УДК:632.44:631.53.02

<https://doi.org/10.53040/gppb7.2021.10>

ИДЕНТИФИКАЦИЯ *FUSARIUM* SPP. И *ALTERNARIA* SPP. В СЕМЕНАХ НЕКОТОРЫХ ОВОЩНЫХ КУЛЬТУР

Дягилева А.В., Туманова Л.Г., Митин В.А., Грэждиеру К.Б.

Институт генетики, физиологии и защиты растений, Кишинэу, Республика Молдова

e-mail:angela.deaghileva@igfpp.md

Abstract

In this paper the results of molecular diagnostics of *Fusarium spp.* and *Alternaria spp.* in bell pepper and eggplant seeds of local genotypes at different time points of storage are presented. The diagnostics was effectuated using nested-PCR protocol with genus-specific and species-specific primers to *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. nivale*, *F. equiseti*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. avenaceum*, *A. alternata*, and *A. solani*. In the samples of studied bell pepper and eggplant genotypes *A. alternata* was found. In eggplant seeds certain species of *Fusarium spp.* were identified.

Key words: PCR, *Solanum melongena*, *Capsicum annuum*, *Fusarium*, *Alternaria*.

Введение

Fusarium и *Alternaria* – два крупных рода почвенных микромицетов тесно взаимодействующих с растениями. Большинство их видов вызывают болезни различных сельскохозяйственных культур, которые приводят к значительным потерям урожая и к катастрофическому ухудшению его качества [1]. В течении вегетационного периода патогены данных родов обнаруживаются во всех органах зараженных растений [2, 3]. Показано, что они системно передаются через инфицированные материнские растения в семена, достигая зародыша [4].

В последние годы семена стали международным товаром, используемым для обмена гермоплазмой по всему миру. Возникает опасность занесения патогенов растений на новые территории. Патогенная микрофлора, переносимая семенами, является причиной их гниения и некроза, снижение или полное подавление всхожести, гибели проростков, развитие системных болезней растений, как следствие - сокращение посевов и урожайности культур. Продукция из таких семян непригодна для употребления из-за снижения питательной ценности и часто за счет содержания микотоксинов опасных для здоровья человека и животных [5]. Таким образом, семена могут быть источником фитосанитарного риска при их импорте и использовании в сельскохозяйственных целях, так как высока вероятность акклиматизации и распространения, связанных с семенами карантинных организмов [6].

Установлено, что патогены родов *Fusarium* и *Alternaria* вызывают максимальные потери урожая **перца сладкого** (*Capsicum annuum*) и **баклажана** (*Solanum melongena*), вызывая различные виды сосудистых заболеваний и гнили [7-9].

Цель данной работы – ПЦР-идентификация грибков родов *Fusarium* и *Alternaria* в семенах перца сладкого (*Capsicum annuum*) и баклажана (*Solanum melongena*) различных сроков хранения селекции ИГФЗР. Молекулярный анализ проведен посредством двухстадийной и мультиплекс ПЦР и набора праймеров, разработанных для общих и видоспецифичных областей геномов вышеупомянутых патогенов.

Материалы и методы

В исследовании были использованы семена нескольких сортов перца сладкого ('Fildeș', 'Caolin', 'Excelent') и баклажана ('Vănatic', 'Rada', 'Laura', 'Magda') различных сроков хранения. Выделение суммарной ДНК проводили СТАВ-методом из 150-200 мг растительного материала [10]. Для идентификации *Fusarium spp.* и *Alternaria spp.* был осуществлен дизайн собственных праймеров как описано ранее [2].

ПЦР проводилась в 25 µl реакционной смеси, содержащей 66 mM трис-HCl (pH-8.4), 16 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂, 0.1% Tween 20, 7% глицерина, 100 mkg/ml BSA (Bovin Serum Albumin), по 0.2mM каждого из dNTP, по 5 pM праймера и 0,2 единицы Taq-полимеразы (Thermo Fisher

Scientific), 10 нг ДНК. В качестве молекулярного маркера использовался 100 kb DNA ladder (Thermo Fisher Scientific).

Первый раунд двухстадийной ПЦР включал: 1 цикл при 95° С (денатурация) в течение 3 мин, 60° С (отжиг) - 1 мин, 72° С (элонгация) - 1 мин, затем 29 циклов: 95° С – 1 мин, 60° С - 1 мин, 72° С - 1 мин. Условия второго раунда: 95° С - 1 мин, 60° С - 1 мин, 72° С - 1 мин (30 циклов).

Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле при 6 В/см в TBE буфере (pH 8.0) с бромидом этидия, визуализировали в УФ (302 нм) и фотографировали.

Результаты и обсуждение

Для выявления потенциальной фузариозной и/или альтернариозной инфекции в исследуемом материале в двухстадийной ПЦР были использованы праймеры созданные на основе неспецифичных участков последовательностей геномов *Fusarium spp.* и *Alternaria spp.* Результат молекулярного анализа показал присутствие ДНК *Alternaria spp.* во всех генотипах баклажана и перца, за исключением одного образца 'Fildeș' (*Capsicum annuum*, 2011). Патогены рода *Fusarium* были обнаружены только в семенах баклажана. Суммарно результаты молекулярного анализа ДНК семян перца и баклажана с использованием праймеров для выявления *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, а также видов *A. alternata* и *A. solani* представлены в таблице 1.

Таблица 1. *Fusarium spp.* и *Alternaria spp.* в семенах перца сладкого и баклажана различных сроков хранения

Генотип Патоген	Перец сладкий									Баклажан					
	2011			2015			2020			2011			2018		
	F	C	E	F	C	E	F	C	E	V	R	L	M	R	M
<i>Fusarium spp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>Alternaria spp.</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. alternata</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

F - 'Fildeș', C - 'Caolin', E - 'Excelent', V - 'Vănatic', R - 'Rada', L - 'Laura', M - 'Magda'.

Fusarium spp. идентифицирован у сортов баклажана: 'Vănatic', 'Laura', 'Magda' – урожая 2011 года, 'Magda' – 2018. *Alternaria spp.* выявлена во всех генотипах перца и баклажана, за исключением сорта 'Fildeș' (*Capsicum annuum*, 2011). В семенном материале различных сроков хранения была обнаружена *A. alternata*. *A. solani* в исследованных образцах отсутствует. Примеры синтеза фрагментов, демонстрирующих присутствие патогенной ДНК в растительном материале, показаны на рисунке 1.

Рисунок 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР при использовании праймеров для обнаружения *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.* (А) и *A. alternata* (Б) в ДНК семян баклажана. А, Б: 1, 5. 'Magda'; 2, 6. 'Rada'; 3. 'Vănatic'; 4. 'Laura'

В результате проведения мультиплекс-ПЦР (рис.1А.) фрагмент длиной 150 п.о. означает наличие патогенов рода *Alternaria* во всех исследованных генотипах баклажана. Фрагмент длиной 300 п.о. показывает присутствие ДНК *Fusarium spp.* в семенах сорта 'Magda' как 2011 г (А.1), так и 2018 г (А.5), а также в семенах сортов 'Vănatic' (А.3) и 'Laura' (А.4). В семенах сорта 'Rada' данный фрагмент отсутствует. Как результат двухстадийной ПЦР (рис.1Б.) синтезировался фрагмент длиной 289 п.о. во всех образцах при использовании праймеров для обнаружения *A. alternata*.

Далее была проведена молекулярная идентификация различных видов *Fusarium* с использованием специфических праймеров для выявления *F. solani*, *F. avenaceum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. nivale*, *F. culmorum*, *F. equiseti*. Результаты ПЦР-анализа ДНК семян баклажана по выявлению видового состава грибов рода *Fusarium* представлены в таблице:

Таблица 2. Идентификация видов *Fusarium spp.* в семенах *Solanum melongena* различных сроков хранения

Год закладки на хранение	Генотипы	Fo	Fv	Fa	Fn	Fc	Fe	Fs
2011	Vănatic	-	+	-	-	-	-	-
	Rada	-	-	-	-	-	-	-
	Laura	-	+	-	-	-	-	-
	Magda	-	+	+	-	-	-	-
2018	Rada	-	-	-	-	-	-	-
	Magda	-	+	-	-	-	+	-

Fo - *F. oxysporum*, Fv - *F. verticillioides*, Fa - *F. avenaceum*, Fn - *F. nivale*, Fc - *F. culmorum*, Fe - *F. equiseti*, Fs - *F. solani*.

В большинстве изученных сортов баклажана обнаружен *F. verticillioides*: 'Vănatic', 'Laura', 'Magda' – урожая 2011 года, 'Magda' – 2018. В единичных случаях в семенах сорта 'Magda' выявлен *F. avenaceum* (урожай 2011 года) и *F. equiseti* (урожай 2018 года).

Результат двухстадийной ПЦР, демонстрирующий присутствие патогенов *F. verticillioides*, *F. avenaceum* и *F. equiseti* в исследованных образцах ДНК баклажана, выборочно показан на рисунках 2 и 3.

Рисунок 2. Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров для выявления *F. equiseti* в генотипах баклажана.

1, 5. 'Rada', 2, 6. 'Magda', 3. 'Vănatic', 4. 'Laura'.

Рисунок 3. Электрофореграмма ПЦР-продуктов с использованием праймеров для выявления видов фузариума в ДНК семян сорта 'Magda'.

1. *F. solani*, 2. *F. nivale*, 3. *F. avenaceum*, 4. *F. culmorum*, 5. *F. verticillioides*, 6. *F. oxysporum*.

Ампликон размером 104 п.о., полученный в результате действия специфических праймеров к *F. equiseti*, выявлен только у сорта 'Magda' (рис. 2.6). В результате проведения двухстадийной ПЦР с использованием праймеров для выявления *F. avenaceum* во втором раунде синтезируется фрагмент длиной 140 п.о. Пример синтеза данного фрагмента на ДНК сорта 'Magda' показан на рисунке 3.3. Здесь же, ампликон размером 160 п.о. указывает на присутствие в семенном материале данного сорта *F. verticillioides* (рис. 3.5).

Выводы

Проведена молекулярная идентификация *Fusarium spp.* и *Alternaria spp.* в семенах перца сладкого и баклажана различных сроков хранения. *Alternaria spp.* выявлена во всех генотипах перца и баклажана, за исключением сорта 'Fildeș' (*Capsicum annuum*, 2011). В семенном материале различных сроков хранения была обнаружена *A. alternata*. *A. solani* в исследованных образцах отсутствует. *Fusarium spp.* обнаружен только в семенах баклажана: 'Vănatic', 'Laura', 'Magda' – урожая 2011 года, 'Magda' – 2018. В семенах сорта 'Magda' разных сроков хранения обнаружены патогены *F. verticillioides*, *F. avenaceum* и *F. equiseti*, в семенах 'Vănatic' и 'Laura' урожая 2011 года - *F. verticillioides*. В семенах сорта 'Rada' патогены рода *Fusarium* отсутствуют.

Исследования проведены в рамках проекта Государственной Программы 20.80009.5107.11 «Длительное сохранение генетических ресурсов растений в геномном банке с использованием методов молекулярной биологии в тестировании состояния здоровья растительной зародышевой плазмы», финансируемой Национальным Агентством по Исследованиям и Развитию Республики Молдовы.

Литература

1. СОКОЛОВА, Л.М., БУХАРОВ, А.Ф., ИВАНОВА, М.И. Применение последовательных отборов при селекции моркови столовой на устойчивость к *Fusarium* sp. и *Alternaria* sp. В: *Аграрная наука*, 2020, том 339, № 6, с. 78–83.
2. DEAGHILEVA, A., MITIN, V., GRAJDIERU, C., TUMANOVA, L. Monitoring of *Alternaria* spp. and *Fusarium* spp. mixed infections in symptomless tomato plants, using molecular methods of plant pathogen identification. В: *Инновационные аспекты улучшения сельскохозяйственных культур* Интернациональная научно-практическая конференция, Pașcani, IFP, 2018, с. 425-428.
3. DEAGHILEVA, A.D., MITIN, V.A., GRAJDIERU, C.B., TUMANOVA, L.G. Molecular identification of *Fusarium* species in tomato. В: *Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего* материалах Международная научная конференция, Санкт-Петербург, АФИ, 2017, с. 451-454.
4. NALLATHAMBI, P., UMAMAHESWARI, C., SANDEEP, K. Lal et al. Mechanism of Seed Transmission and Seed Infection in Major Agricultural Crops in India. In book: *Seed-Borne Diseases of Agricultural Crops: Detection, Diagnosis & Management*. 2020, p. 749-791.
5. AMZA, J. Seed Borne Fungi; Food Spoilage, Negative Impact and Their Management: A Review. In: *J. Food Science and Quality Management*. 2018, vol. 81, p. 70-79.
6. Международные стандарты по фитосанитарным мерам № 38 (МСФМ). Международное перемещение семян, 2018, https://snund.am/wp-content/uploads/2018/10/ISPM_38.pdf.
7. CRUZ-CABRAL, L., TERMINIELLO, L., FERNÁNDEZ-PINTO, V. et al. Natural occurrence of mycotoxins and toxigenic capacity of *Alternaria* strains from moldy peppers. In: *Int. J. Food Microbiol.*, 2016, v. 236, p. 155-160.
8. PAWAR, S., KHAIRE, P., MANE, S. Management Strategies Used against Fungal Diseases of Capsicum. In: *J. AgriCos e-Newsletter*, 2020, v. 1, issue 5, № 8, p. 22-26.
9. HABIB, A., SHAHBAR, T.S., GHAZANFAR, M.U., ALI, S. et al. Location of Seed-borne Mycoflora of Eggplant (*Solanum melongena*) in different Seed Components and Impact on Seed Germinability. In: *Int. J. of Agric. and Biol.*, 2007, v. 9. № 3, p. 514-516.
10. 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>