

ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОРАЖЕННЫХ РАСТЕНИЙ ЛЮПИНА ИЗОЛЯТОВ ФУЗАРИУМА ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ И ГЕНУ EF-1 α

Е.Н. Сысолятин, В.С. Анохина*, Н.В. Анисимова, О.Г. Бабак, А.В. Кильчевский,
А.К. Храмцов*, И.Б. Саук*, И.Ю. Романчук*

Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
*Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь,
e-mail: anokhina@tut.by, E.Sysoliatin@igc.by

Введение

В современной селекции и семеноводстве узколистного люпина большую проблему представляют заболевания, среди которых фузариозное увядание и фузариозная корневая гниль, вызываемые грибами рода *Fusarium*, являются одними из самых распространенных и вредоносных [1]. Грибы рода *Fusarium* могут находиться в разнообразных отношениях с растениями. Многие виды этих грибов обычно ведут сапрофитный образ жизни, однако при определенных условиях способны переходить к паразитизму. Широкий спектр приспособительных реакций позволяет им сохраняться вне тканей растения.

Ряд исследований [2, 3] показывает, что на территории Беларуси корневую гниль люпинов вызывает *F. avenaceum*. В других работах в качестве возможных болезнетворных агентов также приводят *F. solani* [4], *F. semitectum* [5], *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. gibbosum* [6]. Поскольку большинство изолятов из пораженных растений относится к *F. avenaceum*, этот вид считается основным возбудителем корневой гнили у люпина узколистного. В качестве основного возбудителя фузариозного увядания различные исследования называют *F. oxysporum* [7, 8]. Также иногда из увядших растений выделяют *F. solani* [9], *F. avenaceum* [1].

Для своевременного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности зерна фитопатогенными грибами на разных стадиях его производства и переработки необходима их детекция и точная идентификация [10]. Современная схема классификации грибов в значительной степени основана на морфологической концепции вида, а идентификация видов в основном осуществляется по морфологическим характеристикам с применением методов микроскопии и культивирования их на питательных средах. Однако морфологическая классификация грибов рода *Fusarium* является предметом многолетнего обсуждения, поскольку морфологические характеристики у близкородственных видов микромицетов могут совпадать и значительно варьировать внутри одного вида. В связи с этим применение более чувствительных методов является актуальным и востребованным в диагностике фитопатогенов.

Для эффективного применения средств защиты растений от болезней и контроля зараженности семян фитопатогенными грибами на разных стадиях развития растительного организма необходима детекция и точная идентификация возбудителей болезни. Диагноз болезней в полевых условиях, вызываемых фитопатогенными грибами, проводят по наличию определенных признаков заболеваний растений (рисунок 1, 2), в лабораторных условиях идентификацию возбудителя осуществляют по морфологии спор и другим признакам патогена [11] с использованием методов микроскопии и культивирования грибов на питательных средах. Однако морфологические характеристики спор и мицелия грибов у близкородственных видов часто могут совпадать, кроме того отмечен их широкий полиморфизм в пределах вида. Поэтому в работе ряда авторов выявлены различия в результатах классификации патогенных грибов рода *Fusarium* при использовании морфологических и молекулярных характеристик изучаемых объектов [11]. К тому же

растения могут одновременно поражаться и другими патогенами, что приводит к искажению симптомов фузариозного проявления болезни.

В этой связи актуальным является применение более чувствительных методов диагностики источников фузариоза. В последние годы для детекции и идентификации фитопатогенных микроорганизмов применяют метод ПЦР, который превосходит традиционные методики по специфичности, чувствительности и эффективности и существенно дополняет классические подходы систематизации видов фузариума. В этом аспекте были выполнены работы по разработке праймеров для идентификации и диагностики источников фузариоза у зерновых культур [12, 13] и совершенствованы методологические приемы молекулярно-генетических анализов внутри- и межвидового разнообразия фитопатогенов и определения инфекции в семенном материале. Аналогичных исследований по культуре люпина нами не выявлено.

Целью нашей работы была сравнительная оценка результатов внутри- и межвидовой классификации источников фузариозного заболевания у растений люпина с использованием классических методов полевых, микологических и фитопатологических исследований и молекулярно-генетических анализов выделенных изолятов фузариума по гену EF-1 α .

Ген фактора элонгации трансляции 1- α (TEF) представлен в геноме фузариума в количестве одной копии и показывает высокий уровень полиморфизма последовательности даже у близкородственных видов. Этот ген используется в качестве однолокусного маркера для идентификации грибов рода *Fusarium* [11].

В нашем исследовании мы осуществили секвенирование последовательностей гена TEF у 7 патогенных изолятов *Fusarium*, выделенных из больных растений люпина, а затем сопоставили результаты с последовательностями TEF основных возбудителей фузариоза люпинов, извлеченными из базы данных GenBank. Полученные результаты были представлены в виде филогенетического дерева (рисунок 4).

Методы исследования

В полевых условиях из пораженных растений люпина были выделены изоляты патогенов, на основе которых в лабораторных условиях в секторе генетики растений БГУ была сформирована коллекция чистых культур разных видов фузариума. Сбор и гербаризация образцов пораженных растений, выделение грибов в чистую культуру проведено с использованием полевых и лабораторных методов микологических и фитопатологических исследований [15]. С учетом морфолого-культуральных признаков микромицеты идентифицированы с использованием определителей и методических рекомендаций [16-19]. Названия видов грибов приведены в соответствии с международной микологической глобальной базой данных Index Fungorum.

Для молекулярно-генетического анализа из коллекции БГУ чистых культур патогена рода *Fusarium* были получены изоляты №№ 70, 238, 315, 339, 350, 219-1, 219-2. Мицелий гриба культивировали на поверхности среды Чапека. Образцы мицелия для молекулярно-генетического анализа были отобраны стерильной шпилькой. Клетки разрушали с добавлением лизирующего раствора (0,1 М Tris, 0,5 М NaCl, 0,05 М ЭДТА, 1,25% SDS, 0,03 М Na₂HSO₃) на автоматическом гомогенизаторе TissueLyser II (Quiagen). Выделение ДНК проводили методом экстракции хлороформом. ДНК из водной фазы извлекали спиртовым осаждением.

Для синтеза фрагмента гена TEF использовали праймеры EF1 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3', EF2 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3' [20]. Состав реакционной смеси для ПЦР объемом 15 мкл был следующим: 1 ед. TornadoTaq-полимеразы (Праймтех), 1x ПЦР-буфер (3 mM MgCl₂), 200 мкМ каждого dNTP, по 250 пмоль/мкл прямого и обратного праймера, 0,5 мкл тотальной геномной ДНК. Начальную денатурацию проводили в течение 15 мин при 95°C. Затем следовали 35 циклов амплификации: 99°C – 1 секунда, 57°C – 15 секунд, 72°C – 30 секунд. Финальную элонгацию проводили при 72°C в течение 2 минут. Завершали реакцию охлаждением смеси до 4°C.

Продукты амплификации разгоняли в 1,5 %-ном агарозном геле. Целевой фрагмент вырезали из геля и очищали с помощью Jena Bioscience Agarose Gel Extraction Kit. Реакцию секвенирования проводили по методу Сэнгера с помощью набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, используя в качестве матрицы очищенный ПЦР-продукт. Продукт реакции секвенирования загружали в генетический анализатор ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные электрофореграммы анализировали с помощью программы Chromas (v. 1.45).

Из базы данных GenBank были извлечены последовательности гена TEF основных значимых для люпина видов фузариума [1, 21]: *Fusarium avenaceum* (MAFF 239206), *F. semitectum* (MAFF 236521), *F. oxysporum* (MAFF 240321), *F. moniliforme* (MAFF 240085), *F. equiseti* (MAFF 236434), *F. acuminatum* (MAFF 236716), *F. lateritium* (MAFF 235344), *F. culmorum* (MAFF 241212), *F. solani* (MAFF 238538), *F. kyshuense* (MAFF 237645), *F. poae* (MAFF 305947), *F. sporotrichoides* (MAFF 236639). Данные последовательности наряду с полученными при секвенировании результатами были выровнены при помощи алгоритма ClustalW программы MEGA 5.0. Методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) было построено филогенетическое дерево. При построении дерева применяли general time reversible (GTR) модель нуклеотидных замен с пропорцией инвариабельных сайтов (+I) и неоднородной скоростью нуклеотидных замен между оставшимися сайтами, описываемой гамма-распределением (+G) [21].

Результаты и обсуждение

В 2015 году из больных растений люпина были выделены 21 изолят фузариума, которые по морфологическим характеристикам были отнесены к виду *F. oxysporum*. Из них для оценки устойчивости образцов люпина узколистного использовали 5 изолятов (№ 70, 238, 315, 339 и 350). В 2016 году среди изолятов из пораженных растений идентифицированы 4 вида фузариума (таблица 1).

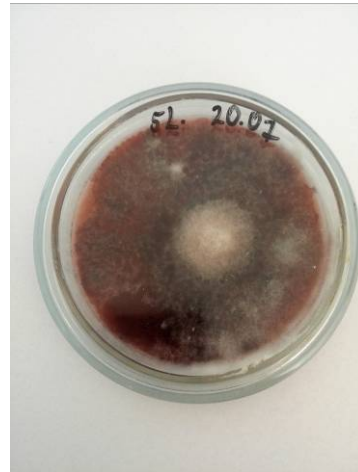
Таблица 1 – Характеристика патогенов, выделенных из пораженных растений (2016 г.)

Название гриба	Пораженная часть растения	Морфологическая характеристика гриба	Количество изолятов	Номер изолята
<i>F. semitectum</i>	корень, стебель, листья	Макроконидии веретеновидно-серповидные, с короткой медленно суживающей верхней клеткой, в основном с 3 перегородками. Размер 20-28x3,8-4,5 мкм. Микроконидии грушевидно-лимоновидные.	1	223
<i>F. solani</i>	корень, стебель, листья	Макроконидии веретеновидно-серповидные, с короткой слегка суженной верхней клеткой. Имеют 3-5 перегородок. Размер 30-45x4,5-4,6 мкм. Микроконидии отсутствуют.	3	122-2, 219-1, 219-9
<i>F. sporotrichiella</i>	корень, стебель, листья	Макроконидии веретеновидно-серповидные, с короткой слегка суженной верхней клеткой. Имеют 3-5 перегородок. Размер 30-45x4,5-4,6 мкм. Микроконидии отсутствуют.	1	219-8
<i>F. oxysporum</i>	корень, стебель, листья	Споры одноклеточные, микроконидии овальной формы, реже серповидной (макроконидии)	6	41, 52, 219-2, 219-5, 219-7, 223-2

Наиболее полиморфным был вид *F. oxysporum*, 6 изолятов которого существенно различались по морфологическим признакам мицелия (рисунок 1 и 2).



а

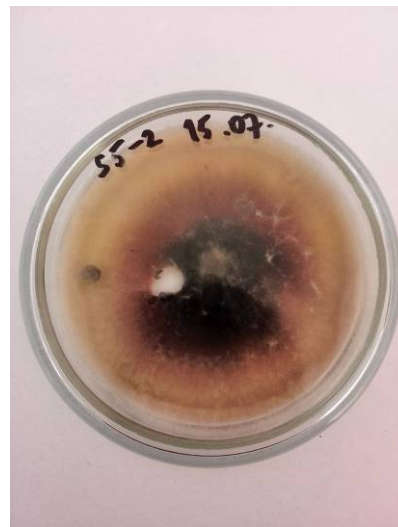


б

Рисунок 1 – Здоровое растение (а) и выделенный из него изолят (б)



а



б

Рисунок 2 – Здоровое растение (а) и выделенный из него изолят (б)

Все исследуемые изоляты фузариума в результате полимеразной цепной реакции с праймерами EF1, EF2 давали четкий фрагмент длиной 700-750 п.н. (рисунок 3).

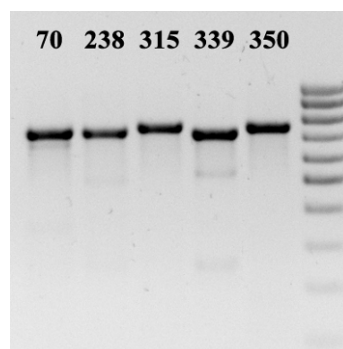
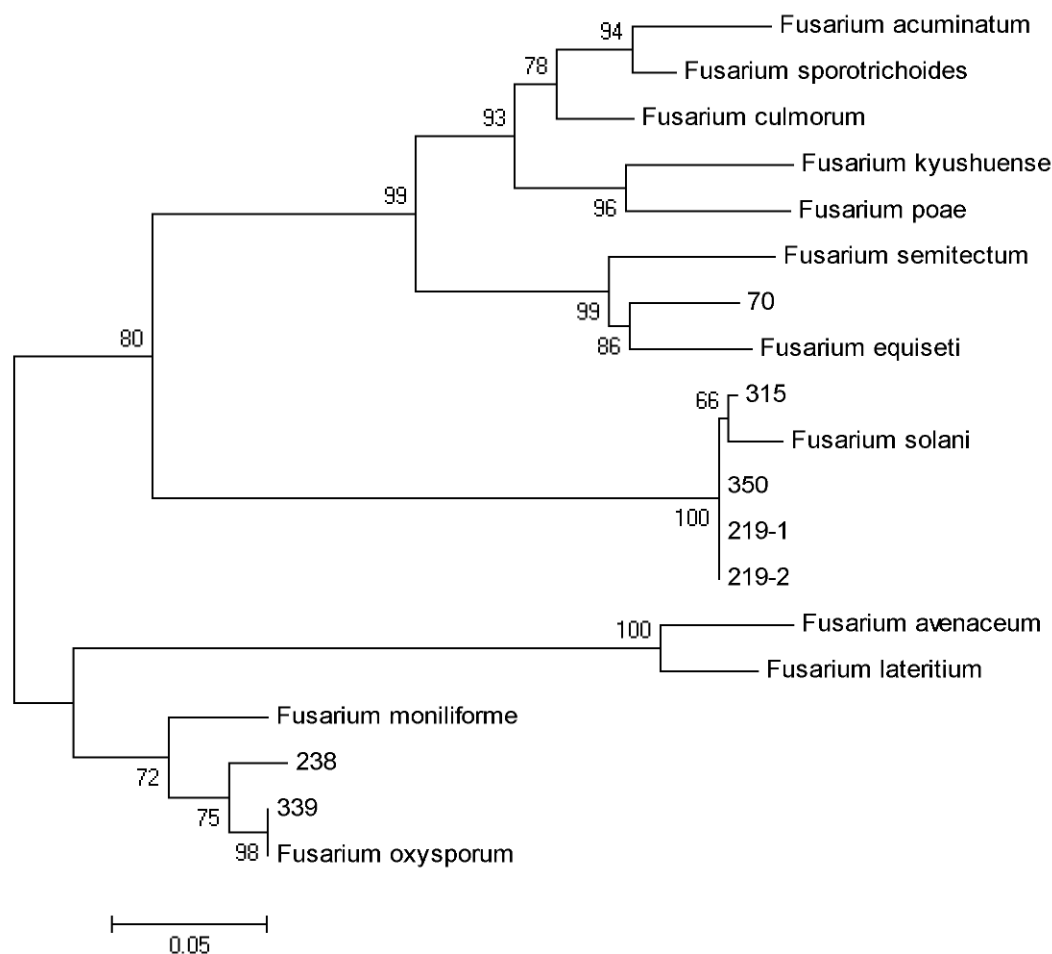


Рисунок 3 – Продукт амплификации гена TEF изолятов фузариума

Продукты ПЦР были очищены, и с ними была проведена реакция секвенирования по Сенгеру. С помощью сервиса nucleotide BLAST был осуществлен поиск гомологов полученных последовательностей ДНК. Также с использованием полученных последовательностей было построено филогенетическое дерево, представленное на рисунке 4.



70-350 – номера изолятов коллекции чистой культуры фузариума

Рисунок 4 – Филогенетическое дерево построенное методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood)

Результаты поиска гомологии показали, что изолят № 70 по гену TEF имеет наибольшее сходство с *F. equiseti*, который относится к секции *Gibbosum* [21]. Согласно данным [1], *F. gibbosum* выделялся из больных растений трех основных видов люпина: узколистного, желтого и белого. Исследования, выполненные в Литве [22], показали, что *F. gibbosum* составлял 7,7% от общего числа изолятов фузариума, выделенных из пораженных растений *L. angustifolius*.

Изоляты № 238 и 339 показали сходство с *F. oxysporum*. Этот вид считается основным возбудителем фузариозного увядания у узколистного, желтого и белого люпинов [1]. Изоляты № 315, 350, 219-1 и 219-2 по гену TEF были наиболее близки к *F. solani*. Этот вид фузариума при попадании в почву способен вызывать увядание растений и возникновение симптомов, подобных инфекции *F. oxysporum* [23]. Вместе с тем, небольшая доля изолятов *F. solani* была выделена и из растений, пораженных корневой гнилью [24].

Выводы

По результатам исследования было построено филогенетическое дерево, включающее последовательности гена TEF 5-ти изолятов фузариума, выделенных из больных растений

люпина. В результате проведенного анализа все исследуемые изоляты фузариума были дифференцированы при высоком уровне бутстрап поддержки. Изоляты 238, 339 показали сходство с *F. oxysporum* – основным возбудителем фузариозного увядания. Изоляты 350, 315, 219-1, 219-2 были наиболее близки к *F. solani*, а изолят 70 – к *F. equiseti*, которые также выделяются из патогенных сообществ фузариий, паразитирующих на люпине.

Выявлено частичное различие в принадлежности изолятов к конкретному виду при использовании классических методов их систематизации и идентификации по гену TEF. Уточнение возможных причин такого различия требует специальных исследований.

Список литературы

1. Корнейчук, Н.С. Грибные болезни люпина /Н.С. Корнейчук. – Киев : Колобиг, 2010. – 374 с.
2. Дорожкин, Н.А. Биология фузариоза желтого безалкалоидного люпина и разработка способов борьбы с ним / Н.А. Дорожкин, А.И. Кустова // Сб. научн. трудов ин-та соц. с.-х. АН БССР. – 1955. – Вып.3. – С. 3–13.
3. Дорожкин, Н.А. Болезни люпина / Н.А. Дорожкин, Н.И.Чекалинская. – Минск : Ураджай, 1965. – 82 с.
4. Степанова, М.Ю. Фузариозные заболевания бобовых культур: автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. с.-х. наук / М.Ю. Степанова. – Л., 1967. – 23 с
5. Егорова, А.В. К вопросу изучения фузариозов зернобобовых культур в БССР / А.В. Егорова // Доклады на конф. молодых ученых по вопросам земледелия. – Минск, 1968. – С. 396–399.
6. Киселев, И.И. Фузариоз кормового люпина в условиях юго-западной зоны нечерноземной полосы СССР и меры борьбы с ним / И.И. Киселев, И.А. Духанина // Микробиол. журн. – 1977. - № 39. – С. 71–78.
7. Toth, O. Studies on *Fusarium oxysporum* f. *lupini* Strains. Part 1 / O.Toth // Acta Phytopathologica Acad. Scient. Hung. – 1968. – V.3. №2. – P. 207–219.
8. Czyzewska, S. Przegląd badan nad fuzariozami wykonanych w instytucie Ochrony Roslin w latach 1951-1960 / S.Czyzewska // Biul. Inst. Ochrony Rosl. – 1961. – № 12 – P. 129–162.
9. Filipowicz, A., et al. Fuzariozy lubinow w powdniowo-wschodniej Poise / A. Filipowicz, A. Wagner // Ochrona roslin. – 1989. – 33. №10–11. – S.31–33.
10. Kristensen, R., et al. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation factor 1 alpha gene sequences / R. Kristensen, M. Torp, B. Kosiak, A. Holst-Jensen // Mycological Research. – 205. – V. 109. – P. 173–186.
11. Chehri, K., et al. Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran / K. Chehri, B. Salleh, T. Yili-Mattila // Saudi Journal of Biological Science. – 2011. – V. 18. – P. 341–351.
12. Абрамова, С.Л. Разработка систем идентификации грибов – возбудителей экономически значимых болезней зерновых культур методом ПЦР: автореф.дисс. на соиск.уч.степ. канд.биол.наук / С.Л. Абрамова. – М., 2013. – 21 с.
13. Стахеев, А.А. Разработка специфических маркеров для изучения егентического полиморфизма токсигенных грибов рода *Fusarium*: автореф.дисс. на соиск.уч.степ. канд.биол.наук / А.А. Стахеев. – М., 2013. – 22 с.
14. Geiser, D.M. et al. FUSARIUM-IDv.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium* / D.M. Geiser, M.M. Jimenz Gasco, S. Kang, I. Mkalowska, N. Veeraraghavan, T.J. Ward, N. Zhang, G.A. Kuldau, K. O'Donnell //European Journal of Plant Pathology. – 2005. – V. 110. – P. 473–479.
15. Методы экспериментальной микологии. Справочник / В.И. Билай [и др.]. – Киев : Наук. думка, 1982. – 551 с.
16. Билай, В.И. Фузариин / В.И. Билай. - Киев : Наук. думка, 1944. – 441 с.
17. Микромитеты – возбудители болезней растений / В.И. Билай, Р.И. Гвоздяк, И.Г. Скрипаль и др.; под ред Билай В.И. - Киев : Наук. думка, 1988. – 552 с.

18. Пидопличенко, Н.М. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель. Том 2. Грибы несовершенные. – Киев : Наук. думка, – 1977. – 300 с.
19. Index Fungorum [Electronic resource]. – Режим доступа: www.indexfungorum.org/names/Names.asp – Дата доступа: сентябрь 2016.
20. Rahjoo, V. et al Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. / V. Rahjoo, J. Zad, M. Javan-Nikkhah, A. Mirzadi Gohari, S.M. Okhovvat, M.R. Bihamta, N. J Razzaghian, S.S. Klemsdal // J. Plant Pathology. – 2008. – Vol. 90 (3). – P. 463–468.
21. Watanabe, M., et al. Molecular phylogeny of the higher and lower taxonomy of the *Fusarium* genus and differences in the evolutionary histories of multiple genes / M. Watanabe, T. Yonezawa, K. Lee, S. Kumagai, Y. Sugita-Konishi, K. Goto, Y. Hara-Kudo // BMC Evol. Biol. – 2011. – V.11. – 322 p.
22. Шальтянис, Б.В. Фузариоз бобовых культур в Литве [1. Видовой состав и распространение возбудителей заболевания] / Б.В. Шальтянис // Труды АН. – Вильнюс, 1967. – Т.2, № 43. – С. 87–98.
23. Корнейчук, Н.С. Видовой состав и патогенность грибов рода *Fusarium*, выделенных из больных растений люпина в зоне Полесья УССР / Н.С. Корнейчук // VII съезд Украинского ботанического общества: тез. докл. – К.: Наукова думка, – 1982. – 365 с.
24. Поликсенова, В.Д. Видовое разнообразие и полиморфизм возбудителей фузариоза люпина и томата в связи с разработкой метода оценки растений на болезнеустойчивость / В.Д. Поликсенова, С.Г. Пискун, В.С. Анохина [и др.] // Тез. докл. научно-практ. конф. Минск: ГУКФ "Эжаут", – 1996. – ч.1. – С. 52–54.

DIFFERENTIATION OF *FUSARIUM* ISOLATES FROM INFECTED LUPINE PLANTS BY MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS AND EF-1 α GENE

E.N. Sysoliatin, V.S. Anokhina*, N.V. Anisimova, O.G. Babak, A.V. Kilchevsky, A.K. Khramtsov*, I.B. Sauk*, I.Y. Romanchuk*

Institute of Genetics and Cytology of NAS of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

** Belarusian State University, Minsk, The Republic of Belarus*

e-mail: anokhina@tut.by, E.Sysoliatin@igc.by

Fusarium species causing lupine lesions were identified based on classic methods of mycological and phytopathological examination as well as molecular genetic examination of TEF gene of isolates from diseased lupine plants. 4 *Fusarium* species causing lupine lesions are detected and intraspecific polymorphism is revealed. Isolates of *F. oxysporum* were characterised by maximal diversity (in 2015 21 isolates with different traits were detected, and 6 isolates of this species in 2016).

Partial variance between the results obtained with classical methods and the results of TEF gene identification was observed. A special study is needed to clarify the possible reasons for this variance.