

О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Південний біотехнологічний центр в рослинництві УААН,
Овідіопольська дор., 3, Одеса-36, 65036, Україна, тел.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

ПЛР-АНАЛІЗ МІНЛИВОСТІ ГЕНОМУ ТА РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ГРИБІВ РОДУ *FUSARIUM*

Дослідження внутрішньоштамової варіабельності ДНК Fusarium moniliforme Sheldon var. lactis показало, що при контакті зі стійкими та сприйнятливими до фузаріозу генотипами кукурудзи, при різних термінах культивування та серіях пасажів, спостерігаються зміни у електрофоретичних спектрах штамів. При дослідженні мінливості геному серед колекційних та свіжовиділених штамів F. moniliforme виявлено, що рівень поліморфізму в межах цих груп складає 49,4 % та 97,9 %, відповідно. Розподіл свіжовиділених штамів за даними кластеризації відповідає спеціалізації за перевагою до живильного субстрату рослини-хазяїна. Розроблено систему ПЛР-детекції фузарій з використанням родо-, видо- та штамоспецифічних послідовностей нуклеотидів ДНК.

К л ю ч о в і с л о в а: полімеразна ланцюгова реакція, Fusarium, варіабельність геному, ПЛР-детекція фузарій.

Фузарієві гриби є космополітами і уражують майже всі агрономічно важливі культури [2]. Вірогідність і ступінь ураження кукурудзи фузаріями набагато вищі, ніж у інших злакових рослин, що використовують в рослинництві. Це обумовлено особливостями будови і компонентного складу рослин та насіння кукурудзи, які забезпечують грибам оптимальне середовище існування і живильний субстрат. Причиною фузаріозу зерна кукурудзи є гриб *F. moniliforme Sheldon var. lactis*. Для представників роду *Fusarium* характерний високий ступінь мінливості морфологічних, фізіологічних і молекулярно-генетичних ознак, що приводить до подолання резистентності стійких до фузаріозного ураження рослин кукурудзи [3]. Молекулярно-генетичний аналіз організації та динаміки мінливості геномів даних грибів дозволить розглядати проблему цілісно: рослина-хазяїн – патоген.

ДНК-технології на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) дозволяють проводити дослідження консервативних та варіабельних регіонів геному [9]. Роль консервативних ділянок полягає в регулюванні життєво важливих функцій та їх послідовності, які не змінюються, чи змінюються незначно протягом еволюції. Варіабельні регіони представлені набором олігонуклеотидних послідовностей, які схильні до змін під дією зовнішніх чинників, що, в першу чергу, еволюційно необхідно для підтримки відповідного гомеостазу організмів у популяції. Зменшення чи збільшення таких послідовностей визначається високою частотою подій нерівного кросинговеру в рекомбінаційних точках, що є одною з причин значного геномного поліморфізму [10].

© О. О. Захарова, Н. Е. Кожухова, Ю. М. Сиволап, 2008



Інформація про молекулярно-генетичний поліморфізм, мінливість структури популяцій грибів роду *Fusarium* при утриманні на зразках кукурудзи різних сортів, а також створення системи ПЛР-діагностики збудників фузаріозу може слугувати важливим ключем для захисту людини від мікотоксикозів та урожаю кукурудзи від ураження фузарієвими грибами, що і визначає мету наших досліджень.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугували штами *F. moniliforme var. lactis* 94 m (Fmon94m) і *F. moniliforme var. lactis* 34-17 (Fmon34-17), контрастні за ознаками патогенності (високо- та слабкопатогенний, відповідно) з колекції відділу фітопатології та ентомології Селекційно-генетичного інституту — Національного центру насіннезнавства та сортовивчення УААН (СГІ, Одеса). Штами зберігалися на штучних живильних середовищах (ЖС) [2]. Відновлення патогенності здійснювали шляхом «проведення» штамів «через рослину» [1] з використанням зерен контрастних за стійкістю до фузаріозу генотипів кукурудзи (стійка лінія — Одеська 139 (Од139) і сприйнятлива лінія — R221A). Повітряний міцелій з поверхні зерен пересівали у чашки Петрі з ЖС Чапека (30 г глюкози, 2 г NaNO_3 , 1 г KH_2PO_4 , 0,5 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5 г KCl , 18 мг $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, 1000 мл dH_2O) і культивували в термостаті при температурі 24 °С 7, 14, 21 добу. Виділення ДНК здійснювали згідно методики [12].

Для дослідження внутрішньовидового поліморфізму використовували довільні вибірки *F. moniliforme var. lactis*: 31 штам з колекції Південного біотехнологічного центру в рослинництві УААН (ПБЦ, Одеса) та 18 штамів з колекції СГІ. Умови проведення ДП (довільно праймованого)-ПЛР-аналізу, електрофорезу та комп'ютерної обробки даних згідно [4, 7, 8].

Дослідний матеріал та умови ПЛР-детекції наведені у [5, 11].

Результати та їх обговорення

Подолання захисних систем рослини та розвиток інфекції на стійких генотипах обумовлений лабільністю генетичного апарату фітопатогенних грибів роду *Fusarium*. Тривале культивування фузарій в умовах лабораторії на штучному ЖС призводить до фенотипового перетворення мікроорганізмів (зміна біохімічних і фізіологічних процесів) [2]. З одного боку, це пов'язано з активацією або пригніченням експресії генів [14], з іншого — з накопиченням спонтанних мутацій, з рекомбінацією ДНК, переміщенням мобільних генетичних елементів, внаслідок чого відбувається добір найбільш пристосованих до умов існування генотипів [13].

При дослідженні внутрішньоштамової молекулярно-генетичної мінливості моноспорових зразків роду *Fusarium* в лабораторних умовах при різних термінах культивування та внаслідок пасажів культур штамів спостерігалися зміни їх електрофоретичних спектрів. ПЛР з праймером OPB-05 (5'-tgcgcccttc-3') дозволила виявити поліморфні фрагменти у спектрах різних варіантів штамів, відтворювані при повторних експериментах та ампліфікації. На рисунку 1 показана електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ДНК штаму Fmon94m (доріжка № 1) та його варіантів, які вирощували на кукурудзі генотипів Од139 та R221A протягом 7, 14 та 21 доби.

Виявлено, що при контакті штаму Fmon94m, що зберігався, із зернами стійкого до фузаріозу генотипу кукурудзи, спостерігається зміна в його ДНК-



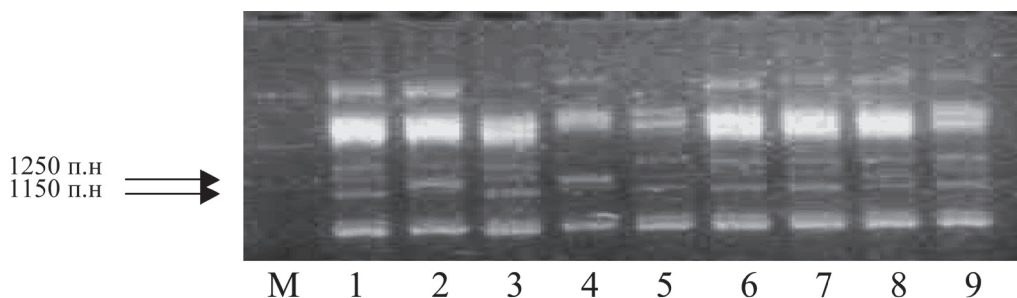


Рис. 1. Електрофореграма розподілу продуктів ампліфікації ДНК з праймером ОРВ-05 культур штаму *F. moniliforme var. lactis* 94 т, які вирощували на різних за стійкістю до фузаріозу зернах кукурудзи протягом 7, 14, 21 діб.

1 — ДНК штаму Fmon94m, який тривало зберігався у колекції; культури штаму Fmon94m; 2 — ДНК Fmon94m/Од139; 3 — ДНК Fmon94m/R221A; 4 — ДНК Fmon94m/Од139/7; 5 — ДНК Fmon94m/R221A/7; 6 — ДНК Fmon94m/Од139/14; 7 — ДНК Fmon94m/R221A/14; 8 — ДНК Fmon94m/Од139/21; 9 — ДНК Fmon94m/R221A/21. М — маркер молекулярної ваги pGEM.

Fig. 1. Electrophoregram of DNA amplification products distribution with ORV-5 *F. moniliforme var. lactis* 94 m strain culture primer grown on different to fusarium resistance maize grains for 7, 14, 21 days.

1 — Fmon94m strain DNA, kept prolonged at the collection; Fmon94m strain culture; 2 — Fmon94m/Od 139 DNA; 3 — Fmon94 m/R 221A DNA; 4 — Fmon94m/Od139/7 DNA; 5 — Fmon94m/R 221A/7 DNA; 6 — Fmon94m/Od139/14 DNA; 7 — Fmon94m/R221A/14 DNA; 8 — Fmon94m/Od139/21; 9 — Fmon94 m/R221/A/21. M — molecular weight pGEM marker

спектрі варіанту (Fmon94m/Од139), яка полягала у зникненні фрагменту в 1150 п. н. і появи фрагменту розміром 1250 п. н. (рис. 1, доріжка 2) при порівнянні із спектрами ДНК Fmon94m з колекції і варіанту, який вирощений на сприйнятливому генотипі кукурудзи (Fmon94m/R221A). Профіль ДНК культури штаму Fmon94m/R221A, залишився ідентичним спектру Fmon94m/R221A (рис. 1, дор. 1, 3). Семидобове культивування на середовищі Чапека показало, що ДНК культури Fmon94m/Од139/7 також мала фрагмент розміром 1250 п. н. і позбавлена фрагменту в 1150 п. н. (рис. 1, дор. 4). Спектр ДНК Fmon94m/R221A/7 (рис. 1, дор. 5) такий самий, як і в доріжках 1 та 3. Виснаження ЖС і відсутність вільного простору для росту міцелію є факторами, при яких настає «старіння» культур. Спектри ДНК, що виділена з 14 — 21-добових культур, при ПЛР-ампліфікації не мали фрагментів, що відрізнялися, у культур, вирощених на зернах як стійкого, так і сприйнятливого генотипів кукурудзи (рис. 1, дор. 6 — 9) і співпадали із спектром ДНК колекційного штаму. Дослідження ДНК культур слабкопатогенного штаму Fmon94m/R221A також дозволило виявити відтворні поліморфні фрагменти молекулярною вагою 1250 п. н. у культур, патогенні властивості яких відновлювали на стійкому (Од139) до фузаріозу генотипі кукурудзи. На відміну від культур *F. moniliforme var. lactis* 94m, культури *F. moniliforme var. lactis* 34-17, зберігали придбаний фрагмент впродовж усіх трьох термінів культивування (дані не приведені).

При ПЛР-аналізі мінливості штамів унаслідок п'яти пасажів не виявлено змін у спектрі ампліфікованої ДНК культур (Fmon34-17/R221A і Fmon34-17/Од139) слабо патогенного штаму Fmon34-17. Дослідження впливу пасажів на мінливість ДНК високопатогенного штаму дозволило виявити відмінності у спектрах ампліфікації його культур (Fmon94m/R221A і Fmon94m/Од139), що проявилось у появі та зникненні фрагментів ампліфікації розміром 2700 п. н., 1250 п. н. і 900 п. н. протягом трьох пасажів та стабілізацією спектрів у четвертому, п'ятому пасажах.

Показано, що спектр ДНК культур штаму, що тривало зберігалися в лабораторних умовах, відрізняється від ДНК-спектрів культур, які вирощені на зернах рослини-хазяїна. Культивування штамів, відмінних за ознаками патогенності на різних за стійкістю до збудника генотипах кукурудзи, призводить до різного ступеня часової стабільності (мінливості) спектрів ДНК. Аналогічні дослідження проведені на штамі молочнокислих бактерій *Oenococcus oeni*, де показано, що різні умови культивування призводять до змін у ДНК-спектрах цих бактерій [6].

Еволюція фузарій тісно пов'язана зі зміною субстрату, зокрема рослинного походження [3]. При вивченні генетичної варіабельності довільної вибірки з 31 штаму *F. moniliforme var. lactis*, свіжовиділених з уражених зерен кукурудзи за допомогою ДП-ПЛР аналізу, виявлено, що рівень поліморфізму серед штамів дорівнює 97,9 % [8], у протилежність рівню поліморфізму, який складає 49,4 %, вибірки з 18 штамів *F. moniliforme var. lactis*, виділених з різних генотипів кукурудзи, але тривало зберігалися і багато разів пересівалися на штучних ЖС [7]. Низький рівень поліморфізму «старих» культур свідчить про збалансованість генотипів штамів в умовах певного температурного режиму і складу живильних речовин. Висока ступінь поліморфізму «свіжих» штамів може обумовлюватися конкуренцією за живильний субстрат та тиском захисних систем рослини-хазяїна.

Обробка даних ДП-ПЛР-аналізу за допомогою комп'ютерної програми «MEGA 4.0» [8] (кластерний аналіз та конструювання дендрограм) дозволило виявити, що при кластеризації «старих» штамів *F. moniliforme var. lactis* не спостерігається закономірності угруповання зразків (дані не приведені). На дендрограмі (рис. 2), що побудована за даними молекулярно-генетичного аналізу «свіжих» штамів, виявлено розподіл штамів у два кластери, які відповідають зразкам, виділеним з білозерних та жовтозерних форм кукурудзи, відповідно. Усередині кластерів спостерігається угруповання у субкластери, які відобразили спорідненість штамів, ізольованих з певної рослини-хазяїна. Рівень поліморфізму у субкластерах варіював у діапазоні 64,5 % – 72,7 %, що показує відносно слабку дивергенцію геномів штамів *F. moniliforme var. lactis* в межах однієї рослини, з якої вони були ізольовані. В той же час, субкластери генетично віддалені один від одного, що, можливо, пов'язано зі спеціалізацією даних фітопатогенів до живильного субстрату рослини-хазяїна.

Виявлення послідовностей нуклеотидів ДНК, які специфічні до роду та окремих видів фузарій, надає можливість їх молекулярно-генетичної ідентифікації. Специфічні нуклеотидні послідовності ДНК є консервативними. Детекція здійснюється за рахунок молекулярної ДНК:ДНК гібридизації, або за допомогою ПЛР-аналізу шляхом синтезу і ампліфікації специфічних до даного роду чи видів ПЛР-фрагментів.



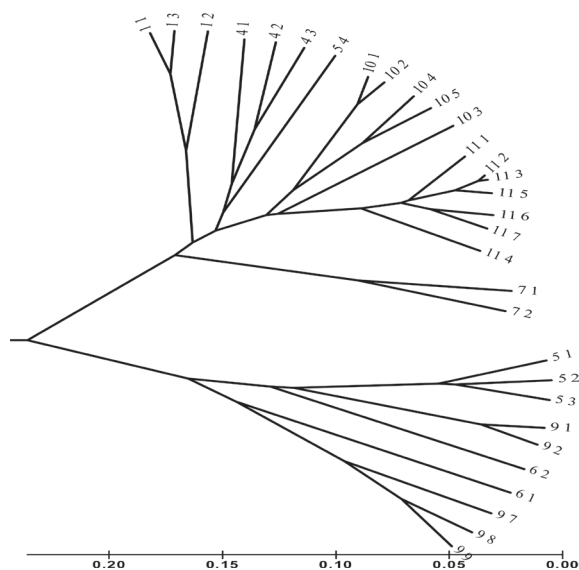


Рис. 2. Дендрограма феногенетичних відносин 31 штаму *F. moniliforme var. lactis*, що сконструйована за даними ДП-ПЛР.

Fig. 2. Dendrogram of phenogenetic relations of 31 *F. moniliforme var. lactis* strain, designed upon the DP-PLR data.

На рисунку 3 наведено приклад ПЛР-детекції специфічних послідовностей роду *Fusarium* та видів *F. moniliforme*, *F. graminearum* у зерні кукурудзи, що є показником наявності інфекції.

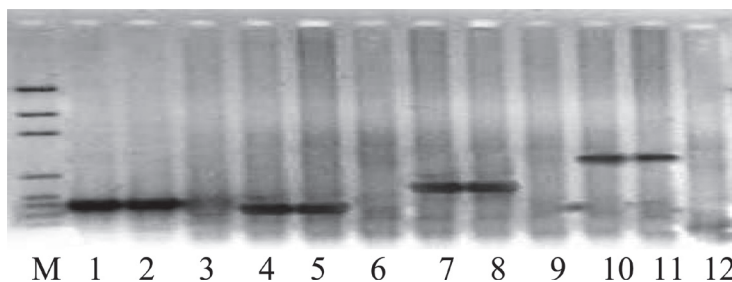


Рис. 3. Детекція роду *Fusarium* та видів *F. moniliforme*, *F. graminearum* у зерні кукурудзи.

1, 4 – позитивний контроль роду *Fusarium* (ДНК чистих культур 8 видів); 2, 5, 8, 11 – зерно кукурудзи (лінія ГК26); 3, 6, 9, 12, 15 – контроль контамінації; 7 – позитивний контроль виду *F. moniliforme*; 10 – позитивний контроль виду *F. graminearum*; М – маркер молекулярної ваги рGEM.

Fig. 3. Genus *Fusarium* and species *F. moniliforme*, *F. graminearum* detection of maize grains.

1, 4 – positive control of genus *Fusarium*; 2, 5, 8, 11 – maize grains; 3, 6, 9, 12, 15 – contramination control; 7 – positive control of the species *F. moniliforme*; 10 – positive species *F. graminearum* control; М – molecular weight pGEM marker.

Розроблено систему ПЛР-детекції безпосередньо роду *Fusarium*, видів *F. moniliforme*, *F. graminearum*, *F. avenaceum* та генів токсинуотворення (на прикладі *tri5*-гену, який кодує триходієнсінтазу, що каталізує перший крок біосинтезу трихотеценів) у геномах даного роду грибів у харчових виробках рослинного походження. Впровадження даної системи надасть можливість проводити експрес-контроль якості рослинної та харчової продукції на наявність інфекції та потенційну токсичність, що дозволить захистити врожаї та здоров'я людини.

Таким чином, показано, що в різних умовах існування та живлення виявляється молекулярно-генетична мінливість окремих представників та популяцій мікро-скопичних грибів роду *Fusarium*. Мінливість обумовлена лабільністю генетичного апарату, тобто можливістю здійснення перебудови варіабельних послідовностей ДНК, за рахунок чого виживають клітини грибів з найбільш відповідною до умов існування комбінацією генів. Наявність консервативних нуклеотидних послідовностей у геномах фузарій надає можливість детекції патогену на рівні роду, виду та штамів за допомогою ПЛР.

ЛІТЕРАТУРА

1. Билай В. И. Методы экспериментальной микологии: справочник / Киев: Наукова думка. — 1982. — С. 550.
2. Билай В. И. Фузари. — Київ: Научная мысль, 1977. — 442 с.
3. Грушка Я. Монография о кукурузе. — Москва: Колос, 1965. — 751 с.
4. Дерев'янку О. О., Кожухова Н. Е., Бабаянц О. В., Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетичний аналіз популяцій *Fusarium* spp. південного регіону України // Вісник ОНУ. — 2004. — т. 9, в. 5, № 1. — С. 105-112.
5. Дерев'янку О. А., Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Молекулярные маркеры геномов фузариий для определения инфицированности зерна кукурузы // Фактори експериментальної еволюції організмів. — Київ: Аграрна думка, 2006.— С. 93-97.
6. Загоруйко В. А., Ткаченко М. Г., Кишковская С. А., Танащук Т. Н., Иванова Е. В., Ткачев И. Ф., Сиволап Ю. М., Кожухова Н. Э., Захарова О. А. Совершенствование микробиологического контроля винодельческого производства на основе использования ПЦР-анализа // Вестник «Кримська якість» — 2006. — № 2 (8).— С. 113-114.
7. Захарова О. А., Вареник М. Б., Кожухова Н. Э., Сиволап Ю. М. Генетическая вариабельность *Fusarium moniliforme* Sheldon, поражающего зерна кукурузы // Зб. наук. праць «Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології» — Київ: ЛОГОС. — 2007.— С. 40-44.
8. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. // Molecular Biology and Evolution 2007 — <http://www.10.1093/molbev/msm092>.
9. Картель Н. А., Макеева Е. Н., Мезенко А. М. Генетика: Энциклопедический словарь / Минск: Технология, 1999. — 448 с.
10. Кожухова Н. Е., Захарова О. О. Сиволап Ю. М. Молекулярно-генетична ідентифікація мікотоксигенних фузаріїв // Одеський медичний журнал. — 2007. — № 6 (104). — С. 54-56.
11. Moller E., Bahnweng G., Sandermann H., Geiger H. Simple and efficient protocol for isolation high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, infected plant tissues // Food Mycol. — 1998. — Vol. 1. — P. 6115-6116.
12. McClintock B. Chromosome organization and genic expression // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1951. — Vol. 16. — P. 13-47.
13. Smith J., Smith O. The use of morphological, biochemical, and genetic characteristics of *Fusarium* // Trends Genet. — 1997. — Vol. 15. — P. 200-211.



УДК 577.21: 575.17

О. А. Захарова, Н. Э. Кожухова, Ю. М. Сиволап

Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН,
Овидиопольская дор. 3, Одесса, 65036, Украина, тел.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

ПЦР-АНАЛИЗ ИЗМЕНЧИВОСТИ ГЕНОМА И РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГРИБОВ РОДА *FUSARIUM*

Реферат

Проведено исследование внутриштаммовой варибельности *F. moniliforme* Sheldon var. *lactis*. Показано, что при контакте с устойчивыми и восприимчивыми к фузариозу генотипами кукурузы, при разных сроках культивирования и сериях пассажей наблюдаются изменения в электрофоретических спектрах культур штаммов. При изучении внутривидовой изменчивости коллекционных и свежевыделенных штаммов *F. moniliforme* обнаружено, что уровень полиморфизма составляет 49,4 % и 97,9 %, соответственно. Распределение свежевыделенных штаммов по данным кластеризации соответствует специализации по предпочтению к питательному субстрату растения-хозяина. Разработана система ПЦР-детекции фузарий с использованием родо-, видо- и штаммоспецифических последовательностей нуклеотидов ДНК.

К л ю ч е в ы е с л о в а: полимеразная цепная реакция, *Fusarium*, варибельность генома, ПЦР-детекция фузарий.

УДК 577.21: 575.17

О. А. Zakharova, N. E. Kozhukhova, Yu. M. Syvolap

South Plant Biotechnology Center UAAS,
Ovidiopolska road 3, Odesa, 65036, Ukraine, tel.: 8 (0482) 395 274,
e-mail: olyza@rambler. ru.

PCR-ANALYSIS OF GENOME CHANGEABILITY AND *FUSARIUM* FUNGI IDENTIFICATION TECHNOLOGY DEVELOPMENT

Summary

Fusarium moniliforme Sheldon var. *lactis* intrastrains variability research was carried out. We observed the changes in electrophoretic spectrums of the strains cultures that obtained in result of contact with fusariosus resistant and sensible maize genotypes, by different cultivation terms and series passages. At the study of collection and recently isolated *F. moniliforme* strains intraspecific changeability it was found out that the polymorphism level was 49,4 % and 97,9 %, accordingly. The recently isolated strains clusterization corresponds to plant-owner specialization. It has been developed the PCR-detection system of fusaria with the help of genus-, species- and strain-sequences of DNA nucleotides.

Key words: polymerase chain reaction, *Fusarium*, genome variability, PCR-detection of fusaria.

