

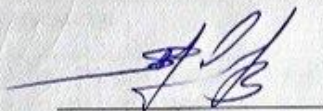
Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ  
ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МИКРОМИЦЕТОВ С РАСТЕНИЯМИ  
КАРТОФЕЛЯ

Обучающийся 2 курса  
группы 01–140–2



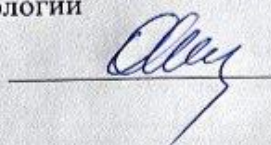
С.И. Холиков

Научный руководитель  
д-р биол. наук, профессор



А.М. Марданова

Заведующий кафедрой микробиологии  
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

Казань – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.2 <i>Fusarium</i> как возбудитель заболеваний растений.....	7
1.2.1 Фузариоз важных зерновых культур.....	8
1.2.2 Фузариоз картофеля.....	10
1.3 Патогеномика фузариоза.....	14
1.3.1 Факторы вирулентности микромицетов <i>Fusarium oxysporum</i> .....	14
1.3.2 Патогенез фузариоза.....	20
1.3.2 Взаимодействие микромицетов <i>Fusarium</i> с растениями.....	20
1.3.3 Молекулярные механизмы взаимодействия микромицетов <i>Fusarium</i> с растениями.....	22
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	26
2.1 Выделение чистых культур <i>Fusarium</i> sp.....	26
2.2 Анализ патогенности изолятов микромицетов в клубнях картофеля.....	27
2.3 Выделение нуклеиновых кислот.....	28
2.4 Молекулярно-генетическая идентификация изолятов.....	29
2.4.1 Выделение ДНК из мицелия.....	29
2.4.2 ПЦР-амплификация и секвенирование.....	29
2.4.2 ПЦР-амплификация и секвенирование.....	29
2.5 Анализ экспрессии SIX генов.....	30
2.6 Статистическая обработка результатов.....	31
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	32
3.1 Выделение из корневых шеек и клубней картофеля изолятов микромицетов рода <i>Fusarium</i> .....	32
3.2 Характеристика способности штаммов <i>Fusarium</i> вызывать сухую гниль клубней.....	34

3.3 Идентификация патогенных изолятов.....	37
3.4 Сравнительный анализ двух методов выделения тотальной ДНК из растительных тканей.....	39
3.5 Анализ экспрессии фузариозных генов вирулентности в тканях корневой шейки условно-здоровых и инфицированных растений картофеля.....	41
ВЫВОДЫ.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	45

## ВВЕДЕНИЕ

Микроскопические грибы играют огромную роль в росте, развитии и продуктивности растений [Babalola et al., 2020]. *Fusarium* – один из важнейших родов фитопатогенных грибов, приводящих к большим потерям урожая многих экономически важных сельскохозяйственных культур. Этот род занимает 5 место в десятке основных патогенов растений [Dean et al., 2012].

Картофель является основной незерновой продовольственной культурой, которую рассматривают как культуру для обеспечения продовольственной и пищевой безопасности в развивающихся странах [Scott et al., 2019]. Фузариоз картофеля распространен по всему миру и встречается везде, где он выращивается [Stevenson et al., 2001]. Фитопатогенные виды *Fusarium*, вызывающие увядание растений картофеля в поле и сухую фузариозную гниль клубней во время хранения, в настоящее время становятся глобальной угрозой при производстве картофеля [Tiwari et al., 2020 b]. 13 видов *Fusarium* считаются возбудителями сухой гнили картофеля, но видовой состав возбудителей зависит от географического региона и сезона [Cullen et al., 2005]. Фузариозное увядание картофеля – это сосудистое заболевание, вызываемое различными видами фузарий, включая *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi*, *Fusarium solani* и *Fusarium sambucinum* [Daami-Remadi et al., 2004]. Этот патоген поражает картофель через корни, а затем колонизирует сосуды ксилемы стеблей, вызывая некроз нижних листьев и одностороннее пожелтение листьев, хлороз, изменение цвета сосудов, задержку роста, увядание и в конечном итоге гибель [Kucharek et al., 2000].

В настоящее время доступны различные процедуры для быстрого обнаружения и борьбы с фитопатогенными грибами. С 1940 года для борьбы с ними обычно использовались химические и синтетические фунгициды. Однако существенное увеличение устойчивости грибов к фунгицидам в дополнение к негативным последствиям, вызываемым

синтетическими фунгицидами для здоровья животных, людей и окружающей среды, ставит перед учеными задачу поиска и разработки новых подходов и экологических стратегий борьбы с фитопатогенными грибами во всем мире [Antonieta, 2021]. Более того, помимо экологической опасности и токсического воздействия через продукты питания, фунгициды, используемые в сельском хозяйстве, приводят к распространению резистентности у опасных для человека видов грибов [Fisher et al., 2018].

Актуальной проблемой является выяснение роли разных таксонов грибов, в частности *Fusarium*, в физиологии и патологии картофеля, а также исследование структуры и закономерностей формирования грибных сообществ растений картофеля. Поскольку корни растений, растущих в почве, постоянно колонизируются различными штаммами *F. oxysporum*, обнаружение и количественная оценка вирулентных штаммов требует разработки высокоспецифических методов.

В связи с этим целью работы было выделение из растений картофеля штаммов микромицетов рода *Fusarium*, оценка их вирулентности, а также анализ экспрессии генов вирулентности фузарий в тканях картофеля.

Для достижения цели решились следующие задачи:

- 1) Выделение изолятов микромицетов рода *Fusarium* из корневых шеек и клубней условно-здоровых и инфицированных растений картофеля сорта Гала.
- 2) Анализ способности изолятов *Fusarium* sp. вызывать сухую гниль в клубнях сорта Жуковский ранний.
- 3) Молекулярно-генетическая идентификация вирулентных штаммов *Fusarium* sp.
- 4) Сравнительный анализ двух методов выделения тотальной ДНК из растительных тканей.
- 5) Оценка экспрессии генов вирулентности *Fusarium* в корневой шейке условно-здоровых и инфицированных растений картофеля.

## ВЫВОДЫ

1) Из корневых шеек и клубней условно-здоровых и растений с признаками фузариоза и клубней с симптомами сухой гнили выделены в чистую культуру 10 изолятов микромицетов *Fusarium* sp.

2) Выделенные изоляты *Fusarium* sp. различаются по способности вызывать сухую гниль в клубнях картофеля сорта Жуковский ранний. Высоковирулентные изоляты были выделены из клубня с сухой гнилью (5GKI), а также из условно-здоровых клубней картофеля (5GKH, 9GKH), что свидетельствует о возможной латентной инфекции клубней.

3) Молекулярно-генетическая идентификация по гомологии ITS участков высоковирулентных изолятов микромицетов позволила установить их принадлежность к виду *Fusarium oxysporum*.

4) Сравнительный анализ качества ДНК, выделенной из тканей растений картофеля, показал, что оптимальным является метод СТАБ.

5) Анализ экспрессии фузариозных Six-генов в тканях условно-здоровых и больных растений выявил различия в спектре и количестве экспрессирующихся генов вирулентности. В тканях картофеля с фузариозом обнаружена экспрессия 7 Six-генов, а в тканях условно-здоровых растений – 2 и 5 six-генов, что может свидетельствовать о латентной инфекции или наличие сапрофитных микромицетов.