ХАРАКТЕРИСТИКА ФИТОПАТОГЕННОЙ НАГРУЗКИ СЕМЯН ОЗИМОЙ ПШЕНИЦЫ УСТОЙЧИВОГО К БОЛЕЗНЯМ СОРТА КУЯЛЬНИК ПРИ ПОМОЩИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Кузнецова И.И., Белоусова Г.Г.

*Институт генетики, физиологии и защиты растений Республики Молдова
г. Кишинев, Республика Молдова E-mail: mamakuza@mail.ru*

Abstract: The aim of this work was to test the seeds of the Kuyalnik variety (harvest of 2019) for the presence of pathogens of the genera *Fusarium*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Penicillium*, and *Aspergillus* by molecular genetic methods (PCR, nested-PCR). The use of species-specific primers for these pathogens allowed to detect 6 species of *Fusarium* (*F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. incarnatum*) in the seeds of the disease-resistant variety of winter wheat. It was found that the seeds of this variety of winter wheat also contained a large amount of *Alternaria alternata*, and a trace amount of *Penicillium* spp. Phytopathogens of the *Myrothecium* spp. genus and of the *Aspergillus parasiticus* were not identified in the DNA isolated from the seeds of the winter wheat variety Kuyalnik. The presence of such a diversity of fungal pathogens in the seeds of the resistant winter wheat variety Kuyalnik requires treatment of seeds with fungicides.

Keywords: winter wheat, seeds testing, molecular genetic methods, PCR, nested-PCR, fungal pathogens

Введение

Озимая пшеница является одной из важнейших продовольственных культур не только в Республике Молдова, но и в мире, поэтому особое внимание должно уделяться подбору устойчивых к болезням сортов озимой пшеницы как для воспроизводства, так и для гибридизации, агротехническим приемам возделывания данной культуры с целью повышения ее урожайности, адекватным фитосанитарным мерам по сохранению ее продуктивности в посевах и качества зерна. При возделывании зерновых культур грибы рода *Fusarium*, вызывающие корневые гнили и фузариозные заболевания колоса, наносят колоссальный урон: сокращается число колосков в колосе, уменьшается число зерен в нем, масса зерна, масса 1000 зерен, сильно страдает качество зерна, заражаются зернохранилища и почва. Подавляющее большинство видов *Fusarium* — активные продуценты микотоксинов (дезоксиниваленон, Т-2 токсин, зеараленон, фумонизин и т. д.), содержание этих веществ в продуктах питания и сырье строго регламентировано надзорными органами. В настоящее время доказано губительное влияние грибов рода *Myrothecium* на качество семян пшеницы при неправильном хранении в зернохранилищах (Николаева С., Маржина Л., Николаев А., 2010). Зараженное зерно, попадая в почву, особенно в условиях достаточной увлажненности, вызывает стремительное распространение данного грибка. Не менее актуальной проблемой является поражение зерна озимой пшеницы грибами родов *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*. Мировые потери от грибных болезней составляют до 10% валового сбора урожая сельскохозяйственных культур. Сорт Куяльник украинской селекции (Национальный центр семеноведения и сортоизучения НААН Украины) — высокоурожайный сорт озимой пшеницы (до 10 т/га) с высокой устойчивостью к поражению головней, септориозом, желтой ржавчиной, среднеустойчивый к фузариозам колоса (4 балла из 7). Селекционеры

нашего института и всей Молдовы используют сорт Куяльник в качестве стандарта качества зерна и урожайности в различных условиях вегетации с 2005 года, кроме того с использованием этого сорта создано много высокоустойчивых гибридов озимой пшеницы. Цель данной работы — протестировать с помощью молекулярно-генетических методов (ПЦР, nested-ПЦР) семена сорта Куяльник урожая 2019 года на наличие в них патогенов родов *Fusarium*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus*.

Материалы и методы

Объектом исследования были семена озимой пшеницы сорта Куяльник урожая 2019 года, собранные на опытных участках Института генетики, физиологии и защиты растений Республики Молдова.

Выделение ДНК: суммарная ДНК была выделена из 1 грамма (24 зерновки) семян озимой пшеницы сорта Куяльник методом ISO (21571:2005), которая затем использовалась для ПЦР анализа. Для навески отбирались выполненные визуально здоровые семена без каких-либо дефектов.

Праймеры 2 раунда, подобранные для идентификации фитопатогенов методом ПЦР

Патоген	Пара праймеров	Последовательность (5'→3')	Область генома	Ампликон (п.о.)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	ap3 (F)	TTGTTCTGGGCGAAGCATCAT	Oxidoreductase (ordA)	940
	ap4 (R)	CCAAAGGCGAAGCAGGGT		
<i>Alternaria alternata</i>	aa2 (F)	GGCGTCAGCAGAGGGAG	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GPD)	289
	aa3 (R)	ACACCCATAACGAACATGGGG		
<i>Penicillium spp.</i>	p18/2 (F)	ACTCTGCCTGAAGATTGTCGT	18S ribosomal RNA gene	249
	p18/3 (R)	CGGAATCGGAGGACGGG		
<i>Fusarium spp.</i>	fc3(F)	CCATCGAGAAGTTCGAGAAGGT	TEF1 gene	300
	fc4(R)	CCCAGGCGTACTTGAAGGAA		
<i>F. verticillioides</i>	Fv2(F)	ATCGTAAACCCGGCCAAGAC	TEF1 gene	302
	fv4(R)	GGAATGGGAGAGGGCAGAAAC		
<i>F. avenaceum</i>	fa3(F)	CGACTCGCTCCCTCATTCG	TEF1 gene	139
	fa4(R)	GTTTTGTGGGAACAGGGCAAG		
<i>F. oxysporum</i>	Fox2 (F)	GTCAACATACTGACATCGTTTC	TEF1 gene	328
	fox4(R)	ACGTGACGACGCACTCATT		
<i>F. equiseti</i>	fpeqin2(F)	TCCCCAGAATCAATACGCTAAC	β -tubulin gene	104

	fqqin3(R)	TCACTGGGTAACAAGGTCGAAGA		
F. sporotrichioides	fqspte2 (F)	CTCTCATACGACGACTCGACAA	tef1 gene	135
	Fqspte3 (R)	TGTGTGGGAAGGGCAAAAGC		
Myrothecium roridum	myr3 (F)	TGTCTTTAGTGGTTTTCTCCTCTGA	ITS-small subunit ribosomal RNA gene	306
	myr4 (R)	GAGACCGCCACTGAATTTTCG		
Albifimbria verrucaria	av3 (F)	GCTCAAGTCGCAACGAGATTC	calmodulin gene	272

Амплификация. Для анализа грибов рода *Fusarium*, *Myrothecium*, *Alternaria*, *Penicillium* и *Aspergillus* были проведены реакции nested-ПЦР со вложенной парой праймеров. В качестве сайтов-мишеней при выявлении видового разнообразия фузариума, определяемого в суммарной ДНК, использовались последовательности, указанные в таблице. Для определения видового разнообразия грибов семейства *Myrothecium* использовались последовательности ITS ДНК *M. roridum* и *M. verrucaria* (GenBank). В таблице содержится информация об используемых парах праймеров 2 раунда nested-ПЦР для определения видового разнообразия *Fusarium* spp., *Myrothecium* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus parasiticus* и *Alternaria alternata*, также приведены размеры амплифицируемых фрагментов (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Определяемые виды грибов рода *Fusarium* и рода *Myrothecium*, указанные в таблице, наиболее распространены в нашем регионе. Также методом nested-ПЦР в суммарной ДНК семян устойчивого к болезням сорта Куяльник определялись *Penicillium* spp., *Aspergillus parasiticus* и *Alternaria alternata*.

Реакция проводилась в 25 мкл, включающих 66 mM Tris-HCl (pH 8.4), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 % Tween 20, 7 % глицерол, 100 мкл-1 BSA, 0,2 mM каждого dNTP, 1,25 единиц Taq ДНК полимеразы (Thermo Fisher Scientific), 5 pM прямого и обратного праймеров и 10 нг ДНК.

Условия проведения полимеразной цепной реакции. Первый раунд: 3 мин денатурации при 95°C, затем 30 циклов, включающих денатурацию (1 мин, 95°C), отжиг (1 мин, 60°C), элонгацию (1 мин, 72°C), и 1 цикл финальной элонгации (7 мин, 72°C). Второй раунд: 30 циклов, включающих денатурацию (1 мин, 95°C), отжиг (1 мин, 60°C), элонгацию (1 мин, 72°C), и 1 цикл финальной элонгации (7 мин, 72°C). Продукты амплификации были разделены с помощью гель-электрофореза в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в конечной концентрации 5мкг/мл, использовался молекулярный маркер (M) фирмы ThermoScientific (GeneRuler 100 bp DNA) Визуализация проводилась в УФ свете при длине волны 302 нм.

Результаты и обсуждения

На рис 1. представлен электрофорез продуктов амплификации реакции nested-ПЦР с парами видоспецифичных праймеров к основным видам фузариума, наиболее

распространенным в нашем регионе на посевах пшеницы (*F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*).

Рис.1. Электрофорез продуктов амплификации образцов ДНК, выделенной из зерна сорта-стандарта Куяльник. №1-*Fusarium verticillioides*, №2- маркер, №3- *Fusarium avenaceum*, №4- *F. oxysporum*, №5-*F. equiseti*, №6- *F. sporotrichioides*, №7-контроль (вода).

Образец №1 демонстрирует большое количество ДНК-матрицы *F. verticillioides* (согласно табл.1. величина амплифицируемого фрагмента в этом случае 302 п.о.). В карман геля под номером 2 нанесен молекулярный маркер М (GeneRuler 100 bp DNA), позволяющий определять длину амплифицируемых фрагментов исследуемых образцов. Положительный сигнал на электрофорезе образца №3 говорит о наличии *F. avenaceum* в ДНК-матрице семян пшеницы сорта Куяльник (139 п.о. согласно табл.1).

Дорожка №4- содержит ампликоны размером 328 п.о., что соответствует длине амплифицируемого фрагмента с праймерами к *F. oxysporum*, №5- продукты реакции nested-ПЦР с праймерами к *F. equiseti* (104 п.о.), №6-*F. sporotrichioides* (135 п.о.), №7- контроль (вода). Методом ПЦР (в 1 раунд, количество циклов 45) в следовых количествах был обнаружен *Fusarium incarnatum* в образцах ДНК, выделенных из семян озимой пшеницы сорта-стандарта Куяльник.

На рисунке 2 представлены результаты реакции nested-ПЦР с праймерами к следующим фитопатогенам: *Penicillium spp.*, *Alternaria alternata*, *Aspergillus parasiticus*, *Myrothecium roridum* и *M. verrucaria*. Обнаружены следовые количества *Penicillium spp.* (дорожка №1- величина ампликона 249 п.о.). Яркий интенсивный сигнал образца №3 (величина ампликона 288 п.о.) говорит о наличии большого количества ДНК-матрицы *Alternaria alternata*. Фитопатогены *Aspergillus parasiticus* (№4), *Myrothecium roridum* (№5) и *M. verrucaria* (№6) в образцах ДНК, выделенных из семян озимой пшеницы сорта Куяльник урожая 2019 года не обнаружены.

Рис.2. Электрофорез продуктов амплификации образцов ДНК, выделенной из зерна сорта-стандарта Куяльник. №1-*Penicillium spp.*, №3- *Alternaria alternata*, №4- *Aspergillus parasiticus*, №5- *Myrothecium roridum*, №6- *M. verrucaria*, №7- контроль (вода).

Выводы

Семена озимой пшеницы сорта Куяльник (стандарта продуктивности и устойчивости к болезням) содержат значительное количество вредоносных фитопатогенов (*F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. incarnatum*, *Alternaria alternata*, *Penicillium spp.*). Возбудители *Myrothecium spp.* и *Aspergillus parasiticus* не были обнаружены в семенах данного сорта урожая 2019 года. Широкий спектр фитопатогенов в семенах пшеницы делает необходимым предпосевное протравливание семян фунгицидами для поддержания фитосанитарного здоровья посевов и сортов.

Библиография

1. Николаева С., Маржина Л., Николаев А. Патогенные свойства грибов рода *Myrothecium* Tode ex Fries, *Studia universitatis*, 2010, nr.1(31), 88-93.
2. GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
3. ISO 21571:2005(en) Foodstuffs — Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products — Nucleic acid extraction [Online]. URL: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:21571:ed-1:v1:en>
4. MycoBank Database <http://www.mycobank.org>