

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

*На правах рукописи*

**КУТУЗОВА ИРИНА АЛЕКСЕЕВНА**

**ВНУТРИВИДОВАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ  
*COLLETOTRICHUM COCCODES* И *HELMINTHOSPORIUM SOLANI***

**03.02.03 - микробиология**

**03.02.12 - микология**

**АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Москва  
2018**

Работа выполнена на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова

**Научный руководитель:**

**Еланский Сергей Николаевич**  
доктор биологических наук.

**Официальные оппоненты:**

**Зейрук Владимир Николаевич,**  
доктор сельскохозяйственных наук, заведующий отделом защиты растений ВНИИ картофельного хозяйства имени А.Г. Лорха

**Ткаченко Олег Борисович,**  
доктор биологических наук, заведующий отделом защиты растений Главного ботанического сада РАН имени Цицина

**Смирнов Алексей Николаевич,**  
доктор биологических наук, профессор РГАУ МСХА имени К.А. Тимирязева

Защита диссертации состоится « 9 » октября 2018 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.08 при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, дом 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М-1. Тел: 8(495) 939-54-83, эл.почта: [npiskunkova@rambler.ru](mailto:npiskunkova@rambler.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА» <https://istina.msu.ru/dissertations/119317608/>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2018 года

Ученый секретарь  
диссертационного совета, к.б.н.

Пискункова Н.Ф.

## Актуальность

Картофель – одна из самых важных и распространенных сельскохозяйственных культур России, является одним из основных продуктов питания. Российская Федерация является третьим (после Китая и Индии) производителем картофеля в мире. Средняя урожайность (по всем хозяйствам на 2013 год) в России остается довольно низкая – около 14,5 т/га, в то время как в 10 крупнейших картофелеводческих хозяйствах она существенно выше – 30,7 т/га.

Одной из основных причин низкого урожая (наряду с низким качеством семенного материала, недостаточным внесением удобрений и развитием сорняков) является поражение растений фитопатогенными микроорганизмами. Основным методом борьбы с ними является химическая защита растений с помощью разнообразных пестицидов, которые применяются для обработки семенных клубней при посадке, растений в вегетационный период, перед закладкой на хранение и при хранении. Для грамотного планирования защитных мероприятий необходим мониторинг видового и штаммового состава фитопатогенного комплекса.

Серебристая парша, вызываемая грибом *Helminthosporium solani* Dur. et Mont. и антракноз, возбудителем которого является грибок *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) S. Hughes – опасные заболевания картофеля. На клубнях *C. coccodes* вызывает заболевание "черная пятнистость" ("black dot"), внешне очень похожее на серебристую паршу. Эти заболевания, вызывающие существенное снижение качества столового и семенного картофеля и потери при хранении, в последние годы получили широкое распространение.

Возбудитель серебристой парши *H. solani* поражает клубни в период вегетации и при хранении. Кожура клубней покрывается легко стирающимся темным налетом, расслаивается, что приводит к иссушиванию клубней. При сильном поражении почки клубня отмирают и всходы не образуются. *H. solani* может перезимовывать на зараженных клубнях при хранении, конидии могут длительное время сохраняться в почве.

*C. coccodes* поражает не только клубни, но и листья, стебли и другие органы картофеля. Он может встречаться и на других растениях, например, на томате. Поражение плодов томата антракнозом вызывает высокие потери. Данных о генотипической структуре популяций *C. coccodes* на листьях и стеблях картофеля и томата крайне мало; информации о проведенных сравнительных исследованиях штаммов, выделенных с разных органов картофеля и с разных растений-хозяев нам найти не удалось.

Таким образом, хотя возбудители серебристой парши и черной пятнистости широко распространены на территории России, они практически не изучены. Очень мало данных о структуре популяций, устойчивости к фунгицидам, возможности перезаражения между близлежащими посадками картофеля и томата.

**Цель работы:** изучение внутривидового разнообразия фитопатогенных грибов *H. solani* и *C. coccodes*.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Выделение изолятов *H. solani* и *C. coccodes* из пораженных органов картофеля и томата из различных регионов России и из импортированного семенного картофеля.

2. Оценка разнообразия выделенных с картофеля (*Solanum tuberosum* L.) и томата (*Solanum lycopersicum* L.) штаммов *C. coccodes* различного географического происхождения и разной органотропной специализации по структуре участков ДНК и морфологическим признакам.

3. Оценка внутривидового разнообразия *H. solani* по участку ДНК ITS1-5,8S-ITS2.

4. Сравнительное изучение роста и микроморфологии штаммов *C. coccodes* разного происхождения при разных температурных режимах.

5. Изучение устойчивости коллекционных изолятов *H. solani* и *C. coccodes* к фунгицидам, применяемым для обработки клубней картофеля.

#### **Научная новизна исследований.**

Впервые на основании определения структуры четырех участков ДНК (ITS1-5,8S-ITS2, глутамин-синтетаза, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, актина) и анализа биологических свойств (скорость роста на разных средах и при разных температурах, устойчивость к некоторым популярным фунгицидам) проведено исследование внутривидового разнообразия штаммов *C. coccodes*, выделенных с клубней картофеля, привезенных из разных регионов России и из импортированного из Германии и Нидерландов семенных клубней. Впервые в мире на основании анализа участков ДНК (см. выше) проведен сравнительный анализ штаммов, выделенных из клубней, листьев, стеблей картофеля и плодов томата.

Впервые исследовано внутривидовое разнообразие *H. solani* на примере штаммов, собранных в разных регионах России и выделенных из импортированных семенных клубней. Показано отсутствие варибельности по участку ДНК ITS1-5,8S-ITS2.

#### **Практическая значимость работы.**

Впервые в России проведен анализ устойчивости штаммов *H. solani* и *C. coccodes* к некоторым популярным фунгицидам, используемым для обработки клубней при закладке на хранение, во время хранения и перед посадкой. Показано, что устойчивость *H. solani* к тиабендазолу вызывается теми же мутациями гена  $\beta$ -тубулина, что и у европейских и североамериканских штаммов. Устойчивые штаммы выявлены среди выделенных в разных регионах России и из голландского семенного картофеля. Показано, что идентификация устойчивых к тиабендазолу штаммов может проводиться по структуре генома.

Отработана методика быстрой идентификации *H. solani* и *C. coccodes* с помощью видоспецифичных ПЦР-праймеров.

Результаты работы могут быть использованы в планировании мероприятий по защите картофеля и томата от фитопатогенных грибов при посадке (обработка

семенного материала), в течение вегетации, хранения и при предреализационной подготовке. Материалы диссертации могут быть использованы при чтении курсов по фитопатологии, защите растений, технологии хранения плодов и овощей в учебных организациях биологического и сельскохозяйственного профиля.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Исследование четырех последовательностей ДНК (ITS1-5,8S-ITS2, глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, актина) показали низкую вариабельность среди выделенных с картофеля штаммов *C. coccodes*. Не выявлено дивергенции популяций ни по регионам выделения, ни по органам картофеля (листья, стебли, клубни).
2. Штаммы, выделенные с томата, отличались от выделенных с картофеля по структуре проанализированных участков глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, актина, но не отличались по последовательностям ITS1-5,8S-ITS2.
3. Штаммы *H. solani* отличались крайне низкой вариабельностью. Последовательности участка ядерных рибосомных генов ITS1-5,8S-ITS2 были абсолютно одинаковыми и типичными для вида у всех исследованных штаммов.
4. Результаты изучения скоростей роста штаммов *C. coccodes* показывают, что лучше всего все изоляты росли при температуре +24°C, несколько медленнее – при +15°C. При обеих температурах все штаммы росли практически одинаково; существенной разницы в скоростях роста не выявлено. В экстремальных условиях (+5 и +33 °C) они росли значительно медленнее, при этом отмечена высокая разница в скоростях между штаммами. Вариабельности по морфологическим параметрам среди штаммов, различающихся по географическому происхождению и органотропной специализации, не выявлено.
5. Высокой фунгицидной или фунгистатической эффективностью в отношении обоих исследованных видов грибов при тесте на агаризованной питательной среде отличались фунгициды дифенконазол и коллоидное серебро. Не было выявлено штаммов, устойчивых к этим фунгицидам. Тиабендазол также отличался высокой эффективностью, однако среди *H. solani* были выявлены устойчивые штаммы. Флудиоксонил сильно ингибировал рост *C. coccodes* на начальном этапе, но при длительном культивировании на среде с флудиоксонилем гриб образовывал устойчивые сектора, причем при дальнейших пассажах на питательной среде с этим фунгицидом устойчивость сохранялась. Пенцикурон оказался неэффективным в отношении обоих исследованных видов. Азоксистробин показал достаточно хорошую эффективность в отношении всех исследованных штаммов *C. coccodes*; штаммы *H. solani* отличались вариабельностью в отношении этого фунгицида, был выявлен ряд устойчивых штаммов.
6. Обнаружены устойчивые к тиабендазолу штаммы *H. solani*. Все высокоустойчивые штаммы имели однонуклеотидные мутации гена  $\beta$ -тубулина, аналогичные мутациям, выявленным у европейских и североамериканских устойчивых штаммов.

### **Связь работы с государственными программами**

Работа по сбору, выделению и анализу образцов *S. coccoodes* частично была поддержана грантом РФФИ № 15-29-02512 офи\_м; секвенирование образцов выполнялось при частичной поддержке гранта РНФ №14-50-00029.

### **Апробация работы.**

Результаты диссертационной работы были доложены на 7 научных мероприятиях: 6 межрегиональной научно-практической конференции "Современная индустрия картофеля: состояние и перспективы развития" (Чебоксары, 2014); Третьем Международном Микологическом Форуме (Москва, 2015); 2 Всероссийской научной конференции с международным участием "Современное состояние, проблемы и перспективы развития агропромышленного комплекса" (Крым, г. Симферополь, 2016), Четвёртом съезде микологов России (Москва, 2017, три доклада), а также на Совещании экспертов Евросоюза по листовым болезням картофеля Euroblight 2017 (Орхус, Дания), Международной научно-практической конференции Современные проблемы и достижения в защите картофеля от болезней, вредителей и сорняков (Московская обл., 2018), 22 международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов 2015" (Москва, 2015).

### **Публикации.**

По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в журналах, входящих в базы WoS и Scopus, 2 статьи в журналах, входящих в ядро РИНЦ (RSCI), 8 – в других периодических изданиях и сборниках.

**Личный вклад автора** заключается в проведении экспериментальных исследований, результаты которых получены исключительно самим автором или при его непосредственном участии. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

### **Благодарности**

Научному руководителю **Еланскому С.Н.** за идейное вдохновение, постоянную поддержку, консультации и помощь в работе; коллегам по работе: **Кокаевой Л.Ю.** за помощь в освоении методов молекулярной диагностики; **Чудиновой Е.М.** за помощь в анализе результатов молекулярно-генетических исследований, **Побединской М.А.** за советы и помощь в проведении лабораторных экспериментов; **Александровой А.В.** за советы и помощь в морфологических исследованиях; сотрудникам кафедры Микологии и Альгологии за моральную поддержку и помощь в работе.

### **Структура и объем диссертации.**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части (разделы материалы и методы, результаты и обсуждение), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Материал изложен на 140 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц и 36 рисунков. Список литературы включает 121 источник, в том числе 85 печатных работ иностранных авторов.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** приведены актуальность темы проводимых исследований, сформулированы цель и задачи работы, научная новизна, научная и практическая значимость, апробация работы, данные о структуре и объеме диссертации. Представлены основные положения работы, выносимые на защиту.

### Часть 1. Обзор литературы.

В обзоре литературы приведена информация о заболеваниях картофеля и томата, вызываемых грибами *S. coccoodes* и *H. solani*. Детально рассмотрены симптомы заболеваний, источники первичной инфекции, культурально-морфологические признаки возбудителей, распространенность и жизненный цикл. Отдельный раздел посвящен борьбе с заболеваниями картофеля, причем особое внимание уделено химическому методу вообще и используемым химическим препаратам в частности.

### Часть 2. Материалы и методы.

Для **выделения чистых культур** фитопатогенных микроорганизмов пораженные части растений закладывали во влажные камеры. После появления спороношения на поверхности пораженного органа его микроскопировали под бинокулярным микроскопом и остро заточенной стерильной препаровальной иглой переносили конидии, характерные для *H. solani*, или микросклероции (при выделении *S. coccoodes*) на агаризованную среду на основе пивного суслу или агаризованную овсяную среду с добавлением пенициллина (бензилпенициллина натриевая соль 1000 ед/мл).

Одной из задач настоящей работы **был сбор коллекции штаммов *H. solani* и *S. coccoodes***. На данный момент собрана коллекция, содержащая 225 штаммов *H. solani*. Штаммы были выделены с клубней картофеля, собранных в 2013-2017 годах в Московской, Костромской, Брянской, Магаданской и Владимирской областях, а также в республике Чувашия. Кроме того, в коллекции присутствуют изоляты, выделенные из клубней, привезенных из двух регионов Германии (Брезен и Бад Швартау) и из Голландии. Видовая принадлежность коллекционных изолятов определялась по культурально-морфологическим признакам и подтверждалась ПЦР идентификацией с видоспецифичными праймерами Hs1NF1/ Hs2NR1 (5'-GAACCCTGTGTACCTGTA / 5'-ACGAGAAGCTGGCACGACCG, температура отжига 62°C).

Штаммы *S. coccoodes* были выделены из клубней с симптомами поражения черной пятнистостью, привезенных 2013-2017 годах из Костромской, Владимирской, Московской областей, а также из двух регионов Германии (Брезен и Бад Швартау). В 2014 и 2016 годах были выделены изоляты из листьев картофеля, привезенных из Марий Эл; в 2015 – из стеблей необрабатываемого фунгицидами картофеля, выросшего на тестовом поле ВНИИ фитопатологии. В 2017 году нам удалось выделить изоляты из пораженных плодов томата, выросших на поле в Краснодарском крае. На данный момент коллекция представлена 64

изолятами *S. coccodes*. Видовая принадлежность коллекционных изолятов определялась по культурально-морфологическим признакам и подтверждалась ПЦР идентификацией с видоспецифичными праймерами Cc1NF1/Cc2NR1 (5'-TGCCGCTGCGGACCCCCCT / 5'-GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA, 62°C).

В работе по изучению внутривидового разнообразия и оценке устойчивости к фунгицидам были протестированы 27 штаммов *H. solani*, выделенные из пораженных клубней, собранных в Московской, Брянской, Костромской областях, в республике Чувашия, а также из импортированных из Нидерландов и Германии семенных клубней. У 26 штаммов определены последовательности нуклеотидов участка ДНК ITS1-5,8S-ITS2 (праймеры ITS5/ITS4, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG/ 5'-TCCTCCGCTTATTGATA-TGC, 58°C); у 17 штаммов – гена β-тубулина (SS-f/SS-r, 5'-AGCATA-GGCTGATGCTCGT/ 5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA, 57°C); 22 изолята *H. solani* протестированы на устойчивость к фунгицидам тиабендазол (препарат Текто), дифеноконазол (Скор), азоксистробин (Квадрис), коллоидное серебро (Зерокс).

Оценка скорости роста при разных температурах проведена у 17 изолятов *S. coccodes*, микроморфология исследована у 11 штаммов, у 51 определена структура маркерных последовательностей ДНК: генов глутамин-синтетазы (праймеры GSF1/GSR1, 5'-ATGGCCGAGTACATCTGG/ 5'-GAACCGTCGAAGTTCCAC, 55°C), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GDF-1/GDR-1, 5'-GCCGTCA-ACGACCCCTTCATTGA/ 5'-GGGTGGAGTCGT-ACTTGAGCATGT, 59°C), актина (ACT-512F/ ACT-783R, 5'-ATGTGCAA-GGCCGGTTTCGC/ 5'-TACGAGT-CCTTCTGGCCCAT, 54°C), участка ITS1-5,8S-ITS2 (ITS5-ITS4, см. выше). На устойчивость к фунгицидам дифеноконазол (препарат Скор), азоксистробин (Квадрис), флудиоксанил (Максим), пенцикурон + имидаклоприд (Престиж), тиабендазол (Текто), коллоидное серебро (Зерокс) протестированы 44 изолята *S. coccodes*.

**Выделение ДНК** проводили, как описано в Kutuzova et al., 2017. Измельченный в жидком азоте мицелий лизировали в СТАВ-буфере, после чего белки удаляли с помощью хлороформа, ДНК высаживали с ацетатом калия в изопропанол, очищали 70%-м этанолом. Хранили ДНК в деионизованной воде при – 20°C.

**Полимеразную цепную реакцию (ПЦР)** проводили при помощи амплификатора «Biometra T1». Для проведения ПЦР использовали микропробирки на 250 мкл. Для всех амплификаций, кроме ITS5/ITS4, использовали программу 94°C-5', далее 30 циклов (94°C-30", темп. отжига - 30", 72°C-45") и финальная элонгация 72°C-3'. При работе с праймерами ITS5/ITS4 продолжительность фаз цикла увеличивали: 94°C-40", (темп. отжига) - 40", 72°C-60". Для проведения ПЦР использовали микропробирки на 250 мкл; объем реакционной смеси во всех случаях составлял 25 мкл (табл. 1).



Таблица 1. Состав ПЦР-смеси.

Компонент смеси	Количество на одну пробирку (мкл)	Финальная концентрация
10x PCR buffer (поставляется в наборе с Taq-полимеразой «Helicon»)	2,5	1x
25mM Mg <sup>2</sup> (входит в состав буфера)	2	2,0 mM
Taq-полимераза, 5U/ml	0,5	
dNTP mix	0,5	0,2 mM каждого dNTP
Праймер 1	0,4	1 μM
Праймер 2	0,4	1 μM
Деионизированная вода	19,5	
Раствор ДНК	1	4 нг/мкл
Общий объем реакционной смеси	25	

Все полученные ПЦР-продукты разделяли электрофоретически в 1,2% агарозном геле в Tris-борат-ЭДТА (ТВЕ) буфере. Гели анализировали на трансиллюминаторе при УФ свете (310 нм). После электрофореза из геля вырезали и очищали с использованием наборов «Евроген» и «Цитокин» ампликоны, которые впоследствии передавали на секвенирование. Секвенирование проводила компания «Евроген» при помощи автоматического сиквенатора ДНК AppliedBiosystems 3730 xl с набором реактивов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing. В процессе секвенирования использовали те же праймеры, что и при амплификации исследуемого участка. Каждую последовательность читали 2 раза – с прямого и обратного праймеров.

Для определения **устойчивости к фунгицидам** использовали агаризованную среду на основе пивного суслу с добавлением фунгицида в концентрациях 0,1; 1,0; 10,0; 100,0 мг/л по действующему веществу. Штаммы *H. solani*, показавшие устойчивость к тиабендазолу, тестировали также и при концентрации последнего в среде 1000 мг/л. Посев производили агаровым блоком (4x4 мм), содержащим мицелий, в середину чашки. Агаровый блок брали с нарощенного мицелиального газона (другой чашки Петри). Посев проводили на среду без фунгицида (контроль) и на среду с фунгицидом, причем каждую концентрацию и контроль сажали в трех повторностях. Далее инкубировали при комнатной температуре 22-24°C. Учет диаметров колоний проводили в момент, когда диаметр контроля достигал 75% чашки Петри (для *S. coccodes*) или 50% (для *H. solani*). Данные повторностей для каждого изолята усредняли. Показатели ЕС<sub>50</sub> и ЕС<sub>90</sub> определяли для каждого изолята в отдельности. ЕС<sub>50</sub> – это та концентрация фунгицида, которая замедляет скорость радиального роста колонии в 2 раза по сравнению с контролем; ЕС<sub>90</sub> – концентрация, подавляющая рост колонии на 90%.

**Изучение морфологических признаков и скорости роста штаммов *S. coccodes*.** Исследования скорости роста и морфологических признаков штаммов

*C. coccodes* проводили на двух средах: сусло-агар и PDA. Исследуемые штаммы высевали в чашки Петри на агаризованную питательную среду в трех повторностях, далее инкубировали в термостате при температуре 24°C. Для учета скорости роста производили замер взаимно перпендикулярных диаметров всех исследуемых колоний на 5, 7 и 9 сутки, данные повторностей на каждом сроке усредняли. При микроморфологическом анализе учитывались длина и ширина склероциев, длина щетинок (придатки склероциев), длина и ширина основного и дополнительного типов спор. Измерения проводили с помощью светового микроскопа Микмед-6 фирмы Ломо, визуализация осуществлялась с помощью камер Digital camera for microscope DCM500.

Полученные данные были обработаны стандартными статистическими методами программы Excel, выравнивание последовательностей проводили с использованием программы Mega 5.

### **ЧАСТЬ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

#### **3.1. Внутривидовое разнообразие *C. coccodes*.**

##### **3.1.1. Морфология**

Были полученные данные о скорости роста, морфологии колоний и микроморфологии штаммов *C. coccodes* на двух типах стандартизованных сред – сусло-агар и PDA. На сусло-агаре была также исследована скорость роста выбранных штаммов в зависимости от температуры.

##### **Морфология на PDA.**

Всего было проанализировано 55 штаммов *C. coccodes*, выделенных из различных регионов России и из Германии. На 12 сутки роста все проанализированные штаммы были разделены на 4 морфологические группы исходя из внешнего вида и особенностей роста колоний. К группе А относились черные колонии, сморщенные почти по всей площади (высокая плотность склероциев) или с концентрическими чередованиями склероциев разной плотности, для которых был характерен быстрый рост. К группе В относились черные колонии с равномерным распределением склероциев или с уплотнением только в центре (средняя плотность склероциев заметно меньше, чем в А), для которых также характерен быстрый рост. Группа С была представлена серыми колониями (преобладание воздушного мицелия), практически не образующими склероциев, со средней скоростью роста. Группа D – черные колонии, с плотностью склероциев как в группе В, но образующие сектора с меньшей плотностью склероциев, со средней скоростью роста.

Как видно из таблицы 2, преобладающей морфологической группой для штаммов Московской и Костромской областей является группа А. Штаммы Владимирской области и Республики Марий-Эл наряду со штаммами из Германии преимущественно относят к морфологической группе В. Все четыре морфологические группы представлены только в Московской области и Германии, тогда как набор различных морфогрупп среди штаммов других изученных

регионов ограничен одной-двумя группами. Во Владимирской области и Республике Мари-Эл это может быть связано с небольшой выборкой, но в Костромской области количество изученных штаммов было самым большим.

Таблица 2. Морфология штаммов *C. coccodes* на PDA.

Регион	Количество штаммов, у которых описана макроморфология	Количество штаммов, у которых описана микроморфология	Морфогруппы			
			A	B	C	D
Московская обл.	8	8	<b>4*</b>	1	1	2
Костромская обл.	21	3	<b>19*</b>	2	0	0
Владимирская обл.	4	2	0	<b>3*</b>	0	1
Респ. Марий-Эл	3	3	0	<b>3*</b>	0	0
Германия	19	11	3	<b>10*</b>	3	3
<b>Итого</b>	<b>55</b>	<b>27</b>	<b>26</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>6</b>

Прим.: \* - выделена доминирующая морфологическая группа для каждого региона

Для 27 штаммов (отбирали, по возможности, равное количество из каждой группы с учетом происхождения штаммов) было проведено исследование микроморфологии (табл. 3). В данном анализе учитывали длину и ширину склероциев, длину щетинок (придатки склероциев), а также длину и ширину конидий, сформированных в конидиомах (основной тип спор), а также наличие и размеры дополнительного типа спор.

В трех морфологических группах склероции всех штаммов имели примерно одинаковые размеры (с учетом стандартного отклонения), тогда как в группе С склероции отличались достоверно (с учетом стандартного отклонения) меньшими размерами. Также практически у всех (за исключением одного) штаммов группы С отсутствовали щетинки склероциев.

Различия между штаммами разных групп прослеживается также в размерах как основного, так и дополнительного типов спор (табл. 2). Штаммы групп А и С имеют средние размеры основных спор 17,6\*4,4 мкм и 17,3\*4,3 мкм, а дополнительных – 11,3\*4,7 мкм и 11,6\*4,2 мкм соответственно. Группы В и D представлены штаммами, имеющими средние размеры основных спор 19,1\*4,4 мкм и 19,7\*4,2 мкм, а дополнительных – 13,4\*4,7 мкм и 13,2\*4,5 мкм соответственно. Однако, с учетом стандартного отклонения, все четыре морфологические группы следует считать однородными.

Штаммы, выделенные с листьев и стеблей, обладали большей макро- и микроморфологической однородностью по сравнению со штаммами из кожуры клубней. Среди данных штаммов не было выявлено принадлежности к морфологической группе С, которая характеризуется преобладанием воздушного мицелия и слабой тенденцией к образованию склероциев.

Таблица 3. Микроморфология коллекционных штаммов *C. coccodes*.

Морфо- группа	Количество штаммов	Оценка микро- морфо- логии	Склероции, мкм		Щетинки, мкм	
			Длина	Ширина	Наличие	Длина
<b>A</b>	26	8	292,0±32,3	192,2±25,7	7	130,4±30,2
<b>B</b>	19	9	289,2±51,5	204,2±36,4	9	172,5±134,6
<b>C</b>	4	4	178,3±43,7	125,8±37,2	1	<b>208,5</b>
<b>D</b>	6	6	256,9±25,9	176,2±45,8	6	119,6±21,4

Таблица 3 (продолжение).

Морфо- группа	Споры основные, мкм		Споры дополнительные, мкм			Средние диаметры колоний на 10 сутки, мм
	Длина	Ширина	Налич ие	Длина	Ширина	
<b>A</b>	17,6±3,4	4,4±0,3	3	11,3±0,4	4,7±0,2	80,7±1,9
<b>B</b>	19,1±3,1	4,4±0,6	5	13,4±2,1	4,7±0,6	77,3±4,9
<b>C</b>	17,3±3,2	4,3±0,2	3	11,6±0,4	4,2±0,3	80,4±2,4
<b>D</b>	19,7±1,9	4,2±0,3	5	13,2±1,2	4,5±0,2	78,6±2,8

**Сравнительный анализ скоростей роста штаммов *C. coccodes*** при температурах 5, 15, 24 и 33 °С проводили на среде сусло-агар (рис.1).

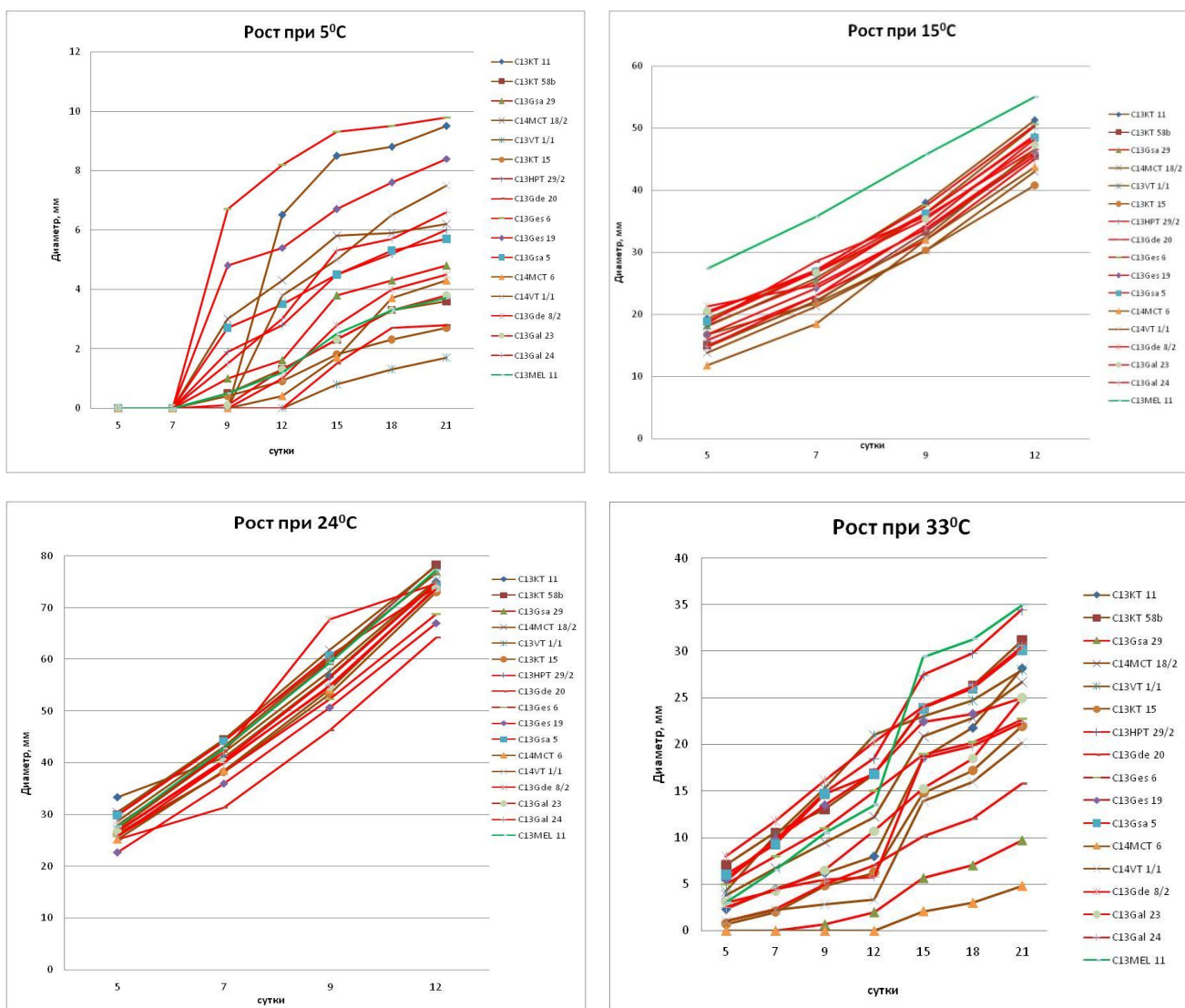
Рост при +5°С имеет большое практическое значение, т.к. при близких температурах происходит хранение клубней картофеля. При температуре 5°С рост большинства штаммов начинался только на 7 сутки, однако мицелий некоторых штаммов не переходил на среду вплоть до 12 суток изучения. Диаметры колоний всех штаммов не превышали 10 мм на 21 сутки измерений. Однако важно отметить значительные различие в росте изолятов между собой: разброс значений итоговых диаметров от 1,7 до 9,5 мм. Изолят, выделенный с листа, показал средние значения скорости радиального прироста колонии.

При температуре +15°С уже на 5 сутки (1 измерение) диаметры колоний всех исследуемых штаммов превышали 12 мм. На 12-е сутки диаметры колоний составили от 40 до 55 мм. Примечательно, что наибольшим диаметром и скоростью роста отличался листовая штамм (на графике обозначен зеленым). Все клубневые изоляты имели близкие исследуемые показатели, вне зависимости от региона выделения.

При температуре 24°С наблюдалась максимальная скорость роста всех штаммов. На 5 сутки (1 измерение) диаметры колоний всех исследуемых штаммов

превышали 22 мм. На 12 сутки диаметры колоний составили от 65 до 78 мм. При этой температуре рост изолята из листа не выделялся на фоне клубневых изолятов.

При температуре 33°C, являющейся экстремально высокой для данного фитопатогена, скорость роста и диаметры колоний всё же были больше, чем при экстремально низкой температуре 5°C. Как можно видеть, штамм с листа заметно выделяется на фоне клубневых изолятов, делая резкий скачок в росте и достигая максимального среди других штаммов диаметра к 15-м суткам измерений. Однако при +33°C, как и при 5°C, изоляты имели значительный разброс значений – итоговые диаметры составили от 4,8 до 35 мм.



**Рис. 1. Рост штаммов *C. coccodes* при разных температурах культивирования**

Результаты изучения скоростей роста показывают, что лучше всего все изоляты росли при температуре +24 °С, несколько медленнее – при +15 °С. При обеих температурах все штаммы росли практически одинаково; существенной

разницы в скоростях роста не выявлено. В экстремальных условиях (+5 и +33 °С) штаммы росли значительно медленнее и при этом отмечена высокая разница в скоростях роста разных штаммов.

### **3.1.2. Внутривидовое разнообразие по структуре последовательностей ДНК**

В работе изучены последовательности нуклеотидов участков ДНК, используемых для выявления видовой принадлежности и внутривидовой вариабельности *S. coccoodes*: ITS1-5,8S-ITS2 (далее – ITS), генов актина, глицеральдегид-3-фосфат дегид-рогеназы (GD), глутамин-синтетазы (GS).

#### Актин

Последовательности актина определены у 44 штаммов, выделенных из картофеля (2 из листьев, 4 из стеблей, остальные – из клубней) и 2 штаммов из плода томата. По результатам секвенирования внутривидовой вариабельности у исследованных штаммов *S. coccoodes*, выделенных из картофеля, обнаружено не было: все последовательности 44 картофельных штаммов по гену актина были одинаковыми (сиквенс депонирован в Genbank под номером KY496631) и совпали с имеющимся в Genbank сиквенсом HM171667 (изолят CBS 369.75, Liu et al., 2013). Штаммы, выделенные из плода томата, были одинаковыми между собой, но отличались от картофельных заменой двух нуклеотидов.

#### ITS

По последовательности нуклеотидов участка ITS1-5,8S-ITS2 были исследованы 44 штамма. Они разделились на две группы: первая включала штаммы, выделенные со всех трех типов субстрата (клубневые, листовые и стеблевые), а также изоляты из томата, тогда как вторая группа содержала только клубневые изоляты из Германии. Разница между кластерами составляла один нуклеотид. Штаммы одной из групп (сиквенс изолята C16MEL 7 депонирован в Genbank под номером KY496632) полностью совпадали с сиквенсом HM171678 (изолят CBS 164.49, Liu et al., 2013), сиквенс штамма представителя другой группы (C13Gde 20) депонирован под номером KY496633.

#### Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы

Исследованные последовательности нуклеотидов гена глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы 47 штаммов с картофеля (5-стебли, 3 – листья, остальные – клубни) разделились на 2 группы, различающиеся 2-мя нуклеотидами. В Genbank депонированы сиквенсы представителей обеих групп: KY496634 (изолят C16MEL 3) и KY496635 (изолят C16MEL 7). Каждая группа включала в себя как изоляты из России и Германии, так и штаммы, выделенные с листьев и стеблей картофеля. Оба сиквенса полностью совпали с имеющимися в Genbank: один – с последовательностью JX546727 (изолят CBS 125.57), а второй – с HM171672 (изолят CBS 164.49) (Liu et al., 2013). Томатные отличались от картофельных заменой 6-ти нуклеотидов; они оказались идентичны ранее выделенным в Корею изолятам из женьшеня GU935856 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GU935856>).

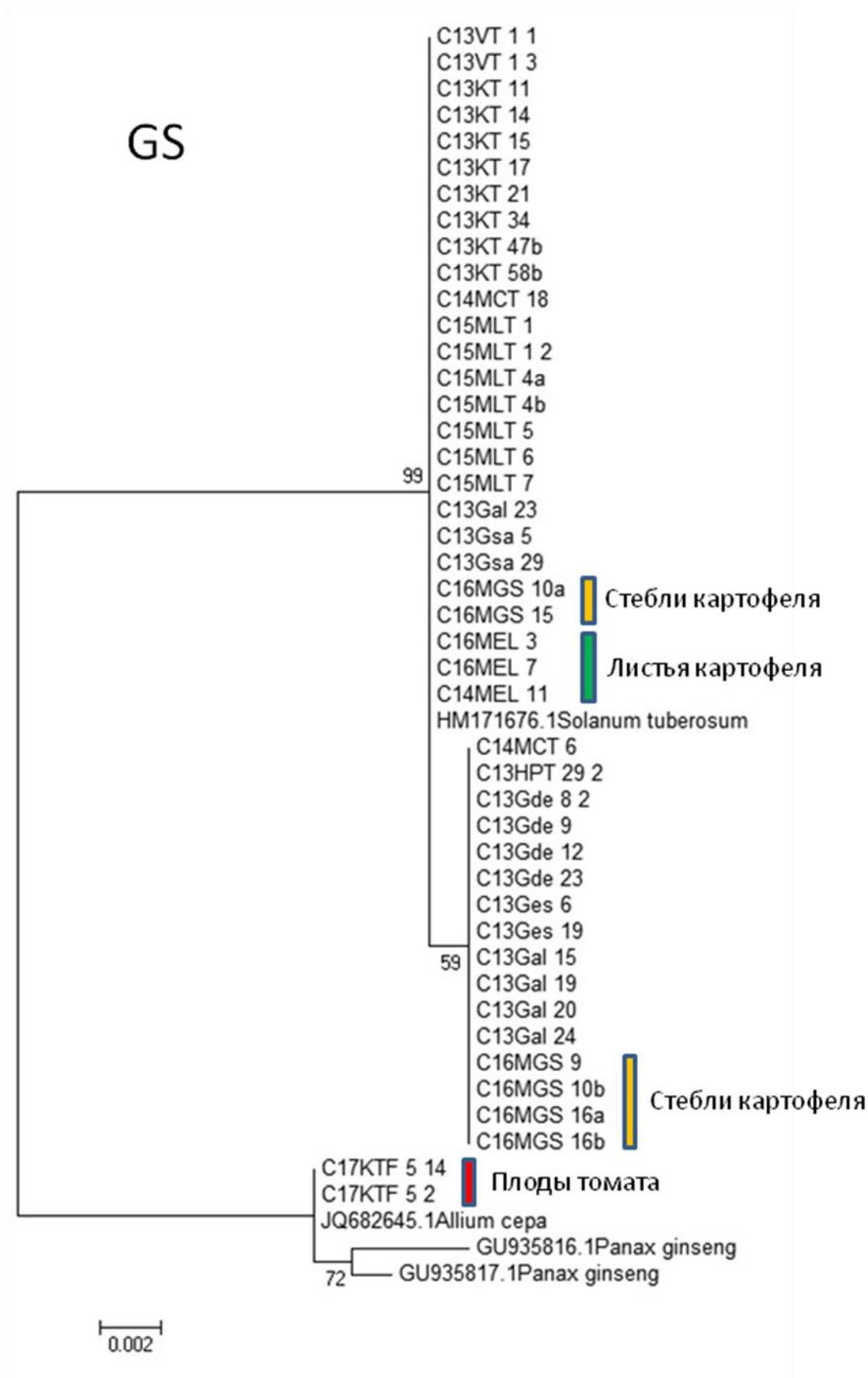


Рис. 2. Последовательности гена глутамин-синтетазы (GS)

### Глутамин-синтетаза

Последовательности нуклеотидов гена глутамин-синтетазы изучены у 42 штаммов с картофеля (6 выделены из пораженных стеблей, 3 – из пораженных листьев, остальные из клубней). Исследуемые изоляты с картофеля разделились на две группы, отличающиеся 2-мя нуклеотидами (рис. 2). В обе группы попали как штаммы, выделенные из образцов, собранных в разных регионах РФ, так и выделенные из немецких семенных клубней. Штаммы, выделенные из стеблей картофеля, попали в обе группы, выделенные из листьев – оказались в одной группе. В Genbank депонированы сиквенсы KY524295 (изолят C16MEL 3 из первой группы) и KY524296 (изолят C16MGS9 из второй группы).

Штаммы, выделенные с плода томата (2 изолята), попали в отдельную кладу. Они отличались от картофельных 25-ти нуклеотидной делецией, заменами 15 нуклеотидов, вставкой 1 нуклеотида. Последовательности глутамин-синтетазы томатных штаммов оказались идентичны последовательности изолята, выделенного из лука в США (JQ682645) и близки последовательностям изолятов, выделенных из женьшеня в Корее (GU935816 и GU935817, рис.2).

Результаты исследования четырех последовательностей ДНК показали низкую вариабельность среди выделенных с картофеля штаммов *S. coccoodes*. Анализ достаточно большой выборки штаммов не выявил дивергенции популяций исследуемого гриба ни по регионам выделения, ни по органам картофеля. Штаммы, выделенные из пораженных листьев и стеблей картофеля, попали в те же группы, что и выделенные из клубней. При этом различия между группами штаммов с картофеля были не более 1-2 нуклеотидов.

Штаммы, выделенные с томата, отличались от выделенных с картофеля по структуре проанализированных участков глутамин-синтетазы, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы, актина. Только по структуре участка ITS не были выявлены различия между картофельными и томатными штаммами.

### **3.2. Внутривидовое разнообразие *H. solani***

Последовательность нуклеотидов участка ITS1 – 5,8S – ITS2, амплифицируемого праймерами ITS5-ITS4, была исследована у 27 штаммов, выделенных из пораженных клубней, собранных в Московской, Брянской, Костромской областях, в республике Чувашия, из импортированных из Нидерландов и Германии семенных клубней. Внутривидового разнообразия по структуре этого участка не выявлено. Последовательности всех исследованных штаммов были абсолютно одинаковыми и типичными для вида *H. solani*. Все они имели 100%-ю идентичность с депонированными в базе Genbank последовательностями KC106739 (Al-Mughrabi et al., 2013) и AF073904 (Olivier and Loria, 1998). Исходя из полученных данных можно говорить о высокой гомогенности вида *H. solani*.



### 3.3. Устойчивость к фунгицидам

#### 3.3.1. Устойчивость штаммов *C. coccodes* к фунгицидам

Исследования устойчивости штаммов *C. coccodes* к фунгицидам (табл. 4) показали, что эффективным фунгицидным действием обладали дифеноконазол (препарат Скор) ( $EC_{90}$  не превышал 1,37 мг/л) и коллоидное серебро (Зерокс) ( $EC_{90} < 37$  мг/л). На средах с другими препаратами изоляты *C. coccodes* медленно продолжали свой рост даже при концентрациях 100 мг/л по действующему веществу ( $EC_{90} > 100$  мг/л). Поскольку тестирования на средах с большими концентрациями фунгицидов не проводили, точного значения  $EC_{90}$  установить не удалось.

Таблица 4. Устойчивости *C. coccodes* к фунгицидам.

Фунгицид	Страна	Кол-во протестированных изолятов	Вариабельность $EC_{50}$ , мг/л	Среднее $EC_{50}$ , мг/л	Дисперсия среднего	Число штаммов с $EC_{50}$ , попадающими в интервал:			
						<1	1-10	10-100	>100
Пенцикурон (Престиж)	РФ	25	—	>100	—	0	0	0	25
	ФРГ	15	—	>100	—	0	0	0	15
Коллоидное серебро (Зерокс)	РФ	16	2,09-6,97	4,8	2,73	0	16	0	0
	ФРГ	16	4,68-5,55	5,26	0,046	0	16	0	0
Азоксистробин (Квадрис)	РФ	23	0,07 - 19	3,7	23,42	13	8	2	0
	ФРГ	15	0,05-0,1	0,08	0,0002	16	0	0	0
Флудиоксонил (Максим)	РФ	26	0,6-0,9	0,8	0,01	25	0	0	0
	ФРГ	16	0,6-0,7	0,6	0,002	15	0	0	0
Дифеноконазол (Скор)	РФ	24	0,06 - 0,12	0,07	0,0002	24	0	0	0
	ФРГ	15	0,05-0,07	0,06	0,00004	15	0	0	0
Тиабендазол (Текто, Вист)	РФ	24	1,52 - 12,31	7,0	9,23	0	21	3	0
	ФРГ	16	0,91-50,3	10,8	308,56	8	5	3	0

Прим.: \* — не удалось посчитать.

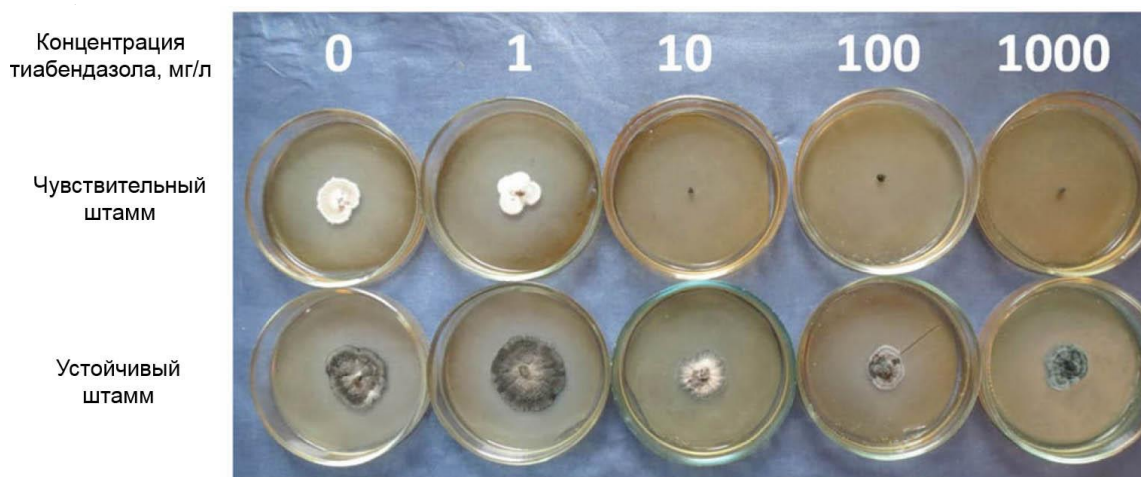
Оценка показателя  $EC_{50}$  (табл. 4) показала, что эффективное ограничение роста наблюдалось у всех препаратов за исключением пенцикурона. Крайне низкая эффективность пенцикурона в отношении *C. coccodes* отмечена и в работе французских исследователей (Andriveau et al., 1997). Штаммы, сильно отличающиеся по уровням устойчивости ( $EC_{50}$ ), были выявлены в отношении тиабендазола и азоксистробина. Причем высокая вариабельность в отношении тиабендазола выявлена у изолятов из Германии, а более высокой вариабельностью в отношении азоксистробина отличались российские изоляты. Вариабельность устойчивости к тиабендазолу была отмечена и при анализе

французских изолятов *C. coccodes* (Andrivon et al., 1997). В целом, уровни устойчивости германских изолятов в отношении всех фунгицидов, кроме тиабендазола, отличались низкой вариабельностью. Возможно, это связано с интенсивными химическими обработками и правильным чередованием фунгицидов в Германии, что не позволило появиться устойчивым изолятам. Отдельно стоит отметить устойчивость к флудиоксонилу. Все исследованные изоляты отличались очень низким  $EC_{50}$  ( $< 1$  мг/л) при высоком  $EC_{90}$  ( $> 100$  мг/л). При этом внутривидовая вариабельность практически отсутствовала. При длительном культивировании на среде с флудиоксонилем изоляты гриба не погибали, а продолжали очень медленно расти. Через 15-20 суток роста более половины исследованных изолятов образовывали быстро растущие сектора.

### Устойчивость штаммов *H. solani* к фунгицидам

Наиболее эффективным из испытанных препаратов был дифеноконазол ( $EC_{50} \leq 0,12$  мг/л;  $EC_{90} \leq 24$  мг/л) (табл. 5). Меньшую эффективность показало коллоидное серебро ( $EC_{50} \leq 76$  мг/л). В отношении дифеноконазола не было выявлено высокоустойчивых изолятов.

Азоксистробин был эффективен в отношении большинства исследованных штаммов ( $EC_{50} \leq 7$  мг/л). В то же время, как среди российских, так и западноевропейских были выявлены штаммы с очень высокой устойчивостью ( $EC_{50} > 100$  мг/л). Штамм RMCh24 был одновременно устойчив и к тиабендазолу, и к азоксистробину.



**Рис. 3. Рост чувствительного и устойчивого к тиабендазолу штаммов *H. solani* на агаризованной среде с разными концентрациями тиабендазола (42-е сутки инкубации)**

Дифеноконазол, коллоидное серебро и азоксистробин показали сильный фунгистатический эффект в отношении *H. solani*. После 25-30 дней инкубирования мицелий переходил на среду с фунгицидом и начинал очень медленно расти.

Возможно, это связано со снижением эффективности фунгицида в среде при хранении.

Тиабендазол эффективно ингибировал рост большинства тестируемых штаммов. На рис. 3 показан рост чувствительного и устойчивого штаммов на агаризованной среде с различными концентрациями фунгицида. Рост чувствительных штаммов ограничивался сравнительно низкой концентрацией тиабендазола ( $EC_{50} \leq 7,3$  мг/л). Мицелий не переходил на агаризованную среду с фунгицидом даже после 40 суток инкубации – по-видимому, он погибал на инокулировочном блоке. Все штаммы, выделенные из германских семенных клубней, были восприимчивы к тиабендазолу ( $EC_{50} \leq 5,8$  мг/л). Среди российских и голландских штаммов были выявлены изоляты, уровень устойчивости которых отличался от чувствительных более чем в 1000 раз.

Таблица 5. Устойчивость штаммов *H. solani* к фунгицидам.

Штамм	Тиабендазол		Дифеноконазол		Азоксистробин		Коллоидное серебро	
	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>
<b>Российские штаммы</b>								
H13 RB 5	–	–	–	–	–	–	10,1	94,1
H13 RB 7	5.4	9.1	0,06	11,5	> 100	> 100	10,0	93,6
H13 RB 11	6.6	41.5	0,06	8,9	0,08	> 100	40,9	> 100
H14 RMCh 2	>1000	>1000	0,06	4,2	1,45	> 100	40,0	98,7
H14 RMCh 5	738	>1000	0,09	24	0,08	> 100	23,2	> 100
H14 RMCh 24	>1000	>1000	0,06	4,8	> 100	> 100	47,5	96,6
H13 MSh 4d	0.5	0.9	0,08	9,0	0,09	> 100	59,7	> 100
H13 RM 32d	6.1	9.2	0,06	3,7	5,50	> 100	46,7	> 100
H13 RM 10	–	–	–	–	–	–	14,1	92,2
H13 RM 23	–	–	–	–	–	–	8,4	81,9
H13 RM 42	7.3	64.5	0,05	0,1	0,07	> 100	7,0	86,4
H13 RKSt 39	5.9	9.2	0,06	1,0	> 100	> 100	41,7	> 100
H13 RKSt 68	5.7	9.1	0,06	0,7	0,78	> 100	19,0	87,4
H14 RKSu 18	0.7	6.4	0,06	1,5	0,10	> 100	7,1	86,2
H14RKSu 2/2	0.7	6.4	0,06	7,5	7,00	77,5	61,6	> 100
H14 RKSu 7	5.8	9.2	0,07	18	0,10	> 100	76,7	> 100
H14 RCh 8	1.7	8.3	0,06	0,6	0,08	> 100	21,7	95
<b>Штаммы из импортированного семенного картофеля</b>								
H13 H 16	>1000	>1000	0,07	6,1	0,09	> 100	48,6	> 100
H13 H 28	818	>1000	0,06	3,6	> 100	> 100	62,2	> 100
H13 Gal 3/2	1.0	8.2	0,07	12,3	0,10	> 100	43,5	95,5
H13 Gde 11	0.5	0.9	0,09	8,2	85,00	> 100	69,4	> 100
H13 Gsa 18	0.5	0.9	0,06	0,4	0,10	96,1	26,5	> 100
H13 Gde 20	5.8	9.2	0,12	1,0	> 100	> 100	55,0	94,2
H13 Ges 21	5.3	9.1	0,06	5,5	> 100	> 100	72,7	> 100

В России (и в других странах мира) для обработки клубней перед закладкой на хранение разрешен очень ограниченный спектр препаратов. В России разрешены только 3 фунгицида: бензойная кислота, тиабендазол и флудиоксонил. Наиболее широко из них применяется тиабендазол. В виде пирогенных шашек Вист он используется для обработки клубней сразу после закладки на хранение, для обработок во время хранения, обработке перед выгрузкой семенного картофеля из хранилища. Кроме того, тиабендазол входит в состав препарата Имикар (КС), используемого для предпосадочной обработки клубней. Поэтому изучение устойчивости к тиабендазолу – очень актуальная задача.

### **Механизмы устойчивости к тиабендазолу**

Тиабендазол – бензимидазольный фунгицид, действие которого обусловлено связыванием грибного белка бета-тубулина и ингибированием функции микротрубочек. Появление устойчивости к тиабендазолу отмечено у многих видов грибов, включая *H. solani*. Известны мутации в гене бета-тубулина, приводящие к резкому повышению устойчивости к тиабендазолу, например, однонуклеотидные замены в кодонах 198 или 200 (Koenraad et al., 1992).

В нашей работе структура гена  $\beta$ -тубулина определена у 17 различающихся по устойчивости к тиабендазолу российских и европейских штаммов (табл. 6). Все исследованные последовательности, принадлежащие чувствительным штаммам, оказались одинаковыми и полностью совпали с последовательностью Genbank Y10670 (McKay, Cooke, 1997), характерной для чувствительных к тиабендазолу штаммов. Высокоустойчивые штаммы H13RMCh24 (выделен в Московской области из клубня картофеля сорта Невский, выросшего из местного семенного материала), H13H16 (выделен из клубня картофеля сорта Астерикс, импортированного из Нидерландов), H13RKSu10 (выделен в Костромской области из картофеля сорта Сафия, семенной материал которого был привезен из Германии) содержали однонуклеотидную замену в позиции, соответствующей 198 кодону, что приводило к замене Glu (GAG) на Gln (CAG) при трансляции.

В партии клубней с того же поля, что и RMCh24, был обнаружен устойчивый к тиабендазолу штамм RMCh2. Штамм RMCh2 не имел мутации в 198 кодоне, но имел мутацию в 200 кодоне, выражавшуюся в замене Phe (TTC) на Tyr (TAC) (таблица 6). Эта мутация устойчивости также описана в литературе (Koenraad et al., 1992; McKay, Cooke 1997) как вызывающая устойчивость к бензимидазолам.

Результаты проведенной работы показывают, что в России, как и в других странах мира, встречаются устойчивые к тиабендазолу штаммы. В России тиабендазол является самым популярным препаратом для защиты клубней во время хранения. Для эффективной защиты клубней с помощью тиабендазола необходим мониторинг встречаемости устойчивых штаммов в популяциях *H. solani* из разных регионов России и в семенном картофеле, в том числе импортированном.

Таблица 6. Структура гена  $\beta$ -тубулина штаммов *H. solani*, различающихся по устойчивости к тиабендазолу. Кодоны с мутацией подчеркнуты.

Штамм	Место и год сбора пораженного клубня, сорт картофеля	Устойчивость к тиабендазолу, ЕС <sub>50</sub> , мг/л	Сиквенс кодонов 197-200 гена $\beta$ -тубулина
<b>Штаммы выделены из клубней, выращенных в России из отечественного семенного материала</b>			
<b>H13 RB7</b>	Брянская обл., 2013, Розара	5,4	GACGAGACCTTC
<b>H13 RB11</b>	Брянская обл., 2013, Винета	6,5	GACGAGACCTTC
<b>H13 RMCh2*</b>	Московская обл., 2014, Невский	>1000	GACGAGACCT <u>AC</u>
<b>H13RMCh24**</b>	Московская обл., 2014, Невский	>1000	GAC <u>CAG</u> ACCTTC
<b>H13 RMSH4d</b>	Московская обл., 2013, Жуковский ранний	0,5	GACGAGACCTTC
<b>H13 RKSt68</b>	Костромская обл., 2013, Удача	5,7	GACGAGACCTTC
<b>H13 RCh1</b>	Чувашия, 2014, Удача	0,8	GACGAGACCTTC
<b>H13 RCh8</b>	Чувашия, 2014, Удача	1,7	GACGAGACCTTC
<b>Штаммы выделены из клубней, выращенных в России из импортированного из Германии семенного материала</b>			
<b>H13 RKSu2/2</b>	Костромская обл., 2014, Альвара	0,7	GACGAGACCTTC
<b>H13 RKSu10**</b>	Костромская обл., 2015, Сафия	>1000	GAC <u>CAG</u> ACCTTC
<b>Штаммы выделены из импортированного семенного картофеля</b>			
<b>H13 H16**</b>	Нидерланды, 2013, Астерикс	>1000	GAC <u>CAG</u> ACCTTC
<b>H13 Gal 3</b>	Германия, 2013, Альвара	1,0	GACGAGACCTTC
<b>H13 Gde 11</b>	Германия, 2013, Дельфине	0,5	GACGAGACCTTC
<b>H13 Ges 12</b>	Германия, 2013, Эстрелла	3,2	GACGAGACCTTC
<b>H13 Gsa 18</b>	Германия, 2013, Сафия	0,5	GACGAGACCTTC
<b>H13 Gsa 20</b>	Германия, 2013, Сафия	5,8	GACGAGACCTTC
<b>G21</b>	Германия, 2013, Сафия	5,3	GACGAGACCTTC

\* – штамм *RMCh2* имеет мутацию в 200 кодоне, выражающуюся в замене Phe (TTC) на Tyr (TAC),

\*\* – штаммы *RMCh24*, *RKSu10*, *H16* имеют мутацию в 198 кодоне, выражающуюся в замене Glu (GAG) на Gln (CAG) при трансляции

Анализ устойчивости штаммов *H. solani* к фунгицидам сложен из-за очень малой скорости роста этого гриба. Даже на среде без добавления фунгицида колония достигает пригодного для учета диаметра в 40-50 мм на 20-25 сутки, а у некоторых штаммов и позже. В таких условиях методы молекулярной диагностики устойчивости являются очень удобными. Тесты на основе ПЦР могут выявить устойчивый штамм в пораженном материале в течение нескольких часов без

выделения чистой культуры гриба, что позволит оперативно разработать стратегию защиты клубней от серебристой парши и подобрать эффективные фунгициды.

### **Заключение**

Главным условием конкурентоспособности растениеводческого предприятия является возможность производства востребованной рынком продукции, отличающейся хорошим внешним видом, не имеющей внешних признаков поражения патогенами и вредителями, не содержащей грибных или бактериальных токсинов. При этом технология производства должна обеспечивать и низкую себестоимость продукции.

Основным элементом защиты растений от болезней до настоящего времени остается применение химических пестицидов. В производстве картофеля химические средства защиты растений применяют на всех этапах производства. Проведенная работа показала сильные отличия эффективности фунгицидов в отношении видов и даже штаммов возбудителей грибных заболеваний. Выявлены мутации, приводящие к резкому повышению устойчивости.

В работе впервые на современном уровне исследованы российские популяции таких опасных фитопатогенных грибов, как *S. coccoodes* и *H. solani*, показаны отличия между томатными и картофельными штаммами *S. coccoodes*, выявлены мутации, приводящие к устойчивости *H. solani* к популярному фунгициду тиабендазол. Полученные нами данные, несомненно, будут использованы и принесут пользу развитию отечественного производства картофеля и томата.

### **Выводы**

1. При оценке разнообразия выделенных с картофеля штаммов *S. coccoodes* по четырем независимым генетическим маркерным признакам и по данным культурально-морфологического анализа не было обнаружено различий между штаммами различной органотропной специализации и различного географического происхождения.

2. Обнаружены различия между штаммами *S. coccoodes*, выделенными из картофеля и томата, по трем независимым генетическим маркерным признакам, которые показывают расхождение вида *S. coccoodes* по эколого-трофическим нишам и, возможно, начальный этап симпатрического видообразования.

3. При оценке разнообразия штаммов *H. solani* по последовательности ядерных рибосомных генов и внутренних транскрибируемых спейсеров ITS1-5,8S-ITS2 различий выявлено не было.

4. Изучение роста *S. coccoodes* при разных температурных режимах показало, что максимальная скорость роста наблюдалась при +24°C. Существенные различия по скорости роста между штаммами были выявлены при экстремальных температурах +5°C и +33°C; при +15°C и +24°C различия отсутствовали.

5. При изучении действия фунгицидов на *S. coccoodes* и *H. solani* наиболее высокую эффективность показали дифеноконазол и коллоидное серебро; штаммов,

устойчивых к этим фунгицидам, выявлено не было. Обнаружена высокая вариабельность в уровнях устойчивости штаммов *H. solani* к фунгицидам азоксистробин и тиабендазол.

6. Обнаружены мутации гена  $\beta$ -тубулина, приводящие к резкому повышению устойчивости *H. solani* к тиабендазолу, сходные с таковыми у европейских и североамериканских устойчивых штаммов.

### **Практические рекомендации**

1. Известно, что *C. coccodes* и *H. solani* накапливаются в почве в высокой концентрации после выращивания восприимчивых сортов картофеля (Merida & Loria, 1994; Rodriguez et al., 1996; Frazier et al., 1998). Применение во время хранения и при посадке фунгицидов с высоким риском возникновения устойчивых штаммов, например тиабендазола, может привести к накоплению устойчивых штаммов в поле, что сделает защиту неэффективной. Поэтому при обработках во время хранения и перед посадкой следует проводить ротацию препаратов, используя препараты с разными действующими веществами. Для определения потенциальной эффективности защитных мероприятий необходимо проводить оценку долей устойчивых штаммов в семенном материале.

2. Исследование участков генома обоих исследуемых видов грибов показало их очень низкую внутривидовую вариабельность. Это позволяет надеяться на то, что устойчивые сорта не будут поражаться *C. coccodes* и *H. solani* продолжительное время, и усилия селекционеров имеет смысл сконцентрировать на селекции устойчивых сортов.

### **Список публикаций по теме диссертации**

#### **Публикации в изданиях, входящих в базы Web of Science и Scopus**

1. **Kutuzova I.A.**, Kokaeva L.Y., Pobedinskaya M.A., Krutyakov Y.A., Scolotneva E.S., Chudinova E.M., Elansky S.N. Resistance of *Helminthosporium solani* strains to the fungicides applied for tuber treatment // Journal of Plant Pathology. — 2017. — V. 99(3).— P.635-642. DOI: 10.4454/jpp.v99i3.3950. ИФ по WoS: 1,257.

2. Belov G.L., Belosokhov A.F., **Kutuzova I.A.**, Statsyuk N.V., Chudinova E.M., Alexandrova A.V., Kokaeva L.Y., Elansky S.N. *Colletotrichum coccodes* in potato and tomato leaves in Russia // Journal of Plant Diseases and Protection. — 2018. – V. 125. – P. 311-317. DOI: 10.1007/s41348-017-0138-0. ИФ по WoS: 0,573.

3. Кудрявцева Н.Н., Побединская М.А., Балабко П.Н., Кокаева Л.Ю., Зайчик Б.Ц., **Кутузова И.А.**, Азаркович М.И., Еланский С.Н., Валуева Т.А. Протеолитическая активность и вирулентность штаммов *Alternaria alternata*, выделенных из томата // Микология и фитопатология. — 2017. — Т. 51(2). — С.110-116. ИФ по Scopus: 0,192 и РИНЦ: 0,556.

#### **Публикации в изданиях, входящих в базу РИНЦ (RSCI)**

4. Хуснетдинова Т.И., **Кутузова И.А.**, Проничева И.С., Кокаева Л.Ю., Побединская М.А., Чудинова Е.М., Еланский С.Н. Устойчивость штаммов

*Helminthosporium solani* к тиабендазолу // Агрехимический вестник.— 2017.— В.1.— С. 40-43. ИФ по РИНЦ: 0,450

5. С. Н. Еланский, М. А. Побединская, **Кутузова И. А.** и др. Устойчивость *Helminthosporium solani*, *Colletotrichum coccodes* и *Rhizoctonia solani* к фунгицидам, используемым для обработки клубней картофеля // Достижения науки и техники АПК. — 2018. — Т. 32, № 3. — С. 50-53. ИФ по РИНЦ: 0,580

#### **Прочие публикации**

6. Белосохов А. Ф., Белов Г. Л., **Кутузова И. А.**, Кокаева Л. Ю., Еланский С. Н. Встречаемость *Colletotrichum coccodes* в пораженных листьях картофеля и томата в России. // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 16-18.

7. Полуэктова Е. В., Берестецкий А. О., **Кутузова И. А.**, Еланский С. Н. Влияние состава питательных субстратов на хроматографические профили и фитотоксическую активность 4-х штаммов *Colletotrichum coccodes* различного географического происхождения // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 152-153.

8. **Кутузова И. А.**, Александрова А. В., Еланский С. Н. Вариабельность штаммов *Colletotrichum coccodes*, выделенных из различных регионов // Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю. Т. Дьякова и др. — Т. 7. — Национальная академия микологии М, 2017. — С. 62-64.

9. **Кутузова И. А.**, Побединская М. А., Кокаева Л. Ю., Еланский С. Н. Устойчивость штаммов *Helminthosporium solani* к некоторым фунгицидам, применяемым для обработки клубней картофеля // Защита картофеля. — 2016. — № 2. — С. 18-23. ИФ по РИНЦ: 0,248.

10. **Кутузова И. А.**, Григорович И. А., Побединская М. А., Белов Г. Л., Еланский С. Н. Устойчивость российских и европейских штаммов *Colletotrichum coccodes* к некоторым фунгицидам // Защита картофеля. — 2015. — Т.1. — С. 30-34.

11. **Кутузова И.А.**, Кокаева Л.Ю. Использование экспресс-диагностики и оценки устойчивости к фунгицидам в защите картофеля от серебристой парши // Сборник тезисов XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Секция "Биология", М.: МАКС Пресс, 2015 — С. 199-200.

12. **Кутузова И.А.**, Григорович И.А., Побединская М.А., Фарукшина К.Т., Еланский С.Н. Эффективность химических фунгицидов в отношении возбудителей грибных инфекций клубней картофеля// Современная микология в России / Под ред. Е. Н. Биланенко, Е. Ю. Ворониной, Ю.Т. Дьякова и др.. М.: Нац. акад. микологии, 2015. — Т.5. — С. 190-192.

13. Pobedinskaya M.A., Elansky S.N., Kokaeva L.Yu., **Kutuzova I.A.**, Pronicheva I.S., Kuznetsova M.A., Kozlovsky B.E., Ignatov A.N., Zherebin P.M., Denisov A.N., Krutyakov Y.A.. New fungicide and bactericide Zeroxxe®: in vitro assessment of fungicidal and bactericidal activity // Wageningen university, PPO-Special Report no. 17. — 2015. — P. 103-108.