

Семенова Юлия Вячеславовна

магистрант

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Хамбикова Анастасия Владимировна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Хузина Рузалия Маратовна

младший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

Соловьев Алексей Вячеславович

канд. биол. наук, доцент, заместитель директора, старший научный сотрудник

Научно-исследовательский центр фундаментальных и прикладных проблем биоэкологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова»

г. Ульяновск, Ульяновская область

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИТОПАТОГЕНА, ВЫЗЫВАЮЩЕГО РЖАВЧИНУ ЧЕСНОКА

*Аннотация: работа посвящена разработке и созданию ПЦР-тест-системы для диагностики фитопатогена *Rhizoctonia allii*, вызывающего заболевание «ржавчина чеснока» и приводящего к значительным потерям урожая,*

снижению пищевой ценности и товарных качеств культуры. Предлагаемый метод диагностики характеризуется возможностью диагностирования фитопатогена в разных объектах: в воде для орошения, грунте, посевном материале, фрагментах растений и других, что позволяет предпринять превентивные меры по устранению заболевания.

Ключевые слова: ржавчина чеснока, *Russinia allii*, полимеразная цепная реакция, молекулярно-генетическая идентификация.

Одним из наиболее важных патогенов чеснока, приводящего к существенной потере урожая, является гриб *Russinia allii* (DC.) F. Rudolphi, однако выявлять его на ранних стадиях развития в настоящее время оказывается практически невозможно. Используемые в настоящее время методы диагностики трудоемки, требуют значительного времени и не всегда являются эффективными. В связи с этим возникает необходимость развития методов и подходов эффективной, быстрой диагностики фитопатогена на ранних этапах развития заболевания.

R. allii обнаружен практически во всех регионах мира. В последние годы было отмечено усиление наносимого вреда ржавчиной чеснока, вызывающая резкое снижение урожая, пищевой ценности и товарных качеств культуры.

В основе предлагаемого способа диагностики фитопатогена находится полимеразная цепная реакция (ПЦР) [1], которая обладает рядом преимуществ для диагностики, так как она позволяет в относительно короткие сроки определить наличие возбудителя по следовым количествам, а также использовать в качестве пробы не только само растение, но и другие объекты – воду для орошения, грунт, посевной материал и др. [2; 3].

Материалы и методы.

Для исследования использовали образцы тканей семеновского чеснока (КФХ), пораженные видом *R. allii*. Идентификацию микроорганизмов проводили по комплексу морфологических и биохимических признаков.

Для выделения нуклеиновых кислот использовали комплект реагентов GeneJET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific).

В качестве молекулярно-генетического маркера использовали участок *ITS*; этот маркер характеризуется относительно высокой консервативностью, хорошей изученностью, а также большим количеством нуклеотидных последовательностей в открытых базах данных по изучаемому и близким видам [4].

Анализ биоинформационных данных, вычисление попарных молекулярных дистанций (Pairwise Distances) и дизайн тест-системы осуществляли в программе MEGA 6 [5]. Нуклеотидные последовательности заимствовали из баз данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) и BOLD (<http://www.boldsystems.org/>).

Температуру плавления праймеров и возможные вторичные структуры определяли («шпильки» и димеры) с помощью ресурса OligoAnalyzer (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>).

ПЦР проводили в амплификаторе qTOWER 2.2 (Analytik Jena). Применяли два способа детекции ПЦР-продукта: «по конечной точке» (электрофоретический) и «в режиме реального времени» (с использованием интеркалирующих красителей).

Гель-электрофорез проводили в 1% агарозном геле, в качестве интеркалятора использовали бромистый этидий; напряжение 80 В, 40 минут. Гель-документирование – с помощью системы BioDocAnalyze (Biometra).

Для проведения ПЦР использовали SNP-detect полимеразу (Евроген), которая характеризуется отсутствием 5'>3' и 3'>5' экзонуклеазной активности, что позволяет ее эффективно применять для детекции молекулярно-генетических полиморфизмов.

Результаты исследования.

Всего в анализ были включены более пятидесяти последовательностей фрагмента *ITS* изучаемого вида, а также более тридцати близкородственных и некоторых других грибов, также встречающихся в исследуемых материалах. Анализ внутривидовых дистанций показал слабую внутривидовую диверген-

цию у представителей *P. allii*: до 0,013. Между близкими видами наблюдается сильная дивергенция с молекулярными дистанциями от 0,011 до 0,180. Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать маркер *ITS* в качестве перспективного для видовой идентификации фитопатогена.

В результате анализа нуклеотидных последовательностей были сконструированы следующие праймеры для диагностики *P. allii*:

- прямой: 5' – AGTAGCAATACTTGCCATCTTG – 3';
- обратный: 5' – AAAATTCTGGAGTTTAGTCCACC – 3'.

Праймеры фланкируют фрагмент *ITS* длиной около 120 пар нуклеотидов. Области гибридизации праймеров содержат от 4 до 5 нуклеотидов, отличающих *P. allii* от других анализируемых видов. Расчетные температуры плавления праймеров – около 61,5 °С.

Объем реакционной смеси ПЦР – 20 мкл. Состав: SNP-detect полимеразы – 0,1 ед./мкл, реакционный буфер – 1х, dNTP – 1х, праймеры – 0,2 мкМ каждого, SybrGreen – 1х. Для реакции использовали 2 мкл выделенной ДНК.

Для расчета оптимальной температуры отжига праймеров использовали метод градиентной полимеразной цепной реакции:

1. 95 °С – 3 мин.
2. 95 °С – 30 с.
3. Градиент 55 °С, 58 °С, 60 °С, 62 °С, 65 °С, 67 °С – 20 с (детекция по каналу FAM).
4. 72°С – 20 с.

Повторение шагов 2–4 в количестве 45 раз.

5. 72°С – 3 мин.

Все полученные графики флуоресценции демонстрируют четкую S-образную форму (рисунок 1), значения порогового цикла (Ct, при threshold = 1) представлены в таблице 2.

Значения порогового цикла (Ct)

№ реакции	Ct
1	20,67
2	20,08
3	19,36
4	18,81
5	19,23
6	27,5

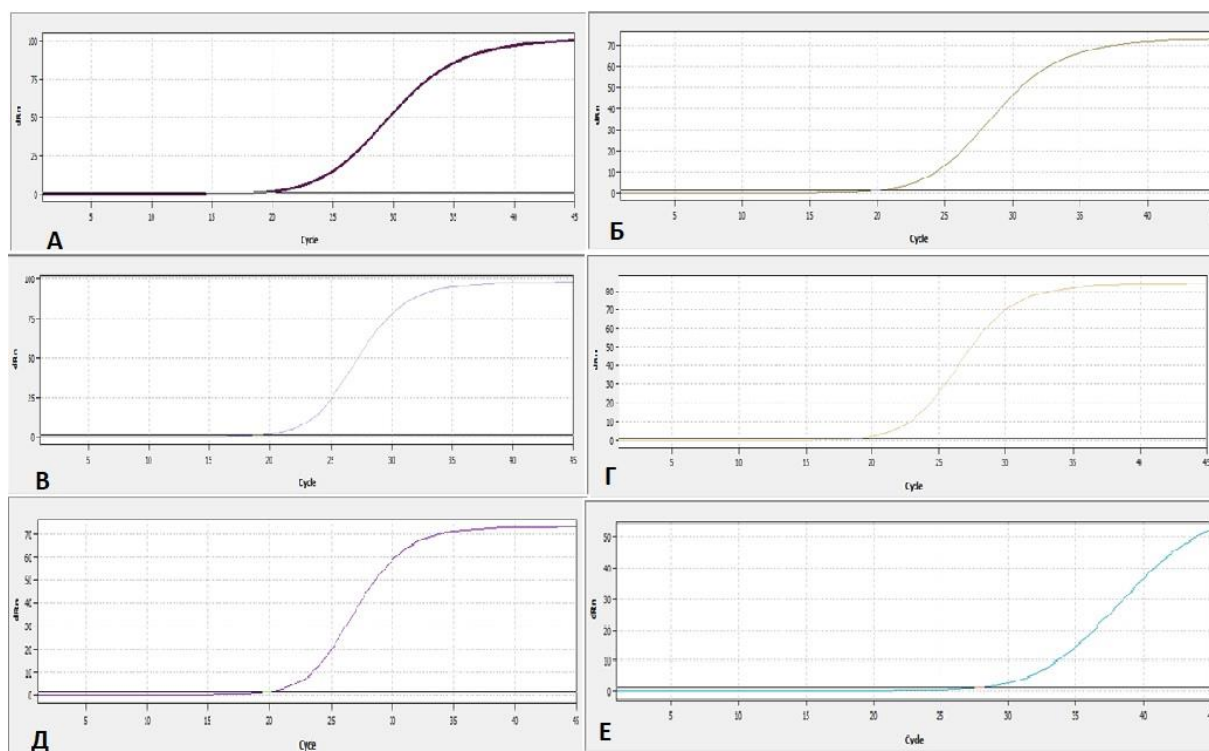


Рис. 1. Изменение уровня флуоресценции по каналу FAM при разных температурах отжига: 55 °C (A); 58 °C (B); 60 °C (B); 62 °C (Г); 65 °C (Д); 67 °C (E)

Длины полученных ПЦР-продуктов – около 120 п.н. (рис. 2), что соответствует ожидаемому.

Полученные данные позволяют утверждать об успешно проведенной ПЦР и работоспособности тест-системы. Следует отметить ухудшение выхода целевого продукта при повышении температуры отжига праймеров (свыше 67 °C). Таким образом, оптимальная температура отжига – 65 °C.

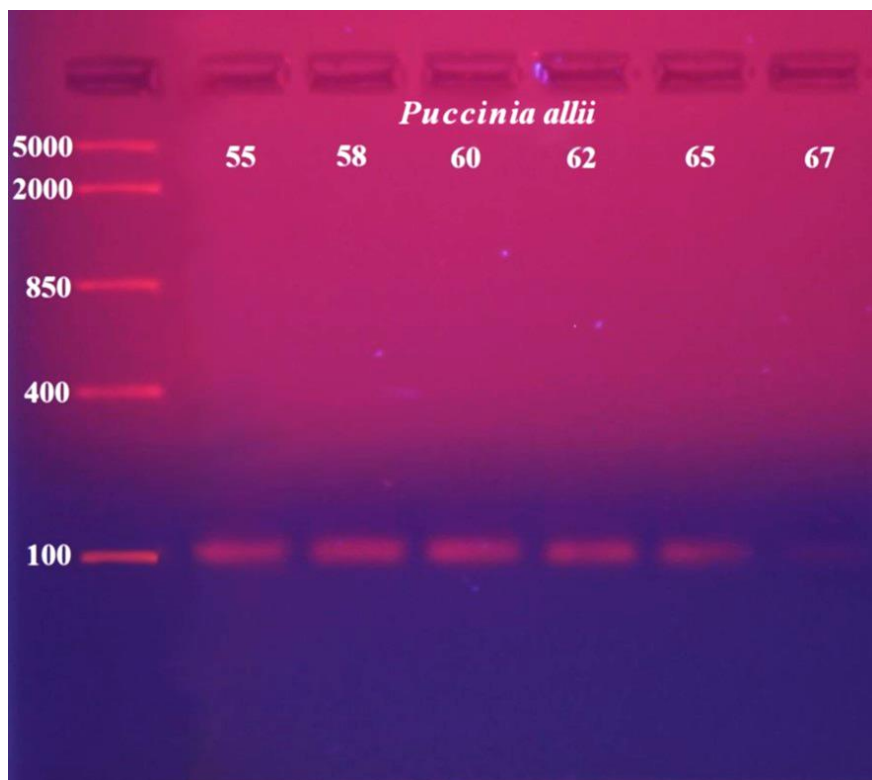


Рис. 2. Фотография гель-электрофореза продуктов ПЦР

Таким образом, разработана и апробирована ПЦР-тест-система, позволяющая выявить наличие или отсутствие представителей *Puccinia allii* в пробах растений, грунта, воды для орошения и другом материале.

Требуется дальнейшее проведение исследований для анализа эффективности тест-системы при присутствии ДНК других микроорганизмов и при разных начальных концентрациях ДНК фитопатогена.

Список литературы

1. Зорина В.В. Основы полимеразной цепной реакции (ПЦР): методическое пособие. – М.: ДНК-Технология, 2012. – 80 с.
2. Кутлунина Н.А. Молекулярно-генетические методы в исследовании растений: учеб.-метод. пособие. – Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 142 с.
3. Оберемок В.В. Методические рекомендации к применению ПЦР-метода. – Симферополь: Таврический национальный университет им. В.И. Вернадского, 2013. – 35 с.

4. Хлесткина Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, №4/2. – С. 1044.

5. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Molecular Biology and Evolution. 2016. Vol. 33. P. 1870–1874.