**Индира Бейшова, Вадим Ульянов,**

**Александр Ковальчук**

**(Костанай, Казахстан)**

**РАЗРАБОТКА ЭКСПРЕСС-ТЕСТОВ НА ОСНОВЕ ДНК-МАРКЕРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ РОДОВ PUCCINIA И PYRENOPHORA, ВЫЗЫВАЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР**

На территории Республики Казахстан, как и в других странах, занимающихся производством зерновой продукции, заболевания, вызываемые грибами Pyrenophoratritici-repentis, Pucciniagraminis и Pucciniarecondita относятся к особо опасным болезням зерновых культур.

На сегодняшний день известно свыше 100 тысяч видов грибов, среди которых есть много патогенных, вызывающих болезни растений, животных и человека. По современным оценкам, грибы являются наиболее обширной группой организмов, вызывающей болезни растений. Также они являются единственной группой патогенных организмов, в которой представлены все группы паразитической специализации: от некротрофов до биотрофов. Суммарный ущерб, наносимый грибными болезнями культурных растений, во всём мире ежегодно исчисляется миллиардами долларов. Так, по данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), за последние годы XX в. потери пшеницы составили 33,5 млн т, т.е. около 10% от потенциального урожая. Эпифитотии грибных болезней и сегодня могут стать причиной голода, наносить существенный ущерб как развивающимся, так и развитым странам.

Проблема заражения зерновых культур фитопатогенными грибами особо остро стоит для стран Центральной Азии, поскольку этот регион, по сведениям ФАО, характеризуется самым высоким уровнем потребления хлеба на душу населения (более 200 кг в год), а сельское хозяйство рассматривается в качестве одного из основных факторов экономики. При этом Казахстан является ярко выраженным лидером региона по производству (9,6 млн тонн в год по оценке 2012 г.) и экспорту пшеницы, а также имеет наиболее обширную площадь пашни в регионе (82,4% от общей площади).

Обеспечение качества и безопасности продуктов питания, а также сырья, используемого для их производства, требуют постоянного мониторинга заражённости растений и зерна фитопатогенами, в том числе возбудителями ржавчины и пятнистости, а также разработки эффективных методов борьбы с заболеваниями. Эти методы должны быть основаны на интегративных подходах, учитывающих все аспекты заболевания, однако для их эффективного применения в первую очередь необходима точная, достоверная и своевременная диагностика и идентификация патогенов.

Ржавчина и пятнистость пшеницы являются одними из наиболее распространённых и вредоносных заболеваний, поражающих злаковые культуры на территории Казахстана. За последние 15 лет был отмечен целый ряд вспышек эпифитотий в регионе [1, 2]. Хорошо известна также эпифитотия стеблевой ржавчины в северных областях Казахстана в 1967 г., которая охватила более 5 млн га посевов, в результате чего потери урожая превысили 50% [3, 4]. Возбудители бурой (листовой) и линейной (стеблевой) ржавчин пшеницы (Pucciniarecondita и Pucciniagraminis соответственно) относят к базидиальным грибам (класс Basidiomycetes), а возбудителя жёлтой пятнистости (пиренофороза) пшеницы (Pyrenophoratritici-repentis) – к сумчатым (класс Ascomycetes).

**Материалы и методы**

В качестве материала для исследования использовались штаммы грибов, обнаруженных на территории северного Казахстана и образцы зерна, пораженные грибами рода Pyrenophora и Puccinia, а также гербарный материал.

*Выделение ДНК.*

Для получения обильного мицелия культуру грибов рода Puccinia пересевали на картофельный агар (PDА) и выращивали при 25°С в течение 6 дней, Pyrenophoratritici-repentis выращивали на овсяном (Oatagar) и овощном агаре (V8) при 22°С. Выделение ДНК из грибковых культур и зараженных проростков пшеницы были проведены с помощью коммерческого набора для выделения ДНК «PureLink» производства США. Процедура выделения ДНК проходила в соответствии с инструкцией производителя.

Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра HaloDNAmasterDynamica («DynamicaGmbH», Великобритания). Перед введением в реакционную cмесь ДНК, выделенную из культур, разбавляли до 10 нг/мл.

*Выбор специфических праймеров и флуоресцентно-меченых зондов*

Поиск нуклеотидных последовательностей для подбора специфических праймеров, осуществляли с помощью онлайн программы GenBank NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank). Выравнивание нуклеотидных последовательностей было выполнено с использованием алгоритма Clustal W (Thompsonetal., 1994). Работоспособность праймеров и зондов проверяли с использованием программы Oligo 6.71.

*ПЦР и анализ результатов*

Амплификацию проводили с помощью термоциклераQuantStudio 5 Real-Time PCR System («AppliedBiosystems™», США). В амплификационной смеси следующего состава: 18 мкл 1,25х буфера для ПЦР, 0,24 мкл 25 мМdNTPs, 0,125 мкл каждого праймера (100 мкМ), 0,14 мкл зонда (50 мкМ), 10 мкл раствора Taq-полимеразы, 5 мкл раствора ДНК (Все реагенты производства ООО «Агродиагностика»). Реакцию проводили в соответствии со следующим профилем амплификации: 93ºС - 90 с; 93ºС – 20 с, 64ºС – 5 с, (5 циклов); 93ºС – 1 с, 64º - 15 с, (40 циклов). Для определения значений Cq использовался пороговый метод анализа.

Детекция результатов ПЦР проводилась методом гель-электрофореза. Электрофорез проводили в 2% агарозном геле в буфере TBE. Оценка молекулярной массы фрагментов проводилась с использованием ДНК маркеров молекулярной массой 50 пар оснований (GeneRuler 50 bp DNA ladder, ThermoScientific). Результаты электрофореза визуализировали на гель-документирующей системе QUANTUM модель 1100 SUPER (Viber-Lourmat).

**Результаты и обсуждение**

Поскольку наиболее распространенными локусами, используемыми в качестве мишеней в ПЦР-диагностике фитопатогенных грибов, являются гены «домашнего хозяйства» и участки рибосомальной ДНК (прежде всего, внутренний транскрибируемый спейсер ITS и межгенныйспейсер IGS), в качестве трёх потенциальных мишеней были выбраны ITS, а также гены бета-тубулина и фактора элонгации трансляции 1 альфа (tef1α). В нашей работе наиболее пригодными для дизайна специфических праймеров оказались последовательности внутренних транскрибируемых спейсероврибосомальной ДНК (ITS1-2).

Таблица 1 – Структуры олигонуклеотидныхпраймеров, использованных для специфической детекции трёх патогенных грибов.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Пара праймеров | Объект(ы) | Ген | 5’-3’ последовательность |
| Pgram | *P. graminis* | ITS | GGATGTTGAGTGTTGCTGTACC |
| TTGGGTTTTAGGAGTCTCTTATTAAC |
| Prec | *P. recondita* | ITS | AGATCATTGTGATTAAGTATACGTAAT |
| GTATGGTTCTTTAGAAGTCTCTTTC |
| Ptr | *P. tritici-repentis* | ITS | CTGGACAAGAGCGCAAATAATG |
| CCGCCAATTGGACCTTATTC |

Таблица 2 - Перечень подобранных зондов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид | Локус (код доступа в GenBank) | Последовательность, 5'-3' |
| Pucciniagraminis | ITS1-ITS2  (AF468044.1) | (BHQ1) -AAAGGTGCAAGA(FAMdT)GCGTTCAAAGATTCGAT |
| Pucciniarecondita | ITS1-ITS2  (EU014045.1) | (BHQ1)-TCGAATCTTTGA(FAMdT)ACGCACATTGCGC |
| Pyrenophoratritici-repentis | ITS1-ITS2  (AM887495.1) | (BHQ1) - GCTTGGTGT(FAMdT)GGGCGTCTTGTCTCTCTCCC |

Во всех случаях значение флуоресценции IC зонда превысило в 2,5 раза уровень его фоновой флуоресценции, что указывает на отсутствие ингибирования ПЦР. В вариантах осуществления, где Наблюдаемое образование специфического продукта ПЦР меньше, чем VC сигнала в несколько раз по сравнению с вариантами, в которых формирование конкретного продукта не происходит. Результаты ДНК одной споровых культур P. graminis, P. reconditaи P. tritici-repentisс помощью количественной ПЦР с использованием праймеры для бета-тубулина гена и ITS приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Результаты амплификации ДНК в режиме «реального времени»

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Образец | Pgram | Prec | Ptr |
| P. graminis (моносп. к-ра) | + (19.0) | - | - |
| P.recondita (моносп. к-ра) | - | + (18.7) | - |
| P.tritici-repentis (моносп. к-ра) | - | - | + (18.3) |
| Заражённое растение №1 | + (25.0) | + (22.7) | - |
| Заражённое растение №2 | + (22.3) | + (27.0) | + (25.7) |
| Заражённое растение №3 | + (24.7) | - | + (26.0) |
| Заражённое растение №4 | + (25.1) | + (28.5) | + (28.2) |
| Заражённое растение №5 | + (24.2) | - | + (26.3) |
| Заражённое растение №6 | + (23.9) | + (27.3) | - |

В некоторых образцах нет сигнала от внутреннего контроля, по-видимому, это может быть связано с конкурентным ингибирование специфического образца. Таким образом, ни одна из пар праймеров не показала перекрестной реакции с другими родственными видами.

**Литература:**

1. Hodson D. Global cereal rust surveillance and monitoring // Hodson D., Hovmoller M. Abstracts of 4th Regional yellow rust conference for CWANA, 2009. -P. 5.

2. Pett B. Wheat diseases and pests observation for selection of resistant varieties in Tajikistan // Pett B., Muminjanov H., Morgunov A., Madaminov V., Rahmatov M., Sarkisova T.Agromeridian, Theoretical and Applied Agricultural Research Journal. 1, 2005. – p. 83-87.

3. Pretorius Z.A. Detection of virulence to wheat stem rust resistance genes Sr31 in Pucciniagraminis f. sp. Tritici in Uganda // Pretorius Z.A., Singli R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Plant Disease. 84, 2000. – p. 203.

4. Плахотник В.В. Стеблевая ржавчина на Севере Казахстана и устойчивость к ней образцов коллекции яровой пшеницы (ВНИИЗХ) // Плахотник В.В. Третье всесоюзное совещание по иммунитету растений. Киев, 1969. – с. 72-75.

Данная работа проводилась в рамках государственного грантового финансирования научных проектов Республики Казахстан 2015-2017 гг. МОН РК: № 2472/ГФ4 «Разработка высокоспецифичных и чувствительных экспресс-тестов на основе ДНК-маркеров для диагностики экономически значимых грибов-патогенов зерновых культур» (гос. № 0115РК01589)