд: Pram 1527-134-T; Pram-5/Pram-6, зонд: Pram-7). Состав реакционной смеси и температурно-временные показатели изменяли в зависимости от использованных праймеров.

В работах по оценке эффективности выявления ДНК и сравнении тест-систем для идентификации оомицетов рода *Phytophthora* использовали 13 изолятов фитопатогенных оомицетов, выделенных с пораженных растений в разных регионах, а также переданных зарубежными коллегами (из коллекций «FERA», Англия, EVIRA, Финляндия, «DSMZ», Германия).

Реакцию секвенирования проводили с применением реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя, с последующим разделением фрагментов на анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

Определение эффективности фунгицидных препаратов проводили на твердой питательной среде CPA и на листьях рододендрона. Для опыта использовали 8 препаратов в 3-х концентрациях (таблица 1). Концентрация препарата в питательной среде (в растворе для опыта на листьях) соответствовала концентрации рабочего раствора препарата применяемого в соответствии с нормами рекомендованными Списком пестицидов и агрохимикатов разрешенных к применению на территории РФ. Каждый препарат и его концентрации в опыте на питательной среде оценивали, измеряя диаметр колоний. Затем, проводили расчет биологической эффективности. В опыте с листьями

сначала проводили опрыскивание листьев рабочим раствором препарата, а затем искусственно заражали лист рододендрона суспензией культуры *P. ramorum* в концентрации 1.3×10^5 клеток в 1 мл методом укола в центральную жилку листа. Потом отмечали степень развития некрозов по 5-ти бальной шкале и рассчитывали развитие болезни и биологическую эффективность препарата (Методы мониторинга вредителей и болезней леса, Том III, Справочник, М., 2004). Чашки Пети с питательной средой и листьями инкубировали при комнатной температуре на свету.

Таблица 1.

Препараты и их концентрации, использованные для оценки их эффективности в отношении *P. ramorum*.

№ п/п	Название препарата (действующее вещество)	Концентрация препарата в среде, %	Концентрация препарата в рабочем р-ре в опыте на листьях, %
1.	Бордоская смесь ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$)	2; 1; 0,5	2; 1;
2.	Превикур (пропамокарб гидрохлорид)	0,4; 0,2; 0,1	0,4; 0,2
3.	Топаз (пенконазол)	0,1; 0,05; 0,025	0,1; 0,05
4.	Скор (дифеноконазол)	0,04; 0,02; 0,01	0,04; 0,02
5.	Браво (хлороталонил)	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
6.	Ридомил Голд (мефеноксам + манкоцеб)	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
7.	Фарма Йод (водорастворимый комплекс йода)	1; 0,5; 0,25	1; 0,5
8.	Танос (фамоксадон + цимоксанил)	0,3; 0,15; 0,075	0,3; 0,15

Глава III. Обследование на выявление фитопторозных корневых гнилей древесных и кустарниковых растений в питомниках и естественных насаждениях.

3.1. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов, выявленных в питомниках.

Обследования проводились в питомниках Московской и Ивановской областей, Республики Карелия и Ставропольского Края. Всего было отобрано 313 образцов почвы и вегетативных частей растений с наиболее характерными признаками. Мониторинг питомников показал

отсутствие фитотрозных корневых гнилей на обследованных растениях.

3.2. Видовой состав грибов и грибоподобных организмов, выявленных при обследованиях лесопосадок древесных и кустарниковых культур.

Обследования древесных и кустарниковых культур проводились в Ставропольском крае. В 2013 году из образцов почвы, отобранных в Кировском районе Ставропольского края в лесонасаждениях дуба, была выделена *P. citricola* методом биоприманок. В почве, отобранной в прикорневой зоне каштана в Ботаническом саду г. Пятигорска была обнаружена *P. cactorum*, а в почве, отобранной около тиса и дуба, была выявлена *P. citricola*.

В 2014 году при обследовании лесного массива на горе Машук (г. Пятигорск) в образцах почвы, отобранных от дуба и клена, была обнаружена *P. plurivora* T. Jung & T.I. Burgess. В городском парке г. Кисловодск в образцах почвы, отобранных от каштана и клена, также была выявлена *P. plurivora* (таблица 2).

Таблица 2.

Виды *Phytophthora* и количество их случаев обнаружения в результате лабораторной экспертизы образцов древесных и кустарниковых культур

Регион России	Вид растений	Количество исследованных образцов	Выявленные виды, количество случаев обнаружения*
Ставропольский край	Дуб, Тис, Каштан,	167	<i>P. citricola</i> – 3 <i>P. cactorum</i> – 1
Ставропольский край	Дуб, Ель, Клен, Каштан, Сирень	120	<i>P. cactorum</i> – 1 <i>P. plurivora</i> – 8 <i>P. pini</i> – 2
Республика Дагестан	Дуб	50	-
Карачаево – Черкесская Республика	Бук, Ольха, Клен, Сирень, Каштан, Азалия, Калина	70	-
Итого:	10 видов растений	407	<i>P. citricola</i> – 3 <i>P. cactorum</i> – 2 <i>P. plurivora</i> – 8 <i>P. pini</i> – 2

* – в скольких образцах патоген был обнаружен

В городском парке г. Ессентуки основными породами являлись ель и каштан, произрастающие рядом. В образцах почвы от таких деревьев в результате лабораторной экспертизы была выявлена *Phytophthora pini* (таблица 2).

В ботаническом саду г. Ставрополь в образцах почвы, отобранных от усыхающих растений сирени, были найдены *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora plurivora* (таблица 2).

В результате мониторинга питомников и естественных насаждений было отобрано и проанализировано 720 образцов. В питомниках фитопфторозов выявлено не было. В естественных насаждениях было выделено и идентифицировано 4 вида *Phytophthora*: *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. plurivora* и *P. pini*.

Глава IV. Разработка и усовершенствование методов диагностики фитопфторозов древесных и кустарниковых растений

4.1. Изучение морфологических характеристик *P. ramorum*, *P. cactorum*, *P. cinnamomi*, *P. cryptogea*, *P. syringae* на различных питательных средах

При культивировании отобранных культур рода *Phytophthora* было выявлено, что наилучшими для роста всех патогенов являлись естественные среды: морковная (СРА) и овсяно-глюкозная (ОГА). Изучение культуральных признаков изолятов *P. ramorum* показало, что по характеру роста (фенотипу) на различных средах они отличались от других видов рода *Phytophthora*.

Обильное спороношение (зооспорангии) формировалось у *P. ramorum* и *P. cactorum* и умеренное – у *P. cinnamomi* только на естественных средах. На синтетической и полусинтетической средах (SNA и V8) у всех изученных видов грибов спороношение не отмечали.

4.2. Оптимизация методов выделения ДНК из зараженной растительной ткани.

Оценку эффективности методов выделения ДНК проводили с помощью классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени».

Наилучшими методами выделения ДНК для классической ПЦР являются метод Doyle и метод выделения ДНК с набором "М-Сорб-Туб"(таблица 3).

При постановке ПЦР «в реальном времени» наилучшими методами были Проба ГС, методика Doyle и набор "М-Сорб-Туб".

Таблица 3

Сравнение разных способов выделения ДНК

Вариант	Классический ПЦР		ПЦР в реальном времени, Ct		
	1	2	3	4	5
Проба ГС	-	-	24	21	29
Doyle	+	+	24	22	30
DPBS	-	-	31	28	N/A
"М-Сорб-Туб"	+	+	25	21	31

+ наличие продукта амплификации (положительный результат); - отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат); цифры – значения Ct (значение порогового цикла); 1 - классическая ПЦР с праймерами Phyto1/Phyto4; 2 - классическая ПЦР с праймерами PramF1/PramR1; 3 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190R, Pram1527-134T; 4 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом Pram5/Pram6, Pram7; 5 - ПЦР в реальном времени с праймерами и зондом - PramF/PramR, PramP

Дополнительную очистку ДНК следует проводить только при постановке классической ПЦР и в случае выделения ДНК набором Проба ГС. Для проведения ПЦР в реальном времени дополнительная очистка нецелесообразна (таблица 4).

Таблица 4

Использование неочищенной ДНК и ДНК, очищенной PVPP

Вариант	Проба ГС					Doyle					DPBS					"М-Сорб-Туб"				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Не очищ. ДНК	-	-	24	21	29	+	+	24	22	30	-	-	31	28	N/A	+	+	25	21	31
Очищ. PVPP	+	+	33	22	30	+	+	27	27	31	-	-	28	23	33	+	+	26	21	32

Наиболее оптимальной зоной для выделения ДНК является граница между здоровой и пораженной тканью. При использовании набора «М-Сорб Туб» можно использовать полностью некротизированную ткань (таблица 5).

Таблица 5

Влияние места отбора образца в зараженной биоприманке на достоверность диагностики *P. ramorum* методом ПЦР «в реальном времени»

	Проба ГС					Doyle					DPBS					"М-Сорб-Туб"				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ГР	-	-	24	21	29	+	+	24	22	30	-	-	31	28	N/A	+	+	25	21	31
Н	-	-	26	25	29	-	-	28	27	N/A	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	27	21	31

ГР - граница пораженной и здоровой ткани; Н – полностью некротизированная ткань;

При выделении ДНК из некротизированной ткани следует проводить очистку ДНК PVPP, особенно при постановке классической ПЦР (таблица 6).

Таблица 6

Использование неочищенной ДНК и ДНК, очищенной PVPP, выделенной из некроза

Вариант	Проба ГС					Doyle					DPBS					"М-Сорб-Туб"				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Без PVPP	-	-	26	25	29	-	-	28	27	N/A	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	27	21	31
С PVPP	+	+	26	23	29	+	+	28	26	33	-	-	N/A	N/A	N/A	+	+	25	21	31

4.3. Комбинирование методов биоприманок и ПЦР «в реальном времени» для выявления видов рода *Phytophthora*.

Выявление возбудителей фитофторозов древесных и кустарниковых растений в воде проводили путем закладки биоприманок в водоемы Московской области и г. Пятигорска (рисунок 1).



А. Биоприманки с листьями рододендрона



В. Некрозы на листьях рододендрона.



С. Образование мицелия на питательной среде

Рисунок 1. Метод Биоприманок для выявления видов рода *Phytophthora*

Для определения наиболее подходящих растений в качестве приманок использовали листья рододендрона, калины и сирени. На листьях калины и сирени некрозы не образовывались.

После проведения ПЦР и секвенирования образцов из Московской области был выявлен оомицет *Phytophthora litorale*. В озере Дубовом Московской области была выделена *Phytophthora megasperma*. Из водоёмов г. Пятигорска были идентифицированы и выделены в чистую культуру следующие виды оомицетов: *P. megasperma*, *P. polonica* и *P. gonapodyides* (таблица 7).

Таблица 7

Результаты применения метода биоприманок для выявления оомицетов рода *Phytophthora* в воде

Регион России	Растение - приманка	Кол-во приманок	Выявленный вид, количество случаев выявления
Московская область пруд на территории ФГБУ ВНИИКР	Калина	4	-
	Сирень	4	-
	Рододендрон	4	<i>Phytophthium litorale</i> - 3
Московская область озеро Дубовое	Рододендрон	2	<i>P. megasperma</i> - 2
Г. Пятигорск, 6 водоемов в черте города	Рододендрон	12	<i>P. megasperma</i> - 6 <i>P. gonapodyides</i> - 1 <i>P. polonica</i> - 1

4.4. Достоверность идентификации *P. ramorum* при использовании ранее разработанных методов классической ПЦР и ПЦР «в реальном времени».

Праймеры Phyto1/Phyto4 показывали положительный результат только с образцами *P. ramorum* (таблица 8).

При постановке классической ПЦР с праймерами PramF1/PramR1 были получены продукты для всех вариантов кроме 4 и 8 (таблица 8), т.е. эта пара праймеров показывала ложноположительные результаты.

Таблица 8

Специфичность ранее разработанных праймеров и зондов.

№	Виды <i>Phytophthora</i>	Праймеры			
		Phyto1 Phyto4	PramF1 PramR1	Pram114-FC Pram1527-190-R Pram 1527-134-T	Pram5 Pram6 Pram7
1.	<i>P. ramorum</i>	+	+	23,45	21,04
2.	<i>P. ramorum</i>	+	+	22,78	21,02
3.	<i>P. citricola</i>	-	+	36,83	N/A
4.	<i>P. megasperma</i>	-	-	N/A	N/A
5.	<i>P. syringae</i>	-	+	37,50	N/A
6.	<i>P. infestans</i>	-	+	36,54	N/A
7.	<i>P. cactorum</i>	-	+	36,69	N/A
8.	<i>P. cinnamomi</i>	-	-	36,32	N/A
9.	<i>P. cryptogea</i>	-	+	34,45	N/A
10.	<i>P. erythroseptica</i>	-	+	N/A	N/A

+ наличие продукта амплификации (положительный результат); - отсутствие продукта амплификации (отрицательный результат); N/A – отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат); цифры – значения *Ct* (значение треишход цикла)

При постановке ПЦР «в реальном времени» с праймерами и зондом Pram114-FC/Pram1527-190-R, Pram 1527-134-T наблюдались перекрестные реакции с другими видами фитопфтор.

Вторая пара праймеров Pram5, Pram6 и зонд Pram7 для ПЦР в реальном времени были специфичны к *P. ramorum* и не давали перекрёстных реакций с другими видами фитопфтор.

4.5. Разработка тест-систем для диагностики *P. ramorum* и близких видов с использованием ПЦР «в реальном времени».

4.5.1. Подбор праймеров и зондов.

Для подбора праймеров и зондов использовали нуклеотидные последовательности гена Ypt1 возбудителей фитопфторозов из базы данных GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), а также последовательности ДНК чистых культур *Phytophthora* sp. из коллекции ФГБУ «ВНИИКР».

На основании выровненных последовательностей были подобраны праймеры: PramF/PramR и меченый флуоресцентным красителем FAM зонд PramP, специфичные к *P. ramorum*.

Подбор универсальных праймеров для нескольких видов рода *Phytophthora* был основан на принципе комплементарности участков гена Ypt1 данных фитопфторозов (рисунок 2).

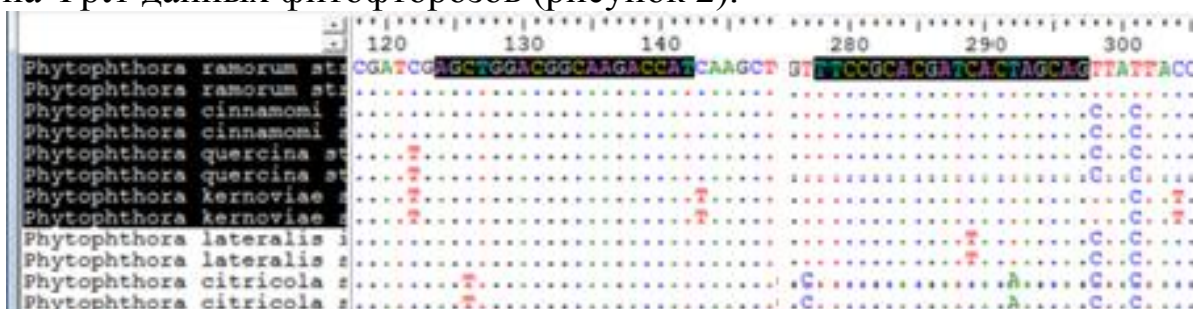


Рисунок 2. Подбор прямого и обратного праймеров для мультиплексной диагностики *Phytophthora* sp. в режиме реального времени.

Затем были подобраны зонды, специфичные для каждого вида возбудителя фитопфтороза: *P. ramorum*, *P. kernoviae*, *P. cinnamomi*, *P. quercina*, *P. citricola*, *P. lateralis* (рисунок 3).



Рисунок 3. Подбор специфичных зондов для диагностики видов *Phytophthora* в режиме реального времени.

На основе выровненных нуклеотидных последовательностей Ypt1 гена были подобраны два варианта праймеров и зондов MGB (Minor groove binder), меченых разными флуоресцентными красителями (FAM, VIC, NED).

4.5.2. Оптимизация ПЦР «в реальном времени».

Для оптимизации ПЦР «в реальном времени» были учтены следующие факторы: температура отжига каждого из зондов и его концентрация необходимая для реакции.

Определение оптимальных условий ПЦР «в реальном времени» для *P. ramorum* проводили изменяя следующие параметры: температуру отжига зонда (от 50°C до 68°C); концентрацию зонда (от 5 пМ до 15 пМ на реакцию, объемом 25 мкл). После проведения ПЦР определили, что наиболее подходящей является температура 51°C, а концентрация зонда от 10 до 15 пмоль на реакцию.

4.5.3. Определение специфичности ПЦР «в реальном времени» при диагностике *P. ramorum* и близких видов.

При определении специфичности зонда PramP установлено, что флуоресценция по красителю FAM (*P. ramorum*) регистрировалась только в образцах ДНК чистых культур этого возбудителя (таблица 9).

Таблица 9

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондом PramP (*P. ramorum*).

Краситель	ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)
FAM	<i>P. ramorum</i>	27,39
FAM	<i>P. ramorum</i>	28,70
FAM	<i>P. citricola</i>	N/A
FAM	<i>P. megasperma</i>	N/A
FAM	<i>P. syringae</i>	N/A
FAM	<i>P. infestans</i>	N/A
FAM	<i>P. cactorum</i>	N/A
FAM	<i>P. cinnamomi</i>	N/A
FAM	<i>P. cryptogea</i>	N/A
FAM	<i>P. erythroseptica</i>	N/A
FAM	<i>P. nicotiana</i>	N/A
FAM	<i>F. oxysporum</i>	N/A
FAM	<i>Pyt. intermedium</i>	N/A
FAM	вода	N/A

N/A – отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат) Цифры – значения Ct (значение трешхолд цикла)

При определении специфичности зондов PhytoYptRamP и Phyto2YptCitP установлено, что флуоресценция по красителю FAM (для *P. ramorum*) и HEX (для *P. citricola*) регистрировалась только в образцах ДНК чистых культур этих возбудителей.

При тестировании зондов PramP и Phyto2YptCitP в одной пробирке флуоресценция по красителю FAM - для *P. ramorum* и HEX – для *P. citricola* регистрировалась только в образцах с ДНК чистых культур этих возбудителей, даже если она находится в смеси (таблица 10).

Таблица 10

Специфичность ПЦР «в реальном времени» с зондами PramP и Phyto2YptCitP.

ДНК возбудителя	Пороговый цикл (Ct)	
	PramP	Phyto2YptCitP
Вода	N/A	N/A
Вода	N/A	N/A
<i>P. ramorum</i>	32,44	N/A
<i>P. ramorum</i>	31,50	N/A
<i>P. citricola</i>	N/A	29,33
<i>P. citricola</i>	N/A	32,29
<i>P. ramorum</i> + <i>P. citricola</i>	31,09	30,38
<i>P. ramorum</i> + <i>P. citricola</i>	36,65	29,16

N/A – отсутствие сигнала флуоресценции (отрицательный результат) \$ цифры – значения Ct (значение тришолд цикла); ■ - краситель FAM; ■ - краситель HEX.

ГЛАВА V. Изучение эффективности фунгицидов в отношении *P. ramorum*

5.1. Определение эффективности фунгицидов на питательной среде.

На питательной среде с препаратами Бордоская смесь (в концентрации 0,5% и более), Ридомил Голд (более 0,25%), Фарма йод (более 0,25%) и Танос (0,3%) рост культуры полностью отсутствовал. Препарат Превикур не оказал статистически достоверного влияния на рост колоний *P. ramorum*, Топаз и Браво достоверно замедляли рост колоний патогена, но не существенно (таблица 11). Скор слабо замедлял рост колоний, но имел обратную зависимость эффекта от концентрации: при концентрации препарата в среде 0,01% фунгистатический эффект был выражен сильнее, чем при концентрации 0,04%.

Таблица 11

Среднее значение диаметра колоний *P. ramorum* на 3-е, 5-е, 7-е и 10-е сутки инкубации.

Препарат, концентрация препарата		Среднее значение диаметра колоний из 5 повторностей, мм ± стандартное отклонение			
		3-е сутки	5-е сутки	7-е сутки	10-е сутки
Контроль		27,4 ± 2,1	35,4 ± 2,5	40,6 ± 2,5	55,8 ± 2,8
Бордоская смесь	2%	0	0	0	0
	1%	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0
Превикур	0.4%	22 ± 2	32,2 ± 1,96*	39,6 ± 1,5*	53,4 ± 2,2*
	0.2%	21 ± 1,9	28 ± 1,3	38,2 ± 1,5*	51 ± 2,45
	0.1%	18,4 ± 0,8	26,4 ± 0,7	34,8 ± 0,2	46,6 ± 2,6
Топаз	0,1%	-	12,2 ± 0,5	15,2 ± 1,07	16,4 ± 1,1
	0,05%	10 ± 0	15 ± 0,45	17,2 ± 0,8	22,6 ± 0,7
	0,025%	13,8 ± 0,5	18,8 ± 0,4	22,4 ± 0,7	32,8 ± 1,4
Скор	0,04%	16 ± 0,7	25 ± 0,8	31,6 ± 0,98	47,8 ± 0,97
	0,02%	14,8 ± 0,7	20,4 ± 0,7	25 ± 0,95	38,2 ± 1,7
	0,01%	11,8 ± 2,7	19,8 ± 0,6	24,8 ± 0,2	36 ± 1,3
Браво	1%	-	8,2 ± 2,1	11,6 ± 0,2	17,2 ± 1,3
	0,5%	9,2 ± 2,3	12 ± 0,3	12,8 ± 0,2	17,6 ± 0,5
	0,25%	6,6 ± 2,7	11,4 ± 0,25	13 ± 0,3	18 ± 0,45
Ридомил	1%	0	0	0	0
Голд	0,5%	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0
Фарма йод	1%	0	0	0	0
	0,5%	0	0	0	0
	0,25%	0	0	0	0
Танос	0,3%	0	0	0	0
	0,15%	0	0	10 ± 0,0	11 ± 0,0
	0,075%	10 ± 0,0	10 ± 0,0	11 ± 0,0	16 ± 0,45

“0” – означает отсутствие роста; *- ошибка более 0,05; % - концентрация препарата в среде

5.2. Определение эффективности фунгицидов на листьях.

Для определения эффективности исследуемых фунгицидных препаратов на листьях рододендрона отмечали степень развития некрозов на 5, 7, 9 и 12 сутки после инокуляции, оценивая их по 5-ти бальной шкале. Данные по степени развития некрозов приведены в таблице 12.

Таблица 12

Развитие некрозов на 5-е, 7-е, 9-е и 12-е сутки (в баллах)

Препарат, концентрация препарата		Размер некроза (баллы ^b) ± стандартное отклонение			
		5 сутки	7 сутки	9 сутки	12 сутки
Контроль		1,0 ± 0,6	1,3 ± 0,3	1,7 ± 0,3	2,7 ± 0,3
Танос	0,15%	0,0 ± 0*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,3
	0,3%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0
Скор	0,02%	1,0 ± 0,6*	1,0 ± 0,6*	1,0 ± 0,6*	1,3 ± 0,9
	0,04%	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	2,0 ± 0,6*
Бордоская смесь	1%	0,0 ± 0*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,3
	2%	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,3*	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,7
Фарма Йод	0,5%	0,3 ± 0,3*	1,3 ± 0,3*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*
	1%	1,0 ± 0*	1,3 ± 0,3*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*
Превикур	0,2%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
	0,4%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
Ридомил Голд	0,5%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0	0,0 ± 0
	1%	0,0 ± 0*	0,0 ± 0*	0,0 ± 0	0,0 ± 0
Браво	0,5%	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7
	1%	0,3 ± 0,2*	0,3 ± 0,3*	0,7 ± 0,7*	0,7 ± 0,7
Топаз	0,05%	0,7 ± 0,3*	0,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,7*	1,7 ± 0,9*
	0,1%	1,0 ± 0*	1,0 ± 0*	1,7 ± 0,3*	2,7 ± 0,3*

*- ошибка более 0,05; % - концентрация раствора препарата; Баллы: 0- отсутствие некрозов, 1- поражено от 1% до 25% листовой поверхности, 2- от 26% до 50%, 3- от 51% до 75%, 4 – от 76% до 100%.

Наибольшей фунгицидной эффективностью обладали препараты Ридомил Голд, который полностью подавлял развитие патогена в концентрации 0,5% и Танос, сильно подавлявший развитие *P. ramorum* в концентрации 0,15% и полностью – при 0,3%. Браво и Превикур во всех исследованных концентрациях оказывали ингибирующее действие на патогена, но не подавляли полностью его развитие. Бордоская смесь снижала развитие некрозов, но менее эффективно, чем предыдущие препараты. Фунгициды Скор, Топаз и Фарма йод не показали статистически достоверного подавляющего эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная работа показала, что возбудители фитофтороза в южных регионах России поражают такие хозяйственно важные породы, как дуб и каштан. Для предотвращения массового развития фитофторозов необходим постоянный мониторинг зеленых насаждений, уничтожение источников инфекции и контроль инфекции в привозном материале.

В результате данной работы разработаны праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени», протестированы на российских штаммах импортные диагностические системы, отработаны подходы к идентификации опасных возбудителей фитофторозов по морфолого-культуральным признакам. В целом, созданы методические подходы к проведению мониторинга фитофторозов в зеленых насаждениях, питомниках, посадочном материале.

Мы считаем, что мониторинг развития фитофторозов древесных растений должен быть продолжен; это единственно возможный путь избежать огромных потерь от массовой гибели самых ценных пород деревьев, как это уже было в некоторых странах мира.

ВЫВОДЫ

1. В результате мониторинга 19 питомников было отобрано и проанализировано 313 образцов вегетативных частей растений и почвы. В исследуемых образцах было выявлено 24 вида грибов; возбудителей фитофторозов выявлено не было. Также было проанализировано 407 проб из 24 лесопосадок в 3 южных областях России. Всего было выявлено 47 видов грибов, из них 4 вида фитопатогенных оомицетов рода *Phytophthora*: *P. cactorum*, *P. citricola*, *P. plurivora* и *P. pini*.

2. Подобраны праймеры и зонды для ПЦР «в реальном времени», которые позволяют идентифицировать *P. ramorum* и *P. citricola* как по отдельности, так и вместе в одной пробирке. Разработанные зонды не дают ложноположительных и ложноотрицательных результатов. Оптимальным местом в образце растительной ткани для выделения ДНК является зона между здоровой и некротизированной тканями. Наилучшими методами для выделения ДНК из растительной ткани являются метод Doyle и метод выделения ДНК на основе магнитных частиц.

3. Для выявления оомицетов рода *Phytophthora* в воде наиболее эффективным является метод биоприманок с последующим выделением на селективные питательные среды с антибиотиками. Применение листьев рододендрона в качестве биоприманок позволило выявить *P. gonapodyides*, *P. polonica*, *P. megasperma* и *Phytophythium litorale* в водоемах естественных насаждений.

4. Наиболее эффективными препаратами, подавляющими развитие патогена на листьях и в питательной среде, были Ридомил Голд МЦ и Танос. Бордоская смесь и Фарма-Йод полностью ингибировали рост патогена на питательной среде, но в опыте на листьях были

малоэффективны. Превикур, напротив, не оказывал ингибирующего действия на питательной среде, но был эффективен в опыте с листьями. Препарат Браво оказал среднее ингибирующее действие на развитие патогена на питательной среде и на листьях рододендрона. Скор и Топаз не оказывали подавляющего действия на *P. ramorum*.

НАУЧНО - ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные результаты могут быть использованы в фундаментальных научных и прикладных исследованиях в профильных лабораториях, отделах и институтах системы Российской академии наук.

Данные, полученные в ходе работы, могут использоваться при проведении фитосанитарных мониторингов древесных растений, а также для проведения карантинной лабораторной экспертизы растительного материала в ФГБУ ВНИИКР и могут быть рекомендованы для использования в других лабораторий и научно-исследовательских организациях. Кроме этого, они могут быть полезны Российским фирмам, разрабатывающим тест-системы для диагностики фитопатогенов.

Результаты оценки эффективности фунгицидов в отношении *P. ramorum* могут использоваться при планировании системы защиты растений от этого патогена, а также при разработке фитосанитарных мер в очагах заболевания. Также они могут быть использованы компаниями, занимающихся производством, регистрацией и реализацией пестицидов в РФ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах из перечня ВАК

Шероколава Н.А. Усыхание дуба в Орловской области / Шероколава Н.А., Сурина Т.А., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Александров И.Н. // Защита и карантин растений. - 2007. - №10. - С. 33-35.

Александров И.Н. Фитофтороз земляники / Александров И.Н., Скрипка О.В., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. // Защита и карантин растений. - 2007. - №5. - С. 32-34.

Сурина Т.А. Мониторинг на выявление фитофтороза древесных и кустарниковых растений / Сурина Т.А., Еланский С.Н., Мазурин Е.С. // Защита и карантин растений. - 2015. - №1. - С. 42-43.

Статьи в других периодических изданиях и сборниках

Александров И.Н. К вопросу об усыхании дуба на Русской Равнине / Александров И.Н., Сурина Т.А., Скрипка О.В., Дудченко И.П. // Международная организация по биологической борьбе с вредными животными и растениями. Бюллетень № 7. Пушкино, 2007. - С. 9-11.

Избранные тезисы и материалы конференций

Сурина Т.А. Диагностика возбудителей рода *Phytophthora* методом ПЦР «в реальном времени» / Сурина Т.А., Копина М. Б. // Современная микология России. Т3. Материалы 3-го Съезда микологов России. - 2012. - С. 318.

Скрипка О. В. Микробиоты посадочного материала сосны и дуба / Скрипка О. В. Сурина Т. А., Дудченко И. П., Никифоров С. В. // Материалы всероссийской научной конференции с международным участием «Роль ботанических садов и охраняемых природных территорий в изучении и сохранении разнообразия растений и грибов. 13-16 октября 2011г., Ярославль, 2011. - С. 97-99.

Шероколава Н.А. Патогенная микофлора древесных культур в Европейской части России / Шероколава Н.А., Скрипка О.В., Александров И.Н., Дудченко И.П., Сурина Т.А., Никифоров С.В. // Современная микология в России. Т.2 Тезисы докладов II съезда микологов России. - 2008. - С. 213.

Kopina M. Development molecular markers and probes for *P. ramorum*, *P. nicotianae*, *P. citricola*, *P. fragariae*, *P. cactorum* detection / Kopina M., **Surina T.** // The Sixth Meeting of the IUFRO Working Party 7-02-09. *Phytophthora* in Forests and Natural Ecosystems, Córdoba (Spain), 2012. – P. 94-95.

Surina T. A combination of baits and molecular genetic methods for detection and identification of *Phytophthora* spp / **Surina T.**, Kopina M., Mazurin E.S. // 10th International Congress of Plant Pathology, Beijing, 2013 P. - 288.