

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПЦР-ДИАГНОСТИКИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА FUSARIUM

*Аскарова Зарина*

*Чирчик педагогика университети магистр 1 курс*

*Аннотация.* В данной статье мы проанализировали оптимизацию ПЦР-диагностики для выявления грибов рода *Fusarium* и значение того, что это такое в жизни человека.

**Ключевые слова:** *Fusarium, PFGE, PrimerBlast, OligoCalc, Primer3.*

Фузариум (*Fusarium*) – грибы, относящиеся к классу грибов. Существует 26 типов. Размножается бесполоыми конидиями. В мицелии и конидиеобразующих клетках появляются одно- или многоклеточные овальные или яйцевидные микроконидии. Большинство фузариумов обитает в сапрофитах, почве и растительных остатках. Некоторые виды являются паразитическими и вызывают у растений фузариоз (увядание). Некоторые виды фузариоза выделяют токсичные вещества, оказывающие негативное воздействие на растения. У людей, поедающих отравленные этими веществами растения, развивается септическая ангина, у животных – фузариотоксикоз.

*Fusarium* — крупный космополитический род несовершенных грибов, представляющий интерес в первую очередь потому, что многочисленные виды являются важными фитопатогенами, производят широкий спектр вторичных метаболитов и/или вызывают оппортунистические микозы у людей. Хотя исследования *Fusarium* за последние 100 лет продвинули наше понимание этой важной группы грибов, многие аспекты его биологии все





еще требуют рассмотрения. Традиционная классификация *Fusarium* основывалась исключительно на морфологии. Однако эта система классификации на протяжении многих лет была спорной, поскольку она привела к описанию заметно разного количества секций и видов разными таксономистами. Кроме того, морфологическая пластичность и общая малочисленность морфологических признаков затруднили разграничение некоторых видов *Fusarium* и привели к появлению видов, которые состоят из штаммов с заметно разными физиологическими признаками, такими как специфичность растения-хозяина. Снайдер и Хансен интегрировали это разнообразие специфичности хозяина в пределах одного вида в систему «*forma specialis*»; каждая *forma specialis* в пределах вида проявляла высокий уровень вирулентности на определенном виде хозяина (или группе видов), но не на других. В традиционной таксономии *Fusarium* каждая секция, вид или *forma specialis* считались монофилетической единицей. Однако недавние молекулярные филогенетические анализы показали, что это не так, по крайней мере для некоторых единиц классификации *Fusarium*. Половые состояния (телеоморфы) были описаны для некоторых видов *Fusarium*. Все известные телеоморфы *Fusarium* включены в порядок Ascomycota Нурocreales, но были отнесены к нескольким различным родам (например, *Gibberella*, *Nectria*). Были описаны как гомоталличные, так и гетероталличные виды. Хромосомы некоторых из этих видов наблюдались во время мейоза с помощью световой микроскопии. Однако, как и другие грибы, *Fusarium* имеет небольшие хромосомы по сравнению с растениями и животными, и световая микроскопия не является удовлетворительной для точного определения числа хромосом или для кариотипирования. В результате гель-электрофорез в импульсном поле (PFGE) стал широко использоваться для электрофоретического кариотипирования (ЕК) *Fusarium*, а также для грибов в целом. PFGE очень эффективен для разрешения хромосом многих грибов и выявления вариаций ЕК внутри и



между видами. Полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP) — еще один инструмент, который использовался для изучения геномов грибов, облегчая построение высокоплотных генетических карт сцепления.<sup>1</sup>

Род *Fusarium* включает разные виды патогенных аскомицетов, которые могут продуцировать вторичные токсичные метаболиты (микотоксины), такие как трихотецены и фумонизины, пагубно действующие на растения. Фузариозы проявляются в виде увядания, гнилей и язв. Альтернариозы, вызываемые представителями рода *Alternaria*, характеризуются некротическим увяданием растения. Схожая симптоматика обнаруживается у заболеваний, вызванных *S. cladosporioides*. Грибы *S. cucurbitacearum* (син. *D. bryoniae*) являются возбудителями черной гнили – болезни, поражающей вегетативные и генеративные части растений. Заболевание начинается с появления пятен на листьях, которые затем превращаются в язвы. По симптоматике стагноспороз часто путают с фузариозным вилтом, в то время как меры купирования данных заболеваний отличаются. Грибы *P. cucumerina* вызывают увядание растений, которое, как кладоспориоз и альтернариоз, начинается с образования небольших черных пятен на листьях, со временем увеличивающихся в размере. Серая гниль, возбудителем которой являются представители вида *B. cinerea*, может приводить к гибели до 70 % растений томата в теплице. Близкородственный вид *S. sclerotiorum*, вызывающий белую гниль, имеет широкий адаптивный потенциал и продуцирует большое количество вторичных метаболитов, отвечающих за патогенность и вирулентность. *V. dahlia* – карантинный фитопатогенный вид, вызывающий увядание томата и огурца. Патоген проникает в растение через

<sup>1</sup> . Agronotechnology for plant fungal disease management: a review / N. Pa tel [et al.] // Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. – 2014. – Vol. 3, № 10. – P. 71–84.



поврежденные корни, поражает проводящую систему и нарушает транспорт воды. Антракноз, или черная пятнистость – заболевание, вызываемое представителями вида *S. coc-codes*. Патоген поражает надземные части растений томата и перца, приводит к преждевременному отмиранию листьев и последующему загниванию плодов.

Известно, что специфичность праймеров, применяемых для ПЦР-детекции и идентификации микроорганизмов, зависит от правильности выбора диагностических локусов генома. Наиболее широко для конструирования таксонспецифичных праймеров используются высококонсервативная область внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) рибосомного оперона и гены «домашнего хозяйства». Есть сведения, что в геноме фитопатогенных грибов присутствуют генетически стабильные локусы, кодирующие факторы патогенности, перспективные для создания диагностических праймеров. Например, для идентификации представителей рода *Fusarium* часто используют праймеры к генам микотоксинов, *S. sclerotiorum* – к гену *aspH*, кодирующему аспартилпротеазу. Проведен анализ доступных в базе данных ГенБанк полногеномных последовательностей фитопатогенных грибов *Alternaria* sp., *A. alternata*, *B. cinerea*, *C. cladosporoides*, *Fusarium* sp., *P. cucumerina*, *S. sclerotiorum*, *S. cucurbitacearum*, *V. dahlia*, выявлены высококонсервативные и специфичные генетические локусы, в том числе кодирующие факторы патогенности, на основании которых сконструированы родо- и видоспецифичные праймеры для детекции и идентификации целевых патогенов. С помощью приложений PrimerBlast, OligoCalc, Primer3 определены термодинамические параметры праймеров, рассчитаны температуры отжига. Основываясь на расчетных и экспериментальных данных, оптимизированы температурно-временные режимы амплификации с таксонспецифичными праймерами.



С использованием геномной ДНК коллекционных штаммов фитопатогенных грибов показано, что амплификация со всеми парами праймеров приводила к образованию ампликонов нужного размера только при использовании в качестве матрицы ДНК грибов целевого вида (рис. 1–б), что свидетельствует о высокой специфичности. В случае праймеров Fus-F / Fus-R, специфичных к *Fusarium* sp., AA-pksH-F / AA-pksH-R, специфичных к *A. alternata*, VD-lov-F и VD-lov-R, специфичных к *V. dahlia*, для *S. cucurbitacearum*, *S. sclerotiorum*, *V. dahlia* детектировались при концентрации ДНК в образце не менее 105 гЭ/мл, что сравнимо по чувствительности в ИФА-диагностикой. Результаты таксонспецифичной ПЦР с использованием ДНК коллекционных штаммов фитопатогенных грибов точно воспроизводились во всех повторностях опыта. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют, что сконструированные родо- и видоспецифичные праймеры могут использоваться для диагностики грибов – возбудителей болезней огурца и томата в режиме стандартной ПЦР.<sup>2</sup>

В заключение, для профилактики и борьбы с фузариозным увяданием необходимо определить закономерность возникновения, факторы влияния и оптимальный период профилактики и борьбы. Научное использование лекарств и владение технологией опрыскивания позволяют эффективно предотвращать и контролировать болезнь.

<sup>2</sup> Оптимизация условий выделения ДНК из грибов рода *Aspergillus* для последующей молекулярно-генетической идентификации / И. А. Гончарова [и др.] // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э. И. Коломиец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 8. – С. 62–72.



## Литература

1. Agronanotechnology for plant fungal disease management: a review / N. Patel [et al.] // *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* – 2014. – Vol. 3, № 10. – P. 71–84.
2. Dun-chun, H. Problems, challenges and future of plant disease management: from an ecological point of view / H. Dun-chun, Z. Jia-sui, X. Lian-hui // *J. Integrat. Agricult.* – 2016. – Vol. 15, № 4. – P. 705–715.
3. Оптимизация условий выделения ДНК из грибов рода *Aspergillus* для последующей молекулярно-генетической идентификации / И. А. Гончарова [и др.] // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты* : сб. науч. тр. / Ин-т микробиологии НАН Беларуси; редкол.: Э. И. Коломи-ец (гл. ред.) [и др.]. – Минск, 2016. – Т. 8. – С. 62–72.
4. Woloshuk, C. P. Aflatoxins, fumonisins, and trichothecenes: a convergence of knowledge / C. P. Woloshuk, W. B. Shim // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2013 – Vol. 37. – P. 94–109.
5. Adhikari, P. Current status of early blight resistance in tomato: an update / P. Adhikari, Y. Oh., D. R. Panthee // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18. – P. 1–22.
6. Morphological and molecular characterization of *Cladosporium cladosporioides* species complex causing pecan tree leaf spot / C. Walker [et al.] // *Genet. Mol. Res.* – 2016. – Vol. 15, № 3. – P. 1–1