**Ниязбек Калимов, Индира Бейшова,**

**Александр Ковальчук**

**(Костанай, Казахстан)**

**ДИАГНОСТИКА ГРИБОВ РОДА FUSARIUM В ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУРАХ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ**

Продовольственная и биологическая безопасность в мире во многом зависит от четкого и своевременного контроля над фитосанитарным состоянием окружающей среды и сельскохозяйственных растений, а также продуктов их переработки и кормов. Основным подходом для осуществления такого контроля является эффективная диагностика и идентификация фитопатогенов. Особое внимание должно уделяться диагностике патогенов, являющихся объектами внутреннего и внешнего карантина, а также особо опасным патогенам.

Долгое время фузариоз рассматривался как заболевание, характерное для зон с тёплым и влажным климатом. Такие условия являются оптимальными для развития гриба F. graminearum, который вызывал наиболее известные эпифитотии фузариоза. Однако позже, с выявлением новых видов, стало ясно, что многие из них характеризуются высокой экологической пластичностью и могут встречаться в регионах с различными климатическими условиями.

Патогенные грибы рода Fusarium, производят вредные микотоксины в результате чего эти токсины загрязняют растениеводческую продукцию [1]. Использование пищевой и кормовой продукции, загрязненной микотоксинами представляют большой риск для здоровья человека и животных, так как данные микотоксины являются канцерогенами и могут ослаблять иммунную систему [2]. Вспышки заболеваний, вызываемых этими грибами, представляют собой большую проблему для сельскохозяйственной отрасли и угрожают глобальной продовольственной безопасности [3, 4]. На сегодняшний день существует потребность в точных и быстрых мерах контроля заболеваний, вызываемых этими грибами, так как точная идентификация грибов вида Fusarium всегда была проблематична даже для экспертов микологии.

В настоящий момент важную роль в изучении разнообразия грибов рода Fusarium, а также в их видоспецифичной идентификации играют молекулярные технологии [5]. Наиболее специфичными для детекции возбудителей фузариоза являются методы с использованием ДНК-маркеров, в первую очередь основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющие идентифицировать вид по характерной последовательности нуклеотидов его ДНК. В последние годы применение молекулярных методов позволило уточнить таксономический статус изолятов грибов рода Fusarium различного происхождения [6], а также выделить целый ряд новых видов возбудителей фузариоза [7].

Предлагаемый нами экспресс метод может служить в качестве инструмента для оценки уровня грибкового содержания ДНК в зерновых культурах и оценить риск микотоксинового загрязнения грибами рода Fusarium.

**Материалы и методы**

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

*Выделение ДНК.*

Для получения обильного мицелия культуру грибов пересевали на картофельный агар и выращивали в темноте в течение 10 дней, Fusariumgraminearum культивировали на картофельном агаре с декстрозой при 25°С в течение 6 дней. 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). Состав реакционной смеси состаял из: 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 ДНК. Для определения значений Cq использовался пороговый метод анализа.

ПЦР проводили в соответствии со следующими программами амплификации: для пар праймеров гена translationelongationfactor 1-alpha (tef1α): 93ºС - 90 с; 93ºС – 20 с, 64ºС – 5 с, 67ºС – 5 с (5 циклов); 93ºС – 1 с, 64º - 5 с, 67ºС – 5 с (40 циклов).

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). Наиболее информативным из перечисленных локусов оказался ген tef1α. В табл. 1 приведены номера, под которыми в GenBank NCBI депонированы частичные последовательности гена tef1α, использованные при подборе праймеров.

Таблица 1. Список олигонуклеотидов выбранных для идентификацииFusariumgraminearum, F. culmorum и F. oxysporum.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Пара праймеров | Исследуемый организм | Ген | 5’-3’ последовательность |
| Fgc210F  Fgc605R | F.graminearum | TEF1α | CCCAACCCCGCCGACACT  GGTTTGTGGGAAGAGGGCAGA |
| Fsl80F  Fsl390R | F. culmorum | TEF1α | CCCAACCCCGCCGATACA  GGTTTGTGGGAAGAGGGCAAG |
| FoxF  FoxR | F. oxysporum | TEF1α | AGTACTCTCCTCGACAATGAGC  TGAGTACTCTCCTCGACAATGAGC |

Для каждого патогена были изначально подобраны по две пары, из которых впоследствии была отобрана наиболее оптимальная. Праймеры подбирали в соответствии со следующими требованиями:

- длина праймеров – 18-30 п.о.;

- GC-состав праймеров, определяющий Tm (температуру плавления), должен находится в пределах 40-60% (оптимально 45-55%). При этом значения Tm обоих праймеров должны быть близкими;

- концевые 3’-нуклеотиды не должны быть комплементарны самому праймеру, другому праймеру пары, зонду, или другим синтетическим нуклеотидам, добавляемым в реакцию;

- если от праймеров требуется специфичность, то по крайней мере 2 нуклеотида на 3’-концах должны быть гомологичны ДНК анализируемого организма, и не гомологичны ДНК близкородственных организмов;

- желательно, чтобы Tm 5’-концевой части праймера превышала Tm 3’-концевой части;

- допускается добавление на 5’-конец нескольких оснований, некомплементарных матрице.

На следующем этапе подбирались зонды для флуоресцентной детекции. От зонда не требуется столь строгой специфичности, как в случае праймеров, поэтому была возможность сконструировать универсальные зонды к консервативным участкам последовательностей нуклеотидов ДНК. В итоге, для работы были подобраны 2 зонда – один для детекции*F. graminearum* и *F. culmorum*, один для детекции*F. oxysporum* (см. табл. 2)

Табл. 2. Структуры флуоресцентно-меченых зондов, использованных в работе.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Зонд | Последовательность 5’→3’ | Специфичность |
| FgcP(T) | BHQ1-GGGCTCA(FAMdT)ACCCCGCCACTCGAG | *F. graminearum*  *F. culmorum* |
| FoxP(T) | (BHQ1)-TGACTTTGAGAAA(FAMdT)ACCCCGCCAGGTCTTG (p) | *F. oxysporum* |

Во всех случаях значение флуоресценции 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 сигнала в несколько раз по сравнению с вариантами, в которых формирование конкретного продукта не происходит. Результаты ДНК одной споровых культур Fusariumgraminearum, Fusariumculmorum, Fusariumoxysporum с помощью количественной ПЦР с использованием праймеров для tef1α приведены в таблице 1.

В табл. 3 приведены данные амплификации ДНК моноспоровых штаммов возбудителей фузариоза различных видов. В скобках приведены значения пороговых циклов для каждого образца. НЕХ – внутренний контроль (плазмида, амплифицируемая по принципу мультиплексной ПЦР, необходимая для выявления ложноотрицательных результатов).

Табл. 3. Значения пороговых циклов для последовательных разведений плазмид-положительных контролей. F. gram – F. graminearum; F. culm – F. culmorum; F. oxysp – F. oxysporum.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Образец | F. gram | F. culm | F. ox |
| F. graminearum | + (19.0) | - | - |
| F.culmorum | - | + (18.7) | - |
| F.sporotrichioides | - | - | - |
| F.cerealis | - | - | - |
| F.poae | - | - | - |
| F.langsethiae | - | - | - |
| F.avenaceum | - | - | - |
| F.oxysporum | - | - | + (26.3) |

**Литература:**

1. Doohan F. M.The use of species-speciec PCR based assays to analyseFusarium ear blight of wheat // Doohan F. M., Parry D. W., Jenkinson P. and Nicholson P. Plant Pathol. 47, 1998. - p. 197-205.

2. Withanage G.S.Agonistic and antagonistic e¡ects of zearalenone, an estrogenic mycotoxin, on SKN, HHUA, and HepG2 human cancer cell lines // Withanage G.S.Murata H., Koyama T. and Ishiwata I. Vet. Hum. Toxicol. 43, 2001. - p. 6-10.

3. McMullen M. Scab of wheat and barley: a reemerging disease of devastating impact // McMullen M., Jones R. and Gallenberg D.Plant Dis. 81, 1997. - p. 1340-1348.

4. Clear R. M. Prevalence of fungi and fusariotoxins on barley seed from western Canada, 1995 to 1997// Clear R. M., Patrick S. K. and Gaba D. Can. J. Plant Pathol. 22, 2000. - p. 44-50.

5. Benali S. Advances of molecular markers application in plant pathology research //Benali S., Mohamed B., Eddine H.J., Neema C.European Journal of Scientific Research 50, 2011. - p. 110-123.

6. Obanor F. Fusariumculmorum is a single phylogenetic species based on multilocus sequence analysis // Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J.M., Chakraborty S. Fungal Biology. 114, 2010. - p. 753-765.

7. Yli-Mattila T. Fusariumsibiricum sp. nov, a novel type A trichothecene-producing Fusarium from northern Asia closely related to F. sporotrichioides and F. langsethiae // Yli-Mattila T., Ward T.J., O'Donnell K., Proctor R.H., Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilova O.P., Aoki T., McCormick S.P., Gagkaeva T.Y. International Journal of Food Microbiology 147, 2011. - p. 58-68.

Данная работа проводилась в рамках государственного грантового финансирования научных проектов Республики Казахстан 2015-2017 гг. МОН РК: № 2474/ГФ4 «Разработка высокоспецифичных и чувствительных экспресс-тестов на основе ДНК – маркеров для диагностики фузариоза зерновых культур»